

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ESTRATÉGIAS DE ALIMENTAÇÃO PARA VACAS LEITEIRAS:
USO DE GLICERINA COMO FONTE ENERGÉTICA E
QUITOSANA COMO MODULADOR DE FERMENTAÇÃO
RUMINAL**

**Pablo Gomes de Paiva
Zootecnista**

2015

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ESTRATÉGIAS DE ALIMENTAÇÃO PARA VACAS LEITEIRAS:
USO DE GLICERINA COMO FONTE ENERGÉTICA E
QUITOSANA COMO MODULADOR DE FERMENTAÇÃO
RUMINAL**

Pablo Gomes de Paiva

Orientador: Prof. Dr. Francisco Palma Rennó

**Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP,
Câmpus de Jaboticabal, como parte das
exigências para a obtenção do título de
Doutor em Zootecnia.**

2015

Paiva, Pablo Gomes
P149e Estratégias de alimentação para vacas leiteiras: uso de glicerina como fonte energética e quitosana como modulador de fermentação ruminal / Pablo Gomes de Paiva. -- Jaboticabal, 2015
xix, 64 p. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015

Orientador: Francisco Palma Rennó

Banca examinadora: Arlindo Saran Netto, Jefferson Rodrigues Gandra, Ricardo Andrade Reis, Mauro Dal Secco de Oliveira

Bibliografia

1. Aditivos. 2. Amido. 3. Digestibilidade. 4. Glicerol. 5. Produção de leite. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 636.087:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: ESTRATÉGIAS DE ALIMENTAÇÃO PARA VACAS LEITEIRAS: USO DE GLICERINA COMO FONTE ENERGÉTICA E QUITOSANA COMO MODULADOR DE FERMENTAÇÃO RUMINAL

AUTOR: PABLO GOMES DE PAIVA

ORIENTADOR: Prof. Dr. FRANCISCO PALMA RENNÓ

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM ZOOTECNIA, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. FRANCISCO PALMA RENNÓ

Departamento de Zootecnia / Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos de Pirassununga

Prof. Dr. ARLINDO SABAN NETTO

Departamento de Zootecnia / Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos de Pirassununga

Prof. Dr. JEFFERSON RODRIGUES GANDRA

Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados/MS

Prof. Dr. RICARDO ANDRADE REIS

Departamento de Zootecnia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. MAURO DAL SECCO DE OLIVEIRA

Departamento de Zootecnia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Data da realização: 10 de dezembro de 2015.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

PABLO GOMES DE PAIVA - filho de Hernandes Gomes de Paiva e Luiza Bete Alves de Paiva, nasceu em Rio Branco, no Estado de Mato Grosso, em 10 de janeiro de 1987. Cursou todo ciclo de educação básica e ensino médio na rede pública de ensino no município de Reserva do Cabaçal-MT “Cidade das águas”, onde passou toda infância e adolescência. Em março de 2005, iniciou o curso de Graduação em Zootecnia na Universidade do Estado de Mato Grosso, obtendo o título de Zootecnista em agosto de 2009. Em março de 2010, ingressou no curso de Mestrado em Ciência Animal na Universidade Federal de Mato Grosso sob orientação da Prof^a. Dr^a. Rosemary Laís Galati, concentrando seus estudos na área de Nutrição e Produção de ruminantes, submetendo-se à defesa de dissertação em fevereiro de 2012. Ingressou no curso de Doutorado em Zootecnia em março de 2012 na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Jaboticabal sob orientação do Prof. Dr. Francisco Palma Rennó. No período de agosto de 2014 a fevereiro de 2015 realizou estágio no exterior sob orientação do Prof. Barry J. Bradford no Department of Animal Sciences and Industry, Kansas State University, em Manhattan-KS, EUA.

"A vida tem suas etapas. Em que época as flores surgem? Muitos pensam que surgem na primavera. Mas estão errados. Surgem na escassez hídrica e no drama do gélido inverno. Ali, secreta e lentamente, são elaboradas para desabrochar na primavera. Muitos querem a brisa das alturas e à vista deslumbrante das paisagens, mas não querem escalar as montanhas."

Augusto Cury

"E mesmo que meus passos sejam falsos, mesmo que os meus caminhos sejam errados, mesmo que o meu jeito de levar a vida incomode, eu sei quem sou, e sei pelo que devo lutar. Se você acha que o meu orgulho é grande, é porque nunca viu o tamanho da minha FÉ."

Tião Carreiro

"Aqui é trabalho, meu filho."

Muricy Ramalho

Dedico

A minha família,
em especial a meus pais Hernandes e Luiza, e minha irmã Kescimara,
que sempre me ensinaram o valor do conhecimento e do trabalho,
e por despertar em mim o amor pelo mundo rural.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por iluminar meus passos e por não me abandonar mesmo nos momentos mais difíceis, quando os problemas parecem ser maiores do que realmente são.

À minha família, meus pais Hernandes G. de Paiva e Luiza Bete A. de Paiva, minha irmã Kescimara A. de Paiva Santin e meu cunhado Anderson Santin por acreditarem em mim, nessa jornada, e não medirem esforços para me apoiar.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal, e a todos os professores do Departamento de Zootecnia pelos ensinamentos e a possibilidade de realização do curso de Doutorado.

À Universidade de São Paulo, a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, e ao Departamento de Nutrição e Produção Animal onde passei grande parte do Doutorado. Obrigado por me acolherem de forma tão receptiva e propiciar condição para realização deste estudo.

Ao meu orientador Prof. Dr. Francisco Palma Rennó, pelo voto de confiança e oportunidade de aprendizado, por exemplo de pessoa apaixonada por seu trabalho, e pela amizade ao longo desses anos. Um muito obrigado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo durante o Doutorado e pela oportunidade de realizar o Doutorado Sanduíche no Exterior (processo: BEX3664/14).

Ao Prof. Barry J. Bradford e aos membros de seu grupo de pesquisa: PhD. Laman Mamedova, Gail Carpenter, Fabian Vargas-Rodrigues, Caroline Ylioja, Katie Olagaray e James Shaffer por me receberam muito bem na Kansas State University, Manhattan-KS, EUA durante o período de treinamento no exterior (Dr. sanduíche) e me proporcionarem uma das melhores experiências de minha vida, pessoal e profissional. Assim, estendo também um agradecimento especial aos amigos brasileiros e não brasas que lá fiz: Alexandre, Gabi, Erick, Patricia, Lucas R. (L1), Lucas D. (L2), Renê, Gustavo T., Jose, David Z., Ali Hussein e mais, mais pessoas.

A Prof^a. Dr^a. Rosemary Lais Galati por sempre estar disposta a transmitir conhecimentos e conselhos, obrigado pela amizade de sempre.

Aos amigos de casa em Pirassununga-SP e agregados: Elmeson F. (Mineiro), Rafael Barletta (Bisão), Gustavo Almeida (Gnomo), Jefferson Gandra (Jeff), Tiago Del Valle (o Titi, by Gustavo), Vitor Bettero (Sovito), Rodolfo Mingoti (TchaTcha), Caio Takiya (Japonês) e Carlos Eduardo Cardoso (Dado, Leitoa) os trabalhos e nossas histórias levarei comigo pra toda a vida. Este trabalho tem parte de cada um, vocês são foda meus amigos.

Aos amigos do Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite (LPBL/USP): Gustavo Calomeni (Sacudo), Rodrigo Gardinal (komixa), Thiago da Silva (Pira), Filipe Zanferari (Gaúcho), Cybele Araujo (Cibelinha), Lenita Camargo (Loira), Thiago Vendramini (Cati), Guilherme, Elmeson F. (Mineiro), Rafael Barletta (Bisão), Gustavo Almeida (Gnomo), Jefferson Gandra (Jeff), Tiago Del Valle (o Titi), Vitor Bettero (Sovito), Rodolfo Mingoti (TchaTcha), Caio Takiya (Japonês) turma mais louca que conheci, mas que trabalha muito. Obrigado pela amizade e ajuda sempre, equipe top.

Aos amigos e estagiários: Arthur (Faveroles), Fernanda (Barrosa), Vitor (Matraca), Carlos Eduardo (Dado) e Guilherme Cabral (Urubu) obrigado pela ajuda, paciência e amizade ao longo dos dias de trabalho e experimento, vocês são parte disso e o tornaram possível.

Aos amigos do Departamento de Nutrição e Produção Animal (VNP/FMVZ-USP) Rafael Teixeira (ceará), Gabi (Pombo), Nara Consolo, Fernanda (Japa), Juliana Santos (onça), Leonardo (Leo), Rejane Souza, Cristian Martins, Bruna Gomes, Thiago Tomazi e por ai vai, pessoas que fizeram do VNP também minha casa e tornaram meus dias em Pirassununga mais agradáveis.

Aos amigos e funcionários do LPBL: Diogo (sheriff), Lucas, Denis, Schimit, Nathalia, Paulão, Lenon e Lupercio pela amizade e exemplo de dedicação. Meu muito obrigado, vocês são fundamentais para condução das pesquisas.

Ao Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite (LPBL/USP) por proporcionar infraestrutura e condição para realização deste estudo. E a todos alunos, colegas de pós, pesquisadores, profissionais e amigos que conheci ao longo desse tempo de jornada no LPBL.

A todos professores e funcionários do Departamento de Nutrição e Produção Animal (VNP/FMVZ-USP) pela ajuda e boa convivência nesses anos de Pirassununga.

A todos amigos que fiz ao longo do mestrado e doutorado, seja na UFMT-Cuiabá, UNESP-Jaboticabal, FMVZ-USP, FZEA-USP vou leva-los sempre comigo.

A dona Dalva (Malvina), pelo cuidado e carinho de sempre, nossa mãe em Pirassununga (você é milIII, Malvina; te levo sempre comigo).

A dona Silmara e Chico pelo carinho e amizade de sempre, e a todos do Bar do Chico (escritório), onde passamos bons e divertidos momentos (melhor coxinha do Brasil).

Aos amigos de Reserva do Cabaçal-MT “Cidade das águas”, minha terra querida: Vinicius, Edelson, Luana, Vanderley, Serginho, Marcos Manoel, Nathaly, Andréia, Anderson, Jadson, Hudson, Ronaldo, Bruno e muito mais não citados aqui; em especial a turma do “Lobo Mal e as Cuquitinhas” um abraço especial. A todos que auxiliaram e me acompanharam ao longo desses anos, dessa jornada; pessoas que já estiveram mais próximas em outros momentos e hoje um pouco mais distantes, minha eterna gratidão e meu muito obrigado a cada um.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----|
| RESUMO | I |
| ABSTRACT | III |
| CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS | 1 |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 2 |
| 2.1 <i>Caracterização da glicerina</i> | 2 |
| 2.2 <i>Glicerina e alimentação de bovinos</i> | 3 |
| 2.3 <i>Caracterização da quitosana</i> | 6 |
| 2.4 <i>Efeitos da quitosana na fermentação ruminal e digestibilidade de nutrientes</i> | 9 |
| 3. LITERATURA CITADA..... | 10 |
| CAPÍTULO 2 - Efeitos da glicerina no desempenho, digestibilidade e fermentação ruminal em vacas leiteiras alimentadas com dietas a base de silagem de milho | 17 |
| RESUMO | 18 |
| ABSTRACT | 19 |
| 1. Introdução | 20 |
| 2. Material e métodos | 21 |
| 2.1 <i>Local, Instalações e Animais</i> | 21 |
| 2.2 <i>Dietas Experimentais, Coletas e Análises de Alimentos</i> | 22 |
| 2.3 <i>Produção e Composição do Leite</i> | 24 |
| 2.4 <i>Escore de Condição Corporal e Peso</i> | 24 |
| 2.5 <i>Parâmetros Sanguíneos</i> | 24 |
| 2.6 <i>Balanço de Nitrogênio e Síntese de Proteína Microbiana</i> | 25 |
| 2.7 <i>Fermentação Ruminal</i> | 25 |
| 2.8 <i>Análises Estatísticas</i> | 26 |
| 3. Resultados | 27 |
| 3.1 <i>Consumo de Matéria Seca e Digestibilidade dos Nutrientes</i> | 27 |
| 3.2 <i>Fermentação Ruminal</i> | 27 |
| 3.3 <i>Metabólitos Sanguíneos, Balanço de Nitrogênio e Síntese Microbiana</i> | 31 |
| 3.4 <i>Produção e Composição do Leite</i> | 32 |
| 4. Discussão..... | 33 |

| | |
|---|----|
| 5. Conclusão | 37 |
| 6. Referências | 37 |
| CAPÍTULO 3 – Efeitos da quitosana na fermentação ruminal, digestibilidade dos | |
| nutrientes, produção e composição do leite em vacas leiteiras | 41 |
| RESUMO | 42 |
| ABSTRACT | 43 |
| 3. Introdução | 44 |
| 4. Material e métodos | 45 |
| 2.1 <i>Local, Instalações e Animais</i> | 45 |
| 2.2 <i>Tratamentos Experimentais, Coletas e Análises de Alimentos</i> | 45 |
| 2.3 <i>Produção e Composição do Leite</i> | 47 |
| 2.4 <i>Escore de Condição Corporal e Peso</i> | 48 |
| 2.5 <i>Parâmetros Sanguíneos</i> | 48 |
| 2.6 <i>Balanço de Nitrogênio e Síntese de Proteína Microbiana</i> | 48 |
| 2.7 <i>Fermentação Ruminal</i> | 49 |
| 2.8 <i>Análises Estatísticas</i> | 49 |
| 3. Resultados | 50 |
| 3.1 <i>Consumo e Digestibilidade dos Nutrientes</i> | 50 |
| 3.2 <i>Fermentação Ruminal</i> | 50 |
| 3.3 <i>Metabólitos Sanguíneos, Balanço de Nitrogênio e Síntese Microbiana</i> | 51 |
| 3.4 <i>Produção e Composição do Leite</i> | 53 |
| 4. Discussão..... | 54 |
| 5. Conclusão | 56 |
| 6. Referências | 57 |
| APÊNDICE 1 – Certificado de Qualidade Glicerina | 60 |
| APÊNDICE 2 – Certificado de Qualidade Quitosana | 61 |
| APÊNDICE 3 – Implicações no uso de glicerina bruta na dieta de ruminantes..... | 62 |
| APÊNDICE 4 – Implicações no uso de quitosana na dieta de ruminantes..... | 64 |

Lista de Abreviações

| | |
|-------------------|--|
| AGCC | Ácidos graxos de cadeia curta |
| AST | Aspartato aminotransferase |
| CMS | Consumo de matéria seca |
| CO | Dieta controle |
| DEL | Dias em lactação |
| ECC | Escore de condição corporal |
| EE | Extrato etéreo |
| FDAi | Fibra em detergente ácido indigestível |
| FDN | Fibra em detergente neutro |
| GGT | Gamma-glutamil transferase |
| MO | Matéria orgânica |
| MODR | Matéria orgânica degradável no rúmen |
| MS | Matéria seca |
| N | Nitrogênio |
| N-NH ₃ | Nitrogênio amoniacal |
| NDT | Nutrientes digestíveis totais |
| PB | Proteína bruta |
| PC | Peso corporal |
| PL | Produção de leite |
| PLC | Produção de leite corrigida |



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Desempenho produtivo, digestão e metabolismo de vacas leiteiras suplementadas com diferentes concentrações de glicerina bruta nas dietas”, protocolado sob o nº 3058/2013, utilizando 24 bovinos, sob a responsabilidade do(a) Francisco Palma Rennó, foi aprovado em reunião de 4/9/2013 e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

We certify that the Research “Productive performance, digestion and metabolism of dairy cows fed with diferente concentrations of crude glicerina”, protocol number 3058/2013, utilizing bovine twenty-four, under the responsibility Francisco Palma Rennó, was approved in the meeting of day 9/4/2013 and agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo.

São Paulo, 5 de setembro de 2013.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Desempenho produtivo, digestão e metabolismo em bovinos alimentados com diferentes concentrações de quitosana nas dietas”, protocolado sob o nº 2222/2011, utilizando 88 (oitenta e oito) bovinos, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Francisco Palma Rennó, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da “Comissão de Ética no uso de animais” da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 04/5/2011.

We certify that the Research “Productive performance, digestion and metabolism in cattle fed with different levels of chitosan in the diets”, protocol number 2222/2011, utilizing 88 (eighty-eight) cattle, under the responsibility Prof. Dr. Francisco Palma Rennó, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by “Ethic Committee in the use of animals” of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 05/04/2011.

São Paulo, 12 de maio de 2011.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

ESTRATÉGIAS DE ALIMENTAÇÃO PARA VACAS LEITEIRAS: USO DE GLICERINA COMO FONTE ENERGÉTICA E QUITOSANA COMO MODULADOR DE FERMENTAÇÃO RUMINAL

RESUMO - Foram realizados dois experimentos para avaliar o efeito de diferentes estratégias de alimentação sobre o desempenho de vacas leiteiras. Assim, os objetivos do presente estudo foram avaliar os efeitos de níveis crescente glicerina bruta (Experimento 1) e doses crescentes de quitosana (Experimento 2) na dieta de vacas leiteiras sobre o consumo de matéria seca e digestibilidade dos nutrientes, fermentação ruminal, produção e composição do leite. No experimento 1 foram utilizadas 24 vacas da raça Holandesa (oito canuladas no rúmen; 184 ± 50 DEL; 594 ± 39 kg PC) distribuídas em seis Quadrados Latinos 4×4 , com períodos experimentais de 21 dias, sendo os últimos sete dias destinados a coleta de dados. As vacas foram distribuídas dentro de cada quadrado para receber uma das seguintes dietas: Controle ou 0% de glicerina/kg de MS; 70 g de glicerina/kg de MS; 140 g de glicerina/kg de MS; e, 210 g de glicerina/kg de MS em substituição ao milho moído da dieta. O consumo de matéria seca e a produção de leite reduziram linearmente, especialmente quando a glicerina foi incluída até 210 g/kg MS. Porém, a adição de glicerina a dieta não afetou a composição do leite. A digestibilidade total da MS, PB e EE aumentou linearmente, enquanto da FDN reduziu linearmente, especialmente na dieta contendo 210 g/kg de glicerina. A inclusão de glicerina às dietas alterou a fermentação ruminal, com aumento de propionato e butirato, e redução de acetato, resultando em menor relação acetato: propionato, quando a glicerina foi adicionada até 210 g/kg da dieta. Inclusão de altos níveis glicerina bruta à dieta (210 g/kg) de vacas leiteiras no terço médio-final de lactação, promoveu aumento na digestibilidade da matéria seca e propionato ruminal mas afetou negativamente o consumo de matéria seca e a produção de leite. No experimento 2: oito vacas da raça Holandesa canuladas no rúmen (215 ± 60 DEL; $641,6 \pm 41,0$ kg/PC) foram distribuídas em duplo Quadrado Latino 4×4 , com períodos experimentais de 21 dias. Os animais foram distribuídas para receber 1 dos 4 tratamentos, como segue: CO) controle (sem adição de quitosana), Q75, Q150 e Q225 adição de 75, 150 e 225 mg de quitosana/kg de PC via canula ruminal, respectivamente. O fornecimento de quitosana não teve efeito

sobre o consumo de matéria seca, porém, aumentou a digestibilidade da proteína bruta. As concentrações de propionato ruminal aumentaram, enquanto as concentrações de butirato, isobutirato, isovalerato e a relação acetato: propionato reduziram com adição de quitosana. A adição de quitosana aumentou a produção de leite, PLC, proteína e lactose. Portanto, nossos resultados sugerem que a glicerina bruta pode ser incluída até 140 g/kg MS em substituição ao milho grão sem afetar o metabolismo e desempenho de vacas leiteiras, e uso de 225 mg de quitosana/kg PC leva a aumento na concentração de propionato ruminal e produção de leite. Assim, a glicerina bruta e a quitosana mostraram-se como alternativas para otimizar o desempenho de vacas leiteiras no terço médio-final de lactação.

Palavras-chave: aditivos, amido, digestibilidade, glicerol, produção de leite

FEEDING STRATEGIES FOR DAIRY COWS: THE USE OF GLYCERIN AS ENERGY SOURCE AND CHITOSAN AS A MODULATOR OF RUMEN FERMENTATION

ABSTRACT - Two experiments were conducted to evaluate the effects of different feeding strategies on dairy cows performance. Thus, the objective of this study was to evaluate the effects of increasing levels of crude glycerin (Experiment 1) and chitosan (Experiment 2) in the diet of dairy cows on dry matter intake, nutrient digestibility, ruminal fermentation, milk yield and composition. The experiment 1: twenty-four Holstein cows (eight rumen cannulated; 184 ± 50 DIM; 594 ± 39 kg BW) were assigned to six 4 x 4 Latin square design, with 21-day periods and the 7 last days for sampling. Cows were assigned within each square to receive one of the following diets: Control or 0 g of glycerin/kg DM; 70 g of glycerin/kg DM; 140 g of glycerin/kg DM; and, 210 g of glycerin/kg DM partially replacing ground corn of diet. Dry matter intake and milk production linearly decreased, specially when crude glycerin was added up to 210 g/kg of the diet. However, addition of glycerin did not affect milk composition. Total-tract digestibility of DM, CP and EE were linearly increased, and NDF linearly decreased, mainly in the 210 g/kg of glycerin inclusion in the diet. Feeding glycerin changed ruminal fermentation, with increased propionate and butyrate, and decreased acetate concentrations, resulting in lower acetate: propionate ratio, especially when glycerin was added up to 210 g/kg of the diet. High crude glycerin levels (210 g/kg DM) in the diets of mid-late lactation dairy cows increased dry matter digestibility and ruminal propionate; but, had negative effect on dry matter intake and milk production. Experiment 2: eight rumen cannulated Holstein cows (215.4 ± 60.9 DIM; 641.6 ± 41.06 kg of BW) were assigned into a replicated 4 x 4 Latin square design with 21 d periods. Cows were assigned to receive one of treatments, as following: CO) control (without chitosan), C75, C150 and C225 addition of 75, 150 and 225 mg/kg of BW chitosan placed through rumen cannula, respectively. Chitosan supply had no effect on dry matter intake, however, increased crude protein digestibility. Propionate concentration was increased, while butyrate, isobutyrate, isovalerate and acetate: propionate ratio was decreased by chitosan. The chitosan addition increased milk production, FCM, protein and lactose production. Therefore, our findings suggest that crude glycerin can be included up to 140 g/kg DM replacing corn grain without

negative effect on metabolism and performance of dairy cows; and, using of 225 mg of chitosan/kg BW led to increase ruminal propionate and milk yield. Thus, crude glycerin and chitosan showed as an alternative to improve performance of dairy cows in mid-late lactation stage.

Keywords: additives, digestibility, glycerol, milk yield, starch

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

Produtores de leite vivenciam uma situação de redução na rentabilidade devido ao aumento nos preços dos insumos, dentre eles os relacionados à nutrição têm grande destaque, uma vez que podem representar até 60% do custo efetivo de uma propriedade leiteira (CEPEA, 2015). Devido a este cenário, produtores e nutricionistas buscam utilizar coprodutos e maximizar a eficiência produtiva dos animais a fim de diminuir os custos de produção.

A glicerina é um coproduto proveniente da indústria de biodiesel, sendo o Brasil terceiro maior produtor mundial de biodiesel. A Agência Nacional de Petróleo padronizou a inclusão de 7% de biodiesel no óleo diesel comercializado em todo o território nacional, a partir de 2014, acarretando em aumento na oferta de glicerina (ANP, 2015). A glicerina pode ser incluída nas rações de ruminantes como um ingrediente energético e substituir cereais diminuindo assim os custos com alimentação, sendo que a glicerina tem aproximadamente 40% do valor econômico e nutrientes digestíveis totais (NDT) semelhante ao do milho. Uma característica importante da glicerina é a capacidade do glicerol em ser transformado a ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) no rúmen, principalmente em ácido propiônico, promovendo melhor aporte energético aos animais (DONKIN et al., 2009; TERRÉ et al., 2011). No entanto, no processo de obtenção da glicerina são geradas algumas substâncias que podem ser tóxicas, comprometer a saúde e o desempenho animal, principalmente o metanol que acarreta em formação de ácido fórmico durante a metabolização hepática. A questão a ser respondida com relação à inclusão de glicerina em dietas de vacas leiteira é qual o nível máximo de inclusão de glicerina que não prejudica o desempenho, a digestibilidade de nutrientes e a saúde do animal.

A melhora da eficiência produtiva de vacas leiteiras pode ser alcançada quando após a introdução de uma tecnologia o animal diminui o consumo de alimentos e mantém a produção de leite ou quando aumenta a produção de leite sem alterar o consumo de alimentos. Atualmente, a melhora da eficiência produtiva dos animais pode ser alcançada com a utilização de antibióticos ionóforos, sendo a monensina a mais utilizada no país.

Porém, considerando o princípio de precaução, em 2006, a União Europeia banuiu o uso de antibióticos ionóforos na alimentação animal. Como os países europeus exercem grande influência sobre os principais consumidores de produtos de origem animal do mundo a busca por alternativas naturais aos ionóforos torna-se cada vez mais frequente. Estudos publicados a partir de 2009 na nutrição de ruminantes demonstram que a quitosana, biopolímero natural derivado do exoesqueleto de crustáceos e insetos, possui atividade antimicrobiana sendo capaz de alterar o metabolismo ruminal em direção a uma fermentação mais eficiente energeticamente e conseqüentemente melhorar o desempenho produtivo dos animais (GOIRI et al., 2009a; GOIRI et al., 2009b; GOIRI et al., 2010). Essas pesquisas realizadas com a quitosana demonstram frequente aumento na proporção de ácido propiônico ruminal e maior digestibilidade de proteína bruta da dieta, porém não há trabalhos com vacas leiteiras publicados até o momento com suplementação de quitosana.

Portanto, o presente trabalho apresenta os resultados de dois experimentos, em que o primeiro teve como objetivo determinar os efeitos da inclusão de níveis crescentes de glicerina bruta na dieta de vacas leiteiras sobre o desempenho produtivo, fermentação ruminal, digestibilidade de nutrientes e metabolismo. O segundo experimento teve como objetivo a avaliação de doses crescentes de quitosana na dieta de vacas leiteiras sobre a digestibilidade de nutrientes, fermentação ruminal, e conseqüentemente a produção e composição do leite.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Caracterização da glicerina

Glicerina é o nome comercial de um líquido viscoso, incolor, inodoro, higroscópico e com sabor adocicado, quimicamente definido como glicerol (1,2,3 propanotriol) (ARRUDA et al., 2007), sua molécula ($C_3H_8O_3$) contém aproximadamente 1,98-2,29 Mcal/kg de energia líquida (SCHOREDER; SUDEKUM, 1999), ou seja, aproximadamente a mesma energia contida no milho. A glicerina é obtida durante a produção do biodiesel através da reação de óleo vegetal ou gordura animal com álcool anidro (DONKIN, 2008). Durante o processo de transesterificação, o óleo vegetal ou

gordura animal reage com álcool (metanol ou etanol) na presença de catalisador (hidróxido de sódio ou potássio), resultando em éster monoalquilado (biodiesel) e seu principal coproduto, a glicerina (PLÁ, 2002).

Segundo Dasari et al. (2005), para cada 100 kg de biodiesel produzidos durante o processo de transesterificação de óleos ou gordura, 10 kg de glicerina são gerados. Assim, o aumento na produção de biodiesel acarretará em aumento na disponibilidade e nos estoques de glicerina, com conseqüente redução em seu preço. Contudo, no Brasil ainda se observa grande variação na composição da glicerina bruta produzida nas diferentes regiões do país, especialmente quanto aos teores de glicerol (30 a 90%), umidade (0,8 a 26%), extrato etéreo (0,5 a 30%), cinzas (2,3 a 12%) e sódio (6 a 28%) (OLIVEIRA et al., 2013). A glicerina apresenta diversos destinos conhecidos, sendo utilizada na confecção de produtos na indústria cosmética, farmacêutica, têxtil e alimentícia, no entanto, em função do volume de glicerina produzido atualmente e variações em sua composição esses ramos não conseguem absorver toda glicerina produzida, podendo essa ser utilizada na alimentação de ruminantes.

Portanto, com aumento na oferta de glicerina e seu potencial uso como ingrediente na alimentação animal o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) regularizou em 2010 o uso da glicerina bruta. A partir de então o produto deve atender a um padrão mínimo: mínimo 80% de glicerol, máximo de 13% de umidade, máximo de 150 mg/kg de metanol, sódio e matéria mineral com valor máximo garantido pelo fabricante, o que pode variar em função do processo produtivo. Destaca-se ainda, a proibição do uso de glicerina proveniente da gordura animal na alimentação de ruminantes devido ao risco de ocorrência de doenças priônicas. As gliceras oriundas de óleos de mamona e de pinhão manso também estão desautorizadas em função do risco da presença de contaminantes (OLIVEIRA et al., 2011).

2.2 Glicerina e alimentação de bovinos

Na nutrição de ruminantes, inicialmente o uso da glicerina (glicerol) foi proposto como tratamento e prevenção da cetose em vacas leiteiras (JOHNSON, 1954; FISHER et al., 1973). O glicerol presente na glicerina, é importante precursor gliconeogênico amplamente conhecido por seu poder de atuar em diferentes etapas do metabolismo da

glicose (LENG, 1970). Segundo Krehbiel (2008), do glicerol consumido, 13% desaparece do rúmen acompanhando a digesta, 44% pela fermentação e 43% pela absorção através da parede ruminal. O glicerol pode ser convertido em propionato no rúmen através da fermentação microbiana e utilizado na gliconeogênese hepática (KREBS; LUND, 1966). O glicerol absorvido na parede ruminal, no fígado pela ação da enzima glicerol quinase, juntamente com ATP, é convertido em glicerol-3-fosfato e ADP para ser utilizado na glicólise ou na gliconeogênese, dependendo da condição metabólica do animal (KREHBIEL, 2008). Remond et al. (1993) afirmam que do glicerol ingerido, 39 a 69% é fermentado a ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) no rúmen de animais adaptados. No rúmen, o glicerol é rapidamente fermentado, levando ao aumento na produção total de AGCC, com alteração da relação acetato: propionato, quando este é suplementado (ABUGHAZALEH et al., 2010). Segundo Bergner et al. (1995) em seis horas mais de 90% do glicerol desaparece do rúmen, quando este está sendo utilizado em substituição de 15 a 25% do amido da dieta. Trabue et al. (2007), sugerem que 80% do glicerol desaparece após 24 horas de incubação *in vitro*. Assim, a glicerina bruta se caracteriza como um ingrediente gliconeogênico para ruminantes.

Atualmente, em ruminantes devido à presença do glicerol, a glicerina tem se caracterizado como potencial e promissora fonte energética, principalmente em substituição a fontes ricas em amido (DONKIN, 2008; DONKIN et al., 2009; TERRÉ et al., 2011). Schröder e Südekum (1999) avaliaram a inclusão de 15% de glicerina de diferentes purezas (63,3; 85,3 e 99,8% de glicerol) em substituição ao amido na dieta de novilhos, e não observaram efeitos sobre o consumo de matéria seca (13,4 kg/dia) e digestibilidade dos nutrientes. A inclusão de glicerina (0 a 16% MS) na dieta de novilhas a base de milho floculado e feno de alfafa reduziu linearmente o CMS e propiciou efeito quadrático no ganho de peso diário, sendo o maior ganho (1,34 kg) alcançado com 2% de glicerina na dieta (PARSONS et al., 2009). Porém, estes autores destacaram que a inclusão de glicerina na dieta de animais em terminação melhora o ganho de peso e eficiência alimentar, principalmente quando incluída até 8% da MS.

Em bovinos leiteiros a utilização de glicerina na alimentação tem sido avaliada em diferentes estudos. Donkin et al. (2009) avaliaram quantidades crescentes de glicerina 0, 5, 10 e 15% na MS da dieta (99,5% glicerol) e não observaram diferença no CMS e

produção de leite, com média de 24,3 e 36,9 kg/dia, respectivamente. Assim, segundo os autores a glicerina pode ser incluída na dieta em substituição ao milho em até 15% da MS sem efeitos adversos sobre a produção e composição do leite. Berry (2007) avaliou o uso da glicerina em dietas para vacas leiteiras, através dos seguintes tratamentos: sem glicerina + 37% de CNF; 5% de glicerina + 37% de CNF; 10% de glicerina + 37% de CNF; e, 10% de glicerina + 42% de CNF, e não encontrou diferença no CMS e produção de leite, com médias de 23,9 e 39,5 kg/dia, respectivamente. Ainda assim, a inclusão de glicerina nas dietas aumentou o consumo em 2 kg no tratamento com 10% de glicerina + 42% de CNF em comparação ao controle.

No Brasil, alguns estudos têm buscado avaliar os efeitos da inclusão de glicerina em substituição ao milho na dieta de vacas leiteiras. Zacaroni (2010) relatou redução na produção de leite de 23,4 para 21,3 kg/dia (controle vs glicerina) sem alterar o CMS, quando se incluiu 12,3% de glicerina bruta (76 % glicerol) em substituição ao milho na dieta de vacas leiteiras, resultando em queda na eficiência alimentar. San Vito (2010) avaliando a inclusão de glicerina em substituição ao milho (0; 33,3; 66,6 e 100%), relatou redução no CMS a partir de 33,3% de substituição (21,58 à 20,29 kg/dia), e redução na produção de leite quando utilizou 66,6% de substituição (31,14 à 28,14 kg/dia), podendo esta resposta estar relacionada a composição da glicerina utilizada (84% glicerol e 8,64% metanol), a qual associada a outros componentes da dieta (fontes protéicas e carboidratos) podem ter reduzido o CMS e a síntese de proteína microbiana. Ao avaliar a inclusão em dietas para vacas Jersey em até 12%, Wilbert et al. (2013) não observaram efeito sobre o CMS e produção de leite, podendo a glicerina substituir parcialmente o milho na dieta de vacas leiteiras.

Contudo alguns estudos tem relatados efeitos negativos da glicerina sobre CMS e a digestibilidade, especialmente da FDN, limitando sua inclusão a 10 e 15% da dieta (DONKIN et al., 2009; CARVALHO et al., 2011; SHIN et al., 2012). Abughazaleh et al. (2010) avaliaram a substituição de milho por glicerina (99,5% glicerol) em experimento *in vitro*. Segundo os autores as concentrações de DNA de *Butyrivibrio fibrisolvens* e *Selenomonas ruminantium* foram reduzidas nas dietas com 30 e 45% de substituição. *Ruminococcus albus* e *Succinivibrio dextrinosolvens* não foram alterados pelas dietas experimentais. Das quatro bactérias testadas neste estudo, duas têm importante

atividade celulolítica (*B. fibrisolvens*, *R. albus*) enquanto outras duas são importantes na degradação de amido (*S. ruminantium*, *S. dextrinosolvens*) no rúmen (TAJIMA et al., 2001; RUSSELL, 2002). De acordo com Hobson e Mann (1961), as bactérias do gênero *Selenomonas* são as mais importantes no metabolismo do glicerol. Abughazaleh et al. (2010) concluíram que dietas com substituição de até 15% não tem efeito sobre a fermentação ruminal. No entanto, outros autores relatam que altas concentrações de glicerol levam a efeitos adversos sobre as bactérias ruminais e a produção de acetato. Segundo Roger et al. (1992), em baixas concentrações (0,1 a 1%), o glicerol não tem efeito sobre o crescimento, adesão e atividade celulolítica de duas populações microbianas (*Ruminococcus flavefaciens* e *Fibrobacter succinogenes*); no entanto, numa concentração de 5% há inibição do crescimento e da atividade celulolítica, sem efeitos sobre a adesão. Ainda, estes efeitos negativos da glicerina sobre atividade celulolítica pode estar associada a redução no pH ruminal quando a glicerina substitui o milho (MACH et al., 2009; WANG et al., 2009), que pode ser atribuído a mudanças na relação acetato: propionato no rúmen.

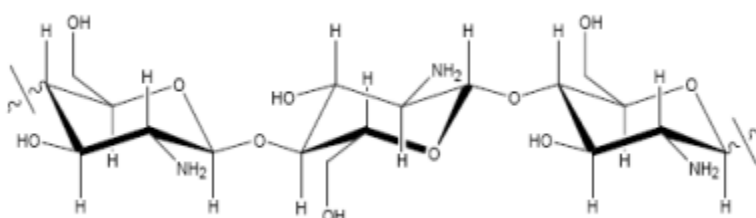
Diante do exposto acima, mais estudos *in vivo* com alta inclusão de glicerina a dieta leiteiras, especialmente, em dietas tipicamente brasileiras com silagem de milho como volumoso basal são necessários para determinar o potencial de uso da glicerina bruta em dietas para vacas leiteiras confinadas.

2.3 Caracterização da quitosana

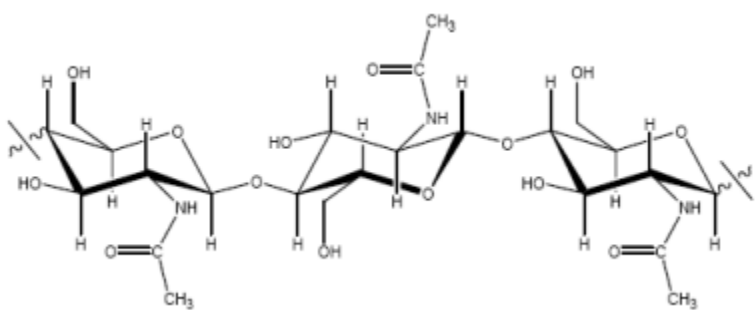
A quitosana (Figura 1a) é um polímero parcialmente desacetilado de acetilglucosamina (derivado da glicose) que é obtido após a desacetilação alcalina da quitina. A quitina é o segundo biopolímero mais abundante na natureza após a celulose, sendo um polissacarídeo encontrado como principal componente do exoesqueletos de crustáceos e insetos, como também encontrado na parede celular de bactérias e fungos. A quitosana é um polissacarídeo formado por ligações glicídicas e que se difere da celulose por possuir no carbono-2 de cada monômero um resíduo de acetamido no lugar do grupo hidroxila (SENEL; McCLURE, 2004).

Estruturalmente a quitina (Figura 1b) é semelhante à celulose (Figura 1c), substituindo-se os grupos hidroxilas do carbono-2 de cada unidade de glicose da

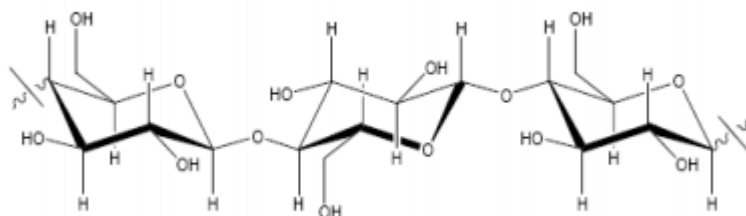
celulose por grupos acetilados (NHCOCH_3). Portanto, a quitina é um polissacarídeo linear contendo cadeias de resíduos β -(1,4)-2acetamida-2desoxi-D-glicose. E a quitosana difere da quitina, por ocorrer a desacetilação na posição do carbono-2 de cada unidade glicosídica por grupos aminos (ANTONINO, 2007). O processo de desacetilação confere a quitina e a quitosana diferentes graus de solubilidade, sendo que a quitina é insolúvel na maioria dos solventes, enquanto que a quitosana é solúvel em soluções aquosas de ácidos orgânicos e inorgânicos (GOY et al., 2004), sendo que soluções viscosas são formadas após a diluição da quitosana (SANTOS et al., 2003).



(a) Quitosana



(b) Quitina



(c) Celulose

Figura 1. Estrutura primária da (a) quitosana, (b) quitina e (c) celulose (adaptado de ANTONINO, 2007).

A quitosana vem tomando destaque nas pesquisas e aplicações (SENEL; McCLURE, 2004). O Japão e os Estados Unidos são os países que mais produzem, consomem e pesquisam sobre a quitosana (HIRANO; NAGAO, 1989). Em 1993, o Japão e os EUA foram responsáveis por 24 patentes e 84 publicações de acordo com “Chemical Abstract Citations”.

A quitosana possui uma variedade de propriedades físico-químicas e biológicas, e, portanto tem sido aplicada em várias áreas como no tratamento de água e dejetos, agricultura, fábricas de tecido, cosméticos, nutrição e processamento de alimentos. Além disso, a falta de toxicidade e de ação alergênica, a biocompatibilidade, biodegradabilidade e bioatividade fazem com que a quitosana seja uma substância atrativa em aplicações como farmacêuticas e clínicas (ILLUM, 1998; SINGLA; CHAWLA, 2001). Ainda, a quitosana tem propriedade quelante (LI et al., 1992), ligando-se de forma seletiva a substâncias como colesterol, gorduras, proteínas, células cancerígenas, e também a íons metálicos, o que tem originado sua exploração em diversas aplicações (MARTHUR; NARANG, 1990; ROBERTS, 1992; KURITA, 1986).

A quitosana tem demonstrado atividade inibitória na proliferação bacteriana no tratamento de feridas infectadas (MI et al., 2003). A atividade antimicrobiana tem sido reconhecida contra várias bactérias e fungos, e é influenciada por um número de fatores incluindo o tipo de quitosana, o grau de polimerização e algumas propriedades químicas e físicas (CHOI et al., 2001, NO et al., 2002). A quitosana normalmente exerce maior atividade microbiana contra bactérias gram-positivas do que gram-negativas, sendo que a maior atividade antimicrobiana é alcançada com baixo pH (4.5 - 5.9; SENEL; McCLURE, 2004). Em soluções ácidas, as cargas positivas da quitosana interferem com os resíduos de carga negativa de macromoléculas encontradas na superfície celular bacteriana, presumidamente por competir com íon de cálcio por sítios negativos sem conferir estabilidade dimensional, fazendo com que a membrana se rompa (BEGIN; CALSTEREN, 1999). A quitosana recebeu o *status* de segura no EUA e pode ser utilizada como uma alternativa aos antibióticos na nutrição animal.

2.4 Efeitos da quitosana na fermentação ruminal e digestibilidade de nutrientes

Os resultados de alguns estudos demonstraram que a quitosana pode interferir no metabolismo da fermentação ruminal alterando o perfil de ácidos graxos de cadeia curta em direção a uma fermentação energeticamente mais favorável com maior produção de propionato e menor produção de metano (GOIRI et al., 2009b; Goiri et al., 2010). Com isso, a partir de 2008 tem-se desenvolvido uma série de pesquisas para avaliar a inclusão de quitosana na dieta para aumentar a eficiência produtiva dos animais podendo ser uma alternativa aos antibióticos ionóforos.

Goiri et al. (2010) estudaram o efeito da quitosana sobre a fermentação ruminal de ovelhas alimentadas em dieta com proporção de volumoso:concentrado de 50:50 e encontraram menor concentração de amônia ruminal e de ácidos graxos de cadeia ramificada, maior concentração de propionato e maior valor para a razão de propionato:acetato no rúmen quando comparado a dieta controle. No entanto, os mesmos autores não encontraram alteração no CMS e digestibilidade dos nutrientes quando as ovelhas foram suplementadas com quitosana. Os autores sugeriram que a quitosana modifica o ecossistema microbiano, afetando negativamente a ação de bactérias celulolíticas modulando a fermentação ruminal. Em um ensaio com objetivo de avaliar a produção animal, Garcia-Rodríguez et al. (2011) avaliaram a inclusão de 1,2% de quitosana no concentrado de ovelhas leiteiras e observaram diminuição no CMS sem alteração na produção de leite.

Araújo (2011) avaliou doses crescentes de quitosana (0, 50, 100 e 150 mg/kg de PC), na dieta de novilhos Nelore com 60% de volumoso sobre a digestibilidade de nutrientes e fermentação ruminal. Neste estudo, a adição de quitosana não afetou o consumo de matéria seca, porém aumentou linearmente a digestibilidade da MS e da FDN. Além disso, aumentou linearmente a produção de propionato sem alteração na síntese de PB microbiana. Henry (2013) estudou o efeito de diferentes doses de quitosana em dietas com baixo e alto teor de concentrado fornecidas a novilhas sobre a ingestão de matéria seca e digestibilidade de nutrientes, porém os tratamentos não influenciaram nas variáveis mensuradas quando utilizados marcadores externos (óxido de cromo e dióxido de titânio) para estimar a excreção fecal. Neste estudo a dose máxima

utilizada foi cerca de 45 vezes menor (gramas de quitosana / kg de MS da dieta) do que utilizada por Goiri et al. (2009).

Mingoti (2013) avaliou doses crescentes de quitosana (0, 50, 100 e 150 mg/kg de PC) em uma dieta com 50% de concentrado de vacas em lactação e não observou alteração no consumo de nutrientes, no entanto, a quitosana aumentou linearmente a digestibilidade da PB. Além disso, não houve relatos de diferenças na fermentação ruminal, síntese de PB microbiana e produção de leite quando os animais foram suplementados com quitosana. Del Valle (2014) adicionou 150 mg/kg de PC de quitosana na dieta de vacas em lactação com alto teor de concentrado (50%) e observou aumento na digestibilidade de MS e de PB, com aumento da concentração de ácido propiônico no rúmen sem alteração na produção de PB microbiano. Os resultados mais recentes com quitosana corroboram com o que Goiri et al. (2009a; 2009b) sugeriram, além disso a quitosana tem constantemente aumentado a digestibilidade da PB da dieta (ARAÚJO, 2011; MINGOTI, 2013; DEL VALLE, 2014) e o motivo desse aumento parece estar ligado a um mecanismo de ação da quitosana no intestino já que os trabalhos não relataram alteração da concentração de amônia no rúmen. Assim, são necessários mais estudos *in vivo* com utilização de quitosana e seus efeitos sobre a fermentação ruminal, digestibilidade dos nutrientes e desempenho.

3. LITERATURA CITADA

ABUGHAZALEH, A.; ABO EL-NOR, S.; IBRAHIM, S. A. The effect of replacing corn with glycerol on ruminal bacteria in continuous culture fermenters. **Journal Animal Physiology and Animal Nutrition**, 95, 313–319, 2010.

ANP. Agencia Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. **Boletim mensal do biodiesel**, jan. 2015. Disponível em: <http://www.anp.gov.br>. Acesso em: 24 de fev. 2015.

ANTONINO, N. A. Otimização do processo de obtenção de quitina e quitosana de exoesqueletos de camarões oriundos da indústria pesqueira paraibana. 2007. 89 pp. Dissertação (Mestrado). Centro de Ciências Exatas da Natureza da Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2007.

ARAÚJO, A. P. Efeitos de diferentes concentrações de quitosana na dieta de novilhos Nelore. 2011. 91 pp. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Pirassununga, 2011.

ARRUDA, P. V.; RODRIGUES, R. C. L. B.; FELIPE, M. G. A. Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica. **Revista Analytica**, 26, 56-62, 2007.

BEGIN, A; CALSTEREN, M. R. V. Antimicrobial films produced from chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, 26, 63-67, 1999.

BERGNER, H.; KIJORA, C.; CERESNAKOVA, Z.; et al. In vitro studies on glycerol transformation by rumen microorganisms. **Archiv fur Tierernaehrung**, 45, 245-256, 1995.

BERRY, G. Effects of feeding glycerol with different levels of non-fiber carbohydrates. **College of Food, Agricultural, and Environmental Sciences**, The Ohio State University, 2007. Disponível em: http://kb.osu.edu/dspace/bitstream/handle/1811/25219/Gina_Berrys_Final_Research_Report.pdf?sequence= Acesso em: 07 de out. 2013.

CARVALHO, E. R.; SCHMELZ-ROBERTS, N. S.; WHITE, H. M. Replacing corn with glycerol in diets for transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, 94, 908-916, 2011.

CEPEA. Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada – Esalq/USP. **Boletim do Leite**, jan. 2015. Disponível em: <http://cepea.esalq.usp.br/>. Acesso em: 03 de mar. 2015.

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

DASARI, M. A. P.; KIATSIMKUL, P. P.; SUTTERLIN, W. R.; et al. Low pressure hydrogenolysis of glycerol to propylene glycol. **Applied Catalysis A: General**, 281, 225-231, 2005.

DEL VALLE, T. A. Quitosana associada a fonte de lipídeos na alimentação de vacas em lactação. 2014. 70 pp. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Pirassununga, 2014.

DONKIN, S. S. Glycerol from biodiesel production: the new corn for dairy cattle. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 37, 280-286, 2008.

DONKIN, S. S.; KOSER, S. L.; WHITE, H. M.; et al. Feeding value of glycerol as a replacement for corn grain in rations fed to lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, 92, 5111-5119, 2009.

FISHER, L. J.; ERFLE, J. D.; LODGE, G. A.; et al. Effects of propylene glycol or glycerol supplementation of the diet of dairy cows on feed intake, milk yield and composition, and incidence of ketosis. **Canadian Journal Animal Science**, 53, 289-296, 1973.

GARCIA-RODRIGUEZ, A.; MANDALUNIZ, N.; ARRANZ, J.; GOIRI, I. Inclusión de quitosana em la dieta de ovejas lecheras al inicio de la lactación. In: *AIDA 2011, XIV Jornadas sobre Producción Animal*, Tomo, 2011. **Anais...2011 Tomo**, 2011. P. 222-224.

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

GOIRI, I.; OREGUI, L. M.; GARCIA-RODRIGUEZ, A. Dose-response effects of chitosans on *in vitro* rumen digestion and fermentation of mixtures differing in forage-to-concentrate ratios. **Animal Feed Science and Technology**, 151, 215-227, 2009a.

Goiri, I., Oregui, L.M., Garcia-Rodriguez, A. Use of chitosans to modulate ruminal fermentation of 50:50 forage-to-concentrate diet in sheep. **Journal of Animal Science**, 88, 749-755, 2010.

GOY, R. C.; ASSIS, O. B. G.; CAMPANA-FILHO, S. P. Podrução de esferas de quitosana. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, 33, 30-34, 2004.

HENRY, D. D. Effects of feeding a natural biopolymer (chitosan) on methane emissions and performance in beef cattle. 2013. 69 pp. Dissertação (Mestrado) University of Florida. Florida, 2013.

HIRANO, S.; NAGAO, N. Effects of chitosan, pectic acid, lysozyme, and chitinase on phytopathogens. **Agricultural and Biological Chemistry**, 53, 3065-3066, 1989.

HOBSON, P. N.; MANN, S. C. The isolation of glycerol-fermenting and lipolytic bacteria from the rumen of the sheep. **Journal General Microbiology**, 25, 227-240, 1961.

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

JOHNSON, R. B. The treatment of ketosis with glycerol and propylene glycol. **Cornell Veterinarian**, 44, 6-21, 1954.

KREBS, H. A.; LUND, P. Formation of glucose from hexoses, pentoses, polyols and related substances in kidney cortex. **Biochemistry Journal**, 98, 210- 214, 1966.

KREHBIEL, C. R. Ruminal and physiological metabolism of glycerin. In: SYMPOSIUM: RUMINANT NUTRITION: GLYCERIN AS A FEED FOR RUMINANTS. 2008, Indianapolis. **Abstracts**. Disponível em: <http://www.jtmtg.org/JAM/2008/abstracts/2008-JAM-Abstracts.pdf>. 2008, n. 489, p. 392.

KURITA, K.; KOYAMA, Y.; TANAGUCHI, A. Studies on Chitin. IX. Crosslinking of Water-Soluble Chitin and Evaluation of the Products as Adsorbents for Cupric Ion. **Journal of Applied Polymer Science**, 31, 1169-1176, 1986.

LENG, R. A. Glucose synthesis in ruminants. **Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine**, 14, 241-242, 1970.

LI, Q.; DUN, E. T.; GRANDMAISON, E. W.; GOOSEN, M. F. A. Applications and properties of chitosan. **Journal Bioactive and Compatible Polymers**, 7, 370-397, 1992.

MACH, N.; BACH, A.; DEVANT, M. Effects of crude glycerin supplementation on performance and meat quality of Holstein bulls fed high-concentrate diets. **Journal of Animal Science**, 87, 632-638, 2009.

MARTHUR, N. L.; NARANG, C. K. Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals. **Journal of Chemical Education**, 67, 938-942, 1990.

MI, F. L.; WU, Y. B.; SHYU, S. S.; CHAO, A. C.; LAI, J. Y.; SU, C. C. Asymmetric chitosan membranes prepared by dry/wet phase separation: a new type of wound dressing for controlled antibacterial release. **Journal of Membrane Science**, 212, 237-254, 2003.

MINGOTI, R. D. Desempenho produtivo, digestão e metabolismo de vacas leiteiras alimentadas com diferentes concentrações de quitosana nas dietas. 2013. 109 pp. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Pirassununga, 2013.

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**, 74, 65-72, 2002.

OLIVEIRA, A. S.; OLIVEIRA, M. R. C.; SOUZA, J. G.; et al. Perspectivas na utilização de coprodutos do biodiesel na produção de bovinos de corte. In: SIMPÓSIO MATOGROSSENSE DE BOVINOCULTURA DE CORTE, 1, 2011, Cuiabá. **Anais**. Cuiabá, 2011, p. 131-150.

OLIVEIRA, J. S.; ANTONIASSI, R.; FREITAS, S. C. Composição química da glicerina produzida por usinas de biodiesel no Brasil e potencial de uso na alimentação animal. **Ciência Rural**, 43, 509-512, 2013.

PARSONS, G. L.; SHELOR, M. K.; DROUILLARD, J. S. Performance and carcass traits of finishing heifers fed crude glycerin. **Journal of Animal Science**, 87, 653-657, 2009.

PLÁ, J. A. Perspectivas do biodiesel no Brasil. **Indicadores Econômicos FEE**, 30, 179-190, 2002.

REMOND, B.; SOUDAY, E.; JOUANY, J. P. In vitro and In vivo fermentation of glycerol by rumen microbes. **Animal Feed Science and Technology**, 41, 121-132, 1993.

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

ROGER, V., FONTY, G.; ANDRE, C.; et al. Effects of glycerol on the growth, adhesion, and cellulolytic activity of rumen cellulolytic bacteria and anaerobic fungi. **Current Microbiology**, 25, 197-201, 1992.

RUSSELL, J. B. Predominant ruminal bacteria and archaea. In: RUSSELL, J. B. (Ed.). **Rumen Microbiology and its Role in Ruminant Nutrition**. Ithaca: Cornell University Press, 2002, p. 18–24.

SAN VITO, E. **Glicerina bruta na alimentação de vacas leiteiras**. Viçosa: UFV, 2010, 40p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, 2010.

SANTOS, J. E.; CAMPANA FILHO, S. P.; CAVALHEIRO E. T. G. Caracterização de Quitosanas comerciais de diferentes origens. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, 13, 242-249, 2003.

SCHRÖDER, A.; SÜDEKUM, K. H. Glycerol as a by-product of biodiesel production in diets for ruminants. In: INTERNATIONAL RAPESEED CONGRESS, 10, 1999, Canberra. **Proceedings**. Canberra: Regional Institute. 1999.

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

SHIN, J.H., WANG, D., KIM, S.C., ADESOGAN, A.T., STAPLES, C.R. Effects of feeding crude glycerin on performance and ruminal kinetics of lactating Holstein cows fed corn silage or cottonseed hull-based, low-fiber diets. **Journal of Dairy Science**, 95, 4006-4016, 2012.

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

TAJIMA, K.; AMINOV, R. I.; NAGAMINE, T. Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. **Applied Environmental Microbiology**, 67, 2766–2774, 2001.

TERRÉ, M.; NUDDA, A.; CASADO, P. The use of glycerine in rations for light lamb during the fattening period. **Animal Feed Science and Technology**, 164, 262-267, 2011.

TRABUE, S.; KENWOOD, S.; TJANDRAKUSUMA, S.; et al. Ruminal fermentation of propylene glycol and glycerol. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 55, 7043–7051, 2007.

WANG, C.; LIU, Q.; HUO, W. J.; et al. Effects of glycerol on rumen fermentation, urinary excretion of purine derivatives and feed digestibility in steers. **Livestock Science**, 121, 15-20, 2009.

WILBERT, C. A.; PRATES, E. R.; BARCELLOS, J. O. J.; et al. Crude glycerin as an alternative energy feedstuff for dairy cows. **Animal Feed Science and Thechnology**, 183, 116-123, 2013.

ZACARONI, O. F. **Resposta de vacas leiteiras à substituição de milho por glicerina bruta**. Lavras: UFLA, 2010. 43p. Dissertação (Mestrado em Veterinária), Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Lavras, 2010.

CAPÍTULO 2

O artigo a seguir está regido
conforme as normas de publicação do
Animal Feed Science and Technology, exceto o
idioma oficial de publicação e posicionamento de tabelas e figuras.

Efeitos da glicerina bruta no desempenho, digestibilidade e fermentação ruminal em vacas leiteiras alimentadas com dietas a base de silagem de milho

RESUMO: O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da inclusão de glicerina bruta em substituição ao milho grão em dietas a base de silagem de milho sobre a produção e composição do leite, consumo, digestibilidade dos nutrientes e fermentação ruminal em vacas leiteiras. Foram utilizadas 24 vacas da raça Holandesa (oito canuladas no rúmen; 184 ± 50 DEL; 594 ± 39 kg PC) distribuídas em seis Quadrados Latinos 4×4 , com períodos experimentais de 21 dias, sendo os últimos sete dias destinados a coleta de dados. As vacas foram distribuídas dentro de cada quadrado para receber uma das seguintes dietas: Controle ou 0% de glicerina/kg de MS; 70 g de glicerina/kg de MS; 140 g de glicerina/kg de MS; e, 210 g de glicerina/kg de MS em substituição ao milho grão da dieta. O consumo de matéria seca e a produção de leite reduziram quando a glicerina foi incluída até 210 g/kg MS, porém, a adição de glicerina à dieta não afetou a composição do leite. A digestibilidade total da MS, PB e EE aumentou linearmente, enquanto da FDN reduziu linearmente, especialmente na dieta contendo 210 g/kg de glicerina. A inclusão de glicerina às dietas alterou a fermentação ruminal, com aumento de propionato e butirato, e redução de acetato, resultando em menor relação acetato: propionato, principalmente quando a glicerina foi adicionada até 210 g/kg da dieta. As concentrações de AGCC não foram afetadas pela glicerina. O N-NH₃ ruminal reduziu linearmente com aumento da inclusão de glicerina. A síntese de proteína microbiana não foi alterada pela adição de glicerina à dieta. A inclusão glicerina aumentou linearmente a glicose sanguínea. Altos níveis de inclusão de glicerina (210 g/kg MS) em dietas a base de silagem de milho afetam a digestibilidade, CMS, e a produção de leite; porém, estes resultados sugerem que a glicerina pode ser adicionada até 140 g/kg MS da dieta em substituição ao milho grão para vacas no terço médio de lactação.

Palavras-chave: biocombustíveis, energia, glicerol, composição do leite

Effects of crude glycerin on lactation performance, digestibility and ruminal fermentation in dairy cows fed corn silage-based diets

ABSTRACT: The study aimed to evaluate the effects of crude glycerin in replacing corn ground in corn silage based diets on milk yield and composition, feed intake, digestibility, and ruminal fermentation in dairy cows. Twenty four Holstein cows (eight rumen cannulated; 184 ± 50 DIM; 594 ± 39 kg BW) were assigned to six 4 x 4 Latin square design, with 21-day periods and the 7 last days for sampling. Cows were assigned within each square to receive one of the following diets: Control or 0 g of glycerin/kg DM; 70 g of glycerin/kg DM; 140 g of glycerin/kg DM; and, 210 g of glycerin/kg DM in replacing corn ground of diet. Dry matter intake and milk production decreased when glycerin was added up to 210 g/kg of the diet. However, addition of glycerin did not affect milk composition. Total-tract digestibility of DM, CP and EE was linearly increased, and NDF linearly decreased, mainly in the 210 g/kg of glycerin in the diet. Feeding glycerin changed ruminal fermentation, with increased propionate and butyrate, and decreased acetate concentrations, resulting in lower acetate: propionate ratio, especially when glycerin was added up to 210 g/kg of the diet. Volatile fatty acids were not affected by glycerin. Ruminal $\text{NH}_3\text{-N}$ linearly decreased as glycerin levels increased. Microbial crude protein synthesis was not affected by glycerin inclusion in the diet. Glycerin linearly increased blood glucose. High glycerin levels (210 g/kg DM) in corn silage-based diets affected total-tract digestibility, DMI and milk production; however, our results suggest that glycerin can be added up to 140 g/kg of diet for mid-lactation dairy cows in replacement ground corn grain.

Keywords: biofuels, energy, glycerol, milk composition

1. Introdução

O crescimento da indústria do biodiesel tem aumentado a demanda por milho grão, afetando os preços e o setor de produção animal (USDA, 2014), levando a busca por fontes de alimentos alternativos para alimentação. A glicerina bruta é um valioso coproduto da indústria do biodiesel produzida por transesterificação, fabricação de sabão por saponificação bem como por reação de hidrólises (Tan et al., 2013). O glicerol purificado tem sido usado com sucesso em indústria farmacêutica, cosméticos e de alimentos (Thompson e He, 2006; Tan et al., 2013). Contudo, com o crescimento da indústria de biodiesel, a glicerina disponível pode exceder a demanda dessas indústrias. A glicerina bruta contém 800-880 g de glicerol/kg (Donkin, 2008), e o glicerol tem sido empregado como precursor gliconeogênico no início da lactação (Carvalho et al., 2011; Piantoni e Allen, 2015). Porém, apesar das evidências para uso do glicerol durante o período de transição/início de lactação, poucos estudos avaliaram a utilização de glicerina bruta como um macro-ingrediente em dietas para vacas leiteiras (Shin et al., 2012).

Uma importante característica do glicerol, principal componente da glicerina, é ser convertido a AGCC no rúmen, em especial a propionato (Rémond et al., 1993; Wang et al., 2009), ou ser absorvido pela parede ruminal e oxidado no fígado (Rémond et al., 1993) aumentando a disponibilidade de energia para o animal. Porém, recentes estudos tem mostrado aumento em propionato e butirato, as custas de redução do acetato com uso de glicerina nas dietas (Wang et al., 2009; Shin et al., 2012). Estas diferenças podem estar relacionadas a pureza e quantidade de glicerina usada na dieta, mas também a outros componentes da dieta, tais como a fonte de forragem, que podem alterar a fermentação ruminal.

Ainda, a glicerina tem sido considerada potencial fonte de energia em substituição ao amido para ruminantes (Donkin et al., 2009; Carvalho et al., 2011). Donkin et al. (2009) relataram que a glicerina (99% pureza) pode substituir o milho grão em até 15% da dieta sem efeitos negativos sobre a produção de leite. Resultados similares foram encontrados com inclusão de glicerina em até 10% da dieta de vacas leiteiras (Shin et al., 2012). Contudo, alguns estudos reportam efeitos negativos da glicerina no CMS e

digestibilidade, especialmente da FDN, limitando a inclusão de glicerina a 10 e 15% da dieta (Donkin et al., 2009; Carvalho et al., 2011; Shin et al., 2012).

Portanto, estudos avaliando a glicerina bruta como principal ingrediente energético em dietas para vacas leiteiras são escassos, especialmente acima de 100 g de glicerina/kg de dieta. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de níveis crescentes de glicerina bruta (0, 70, 140 e 210 g/kg) em substituição ao milho grão na dieta de vacas leiteiras sobre a produção e composição do leite, consumo, digestibilidade, metabólitos sanguíneos e fermentação ruminal. A hipótese científica avaliada neste estudo sugere que inclusão de glicerina bruta na dieta de vacas em lactação, pode substituir parcialmente o milho grão sem alterar o desempenho produtivo, digestão e metabolismo.

2. Material e métodos

2.1 Local, Instalações e Animais

O experimento foi conduzido no Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite (LPBL) do Departamento de Nutrição e Produção Animal (VNP) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), em Pirassununga, no período de 11 março de 2013 a 03 de junho de 2013.

A localização geográfica do LPBL é 21° 57' 28" de latitude sul, 47° 27' 21" de longitude oeste e altitude de 635 metros. O clima da região é tropical, com temperatura média durante o experimento de 21,05° C. As temperaturas máximas e mínimas registradas foram de 30,01 e 8,80° C, respectivamente. A umidade relativa do ar média foi de 79,26% e a velocidade do vento de 0,70 km/h.

Foram utilizadas 24 vacas da raça Holandesa (8 canuladas no rúmen), multíparas, com 184 ± 50 dias em lactação, peso corporal médio de 594 ± 39 kg, e produção média inicial 25,53 ± 2,61 kg de leite/dia. Os animais foram distribuídos em seis Quadrados Latinos 4 × 4, balanceados e contemporâneos. Produção de leite inicial, dias em lactação e peso corporal foram utilizados para alocar os animais aos quadrados. Cada período experimental teve a duração de 21 dias, sendo os 14 primeiros de adaptação às dietas e os demais destinados à coleta de dados. Os animais foram alojados em estábulo tipo

“free-stall”, com ventilação forçada, em baias individuais de 17,5 m² de área providas de camas de areia e livre acesso a água.

2.2 Dietas Experimentais, Coletas e Análises de Alimentos

As vacas foram distribuídas em cada quadrado para receber uma das seguintes dietas experimentais, formuladas de acordo com NRC (2001): 1) controle ou 0 g de glicerina/kg MS (sem adição de glicerina); 2) 70 g de glicerina/kg MS; 3) 140 g de glicerina/kg de MS; e, 4) 210 g de glicerina/kg de MS em substituição ao milho grão da dieta (Tabela 1). A glicerina bruta utilizada neste experimento continha 806 g de glicerol/kg, 0,026% de metanol, 63 g de cinzas e 124,6 g água e foi adquirida de uma indústria de produção de biodiesel a partir de óleo de soja (ADM, Rondonópolis, Brasil; Apêndice 1). A glicerina foi misturada ao concentrado produzido semanalmente, e o mesmo foi armazenado em sacaria comum até sua utilização. As vacas foram alimentadas duas vezes ao dia, às 07:00 e às 13:00 h, com dietas em relação volumoso: concentrado 50:50, com silagem milho (42% de espiga em relação a planta inteira) como fonte de volumoso de maneira a permitir de 5 a 10% de sobras. Diariamente o concentrado foi pesado e misturado manualmente ao volumoso nos horários de fornecimento das dietas. O consumo de alimento foi mensurado diariamente pela diferença entre quantidade de dieta fornecida e de sobras.

Do 15° ao 21° dia de cada período, amostras individuais de ingredientes e sobras de cada vaca foram coletadas, perfazendo uma amostra composta e armazenadas -20° C até as análises. Amostras de ingredientes e sobras foram secas em estufa de ventilação forçada à 55° C por 72 h, moídas em moinho de facas tipo Willey (Marconi® - MOD - 0.48) com peneiras de 1 mm de crivo e então analisadas quanto aos teores de matéria seca (MS; 930.15; AOAC, 2000), proteína bruta (CP; N x 6.25; 984.13; AOAC, 2000), extrato etéreo (EE; 920.39; AOAC, 2000) e cinzas (942.05; AOAC, 2000). Os teores de fibra em detergente neutro (FDN) foram determinados de acordo com Mertens (2002), usando α -amilase e sem adição de sulfato de sódio ao detergente em sistema Ankon® (Ankom Tech. Corp., Fairport, NY).

Tabela 1 – Ingredientes e composição das dietas experimentais

| Item, g/kg de MS | Inclusão de glicerina, g/kg de MS | | | |
|--|-----------------------------------|--------|--------|--------|
| | 0 | 70 | 140 | 210 |
| Silagem de milho ¹ | 501,40 | 500,30 | 505,90 | 504,00 |
| Milho moído | 300,50 | 219,20 | 125,10 | 45,00 |
| Farelo de soja | 162,10 | 174,60 | 192,80 | 204,80 |
| Glicerina bruta | 0,00 | 69,90 | 140,20 | 210,20 |
| Ureia | 5,30 | 5,30 | 5,30 | 5,30 |
| Sulfato de amônia | 0,90 | 0,90 | 0,90 | 0,90 |
| Mistura mineral ² | 29,80 | 29,80 | 29,80 | 29,80 |
| <i>Composição</i> | | | | |
| Matéria seca | 586,4 | 587,6 | 585,0 | 586,6 |
| Proteína bruta | 162,3 | 160,7 | 161,2 | 159,5 |
| Fibra em detergente neutro | 301,1 | 290,5 | 281,9 | 271,0 |
| Carboidratos não fibrosos ³ | 455,7 | 464,1 | 468,1 | 468,1 |
| Extrato etéreo | 31,1 | 31,2 | 31,0 | 31,2 |
| Cinzas | 66,3 | 70,1 | 74,3 | 78,0 |

¹ Composição: 293,0 g de MS; 70,5 g de PB; 556,7 g de FDN; 29,7 g de EE and 38,6 g de cinzas.

² Contém por kg: 88,0 g de Ca; 42,0 g de P; 18,0 g de S; 45,0 g de Mg; 123,0 g de Na; 14,0 mg de Co; 500,0 mg de Cu; 20,0 mg de Cr; 1050,0 mg de Fe; 28,0 mg de I; 1400,0 mg de Mn; 18,0 mg de Se; 2800,0 mg de Zn; 80,0 mg de Biotina; 200.000,00 UI Vit A; 40.000,00 UI Vit D; 1.200,00 UI Vit E.

³ CNF= 100 – ([PB - PB da ureia + % ureia] + FDN + EE + Cinzas); Hall (2000).

Do 16º ao 18º dia de cada período, amostras de fezes foram coletadas em cada animal duas vezes ao dia, perfazendo uma amostra composta por vaca. A fibra em detergente ácido indigestível (FDAi) foi utilizada como marcador para estimativa da excreção fecal e digestibilidade dos nutrientes. Amostras de ingredientes, sobras e fezes foram secas em estufa de ventilação forçada à 55°C por 72 h, moídas em moinho de facas tipo Willey (Marconi® - MOD - 0.48) com peneiras de 2 mm de crivo. Estas amostras foram então pesadas em *bags* de tecido não-tecido (100 g/m²) seguindo a

recomendação de no máximo 20 mg de MS/cm² (Nocek, 1988) e então incubadas por 264 h no rúmen de duas vacas da raça Holandesa previamente adaptadas de acordo com técnica descrita por Casali et al. (2008). Após a retirada do rúmen, os *bags* foram lavados em água corrente, secos em estufa de ventilação forçada à 55°C e submetidos a tratamento em solução detergente ácido para determinar a concentração de FDAi (973.18; AOAC, 2000). A digestibilidade dos nutrientes foi calculada pela relação de FDAi consumido (corrigido para sobras) e fezes.

2.3 Produção e Composição do Leite

Os animais foram ordenhados duas vezes ao dia, às 06:00 e às 16:00 h e a produção de leite registrada eletronicamente (Alpro®, DeLaval – Tumba, Sweden). Do 16º ao 18º dia de cada período, amostras proporcionais às duas ordenhas diárias foram coletadas e analisadas a fresco para proteína, gordura e lactose (Milkoscan; Foss Electric, Hillerod - Denmark). A produção de leite foi corrigida para 3,5% de gordura de acordo com Sklam et al. (1992).

2.4 Escore de Condição Corporal e Peso

O escore de condição corporal (ECC) e peso foram avaliados no sétimo e último dia de cada período. O ECC foi avaliado por 2 técnicos treinados utilizando sistema de 1-5 pontos de acordo com Wildman et al. (1982). Peso corporal foi mensurado após ordenha da manhã (Brete ME 2.80; Coimma®, Dracena - Brasil).

2.5 Parâmetros Sanguíneos

Amostras de sangue foram coletadas no 15º dia de cada período, por punção da veia coccígea em tubos com vácuo (vacutainer®) antes da alimentação da manhã. Amostras de sangue foram centrifugadas à 3000 × g por 10 min e o plasma separado e armazenado a -20°C até as análises. As análises foram realizadas utilizando kits comerciais (Glicose: cat. no. K-082; Ureia: cat. no. K-056; AST: cat. no. K-048; GGT: cat. no. K-080; Bioclin, Belo Horizonte, Brasil), e as leituras realizadas em analisador automático (SBA 200, CELM, São Caetano do Sul, Brasil).

2.6 Balanço de Nitrogênio e Síntese de Proteína Microbiana

No 16º e 17º de dia de cada período, amostras *spot* de urina foram coletadas de cada vaca 4 h após alimentação da manhã. As amostras de urina foram filtradas e sub-amostras de 10 mL foram diluídas em 40 mL de ácido sulfúrico e armazenadas à -20°C para análises de ácido úrico e alantoína. Amostras de urina pura foram armazenadas para determinação de N total e creatinina. As concentrações de ácido úrico e creatinina foram determinadas com uso de kits comerciais (Ácido úrico líquido estável: cat. no. k-052; Creatinina cinética: cat.no. K-067; Bioclin). O volume de urina foi estimado a partir das excreções diárias de creatinina, como 24,05 mg/kg de PC (Chizzotti et al., 2008) e das concentrações de creatinina na amostra *spot* (Volume de urina = $PC \times 24,05 / \text{Creatinina na amostra } spot$). As excreções de ácido úrico na urina, e alantoína na urina e leite foram determinados por método colorimétrico (Fujihara e Yamaguchi, 1978), considerados como sendo a excreção total de derivados de purina e a síntese de proteína microbiana estimada a partir dessas concentrações de acordo com Chen e Gomes (1992). A eficiência de síntese microbiana foi expressa como gramas de N microbiano/kg de MO digestível fermentada no rúmen (MODR: calculado como MO consumida \times 0,65; ARC, 1984). O nitrogênio total nas amostras de urina foi determinado (984.13; AOAC, 2000), e o balanço obtido pela diferença entre N consumido e excretado nas fezes e urina, e secretado no leite.

2.7 Fermentação Ruminal

Para avaliação dos parâmetros da fermentação ruminal foram utilizadas 8 vacas canuladas no rúmen distribuídas em dois quadrados latinos. No 20º dia de cada período, amostras de líquido ruminal foram coletadas nas áreas cranial, ventral e caudal do rúmen em 7 tempos: 0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 h após alimentação da manhã. O pH ruminal foi imediatamente determinado com uso de peagâmetro (MB-10, Marte Científica, Santa Rita do Sapucaí, Brasil). Após, amostras de fluído ruminal (50 mL) foram centrifugadas a 7000 \times g por 15 min, e uma sub-amostra de 2 mL de sobrenadante foi misturado com 0,4 mL de ácido fórmico PA e armazenadas à -20°C para análise de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). Outros 2 mL de sobrenadante foram adicionado de 1mL de ácido sulfúrico (1 N) e armazenadas à -20°C para determinação de nitrogênio amoniacal (N-

NH₃) pelo método fenol-hipoclorito (Broderick e Kang, 1980). As concentrações de AGCC no fluido ruminal foram mensuradas em cromatógrafo a gás (GC-2014, Shimadzu, Tokyo, Japão) equipado com coluna capilar (Stabiliwax; Restek, Bellefonte, EUA) de acordo com método descrito por Erwin et al. (1961) e adaptado por Getachew et al. (2002). As amostras foram descongeladas à temperatura ambiente e centrifugadas a 14500 × g à 4°C por 10 min, e o sobrenadante (1 mL) foi transferido para um frasco seco e limpo contendo 100 µL do padrão interno (ácido 2-etil-butírico 100 mM, Chemservice, USA). Hélio foi utilizado como gás de arraste (vazão 8,01 mL/min), o ar sintético como comburente (vazão 40 kPa) e o hidrogênio como combustível (vazão 60 kPa). A temperatura de operação utilizadas do injetor split/splitless e do detector de ionização de chamas foram de 250°C e da coluna de 145°C. O padrão externo foi preparado com ácidos acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico e valérico (Chemservice, USA). O software GCSolution (Shimadzu, Japão) foi utilizado para cálculo das concentrações de AGCC.

2.8 Análises Estatísticas

Os dados foram analisados com PROC MIXED (Statistical Analysis System for Windows 9.0 - SAS - SAS Institute Inc., Cary, USA), de acordo com seguinte modelo:

$$Y_{iklm} = \mu + T_i + P_k + S_l + A_m(S_l) + e_{ijklm}$$

onde: Y_{iklm} é o valor observado no animal m , do l quadrado, no k^{th} período, recebendo i^{th} nível de glicerina; μ = média geral; T_i = efeito fixo do nível de glicerina (3 GL); P_k = efeito fixo de período (3 GL); S_l = efeito fixo de quadrado (5 GL); $A_m(S_l)$ = efeito aleatório de animal dentro de quadrado (18 GL), e e_{ijklm} = erro residual. As variáveis de fermentação ruminal (pH, NH₃-N, e AGCC) foram analisados como medidas repetidas no PROC MIXED do SAS 9.0, considerando no modelo estatístico os efeitos de animal, período, quadrado, tratamento (nível de glicerina), além dos efeitos de tempo e suas interações com os tratamentos. Estruturas de covariância testadas incluem CS, CSH, UNIV, TOEP, TOEPH, AR (1) e ARH (1). A metodologia de Akaike foi utilizada para determinar a matriz de covariância a ser utilizada. Resultados são reportados como média dos quadrados mínimos. Respostas ao nível de glicerina foram testadas com contrastes linear e quadrático, considerados significantes a $P < 0,05$. Comparações

múltiplas também foram feitas utilizando teste de Tukey ajustado quando os contrastes linear e quadrático foram significativos.

3. Resultados

3.1 Consumo de Matéria Seca e Digestibilidade dos Nutrientes

A inclusão de glicerina as dietas mostrou efeito linear decrescente no CMS ($P<0,05$), seja em valor absoluto ou relativo ao PC (Tabela 2), especialmente quando a glicerina foi adicionada até 210 g/kg da dieta comparados pelo teste de médias. Digestibilidade aparente total da MS, PB e EE aumentou linearmente ($P<0,05$), enquanto a digestibilidade da FDN reduziu linearmente ($P<0,05$) quando a inclusão de glicerina alcançou 210 g/kg MS.

Tabela 2 – Efeitos da glicerina bruta no consumo e digestibilidade dos nutrientes em vacas leiteiras

| Item | Inclusão de glicerina, g/kg de MS | | | | EPM ¹ | P-valor ² | |
|-------------------------------|-----------------------------------|---------------------|--------------------|--------------------|------------------|----------------------|-------|
| | 0 | 70 | 140 | 210 | | LIN | QUA |
| CMS, kg/d | 21,97 | 21,97 | 21,42 | 21,06 | 0,32 | 0,041 | 0,731 |
| CMS, %PC | 3,54 ^a | 3,63 ^a | 3,49 ^{ab} | 3,37 ^b | 0,05 | 0,011 | 0,072 |
| <i>Digestibilidade (g/kg)</i> | | | | | | | |
| Matéria seca | 0,696 ^b | 0,703 ^b | 0,717 ^a | 0,724 ^a | 0,003 | <0,001 | 0,847 |
| Proteína bruta | 0,734 ^c | 0,736 ^c | 0,755 ^b | 0,772 ^a | 0,003 | <0,001 | 0,160 |
| Extrato etéreo | 0,729 ^c | 0,761 ^b | 0,841 ^a | 0,869 ^a | 0,008 | <0,001 | 0,815 |
| Fibra em detergente neutro | 0,599 ^a | 0,580 ^{ab} | 0,571 ^b | 0,543 ^c | 0,005 | <0,001 | 0,710 |

^{a,d} Médias com diferentes letras dentro da mesma linha diferem pelo teste de Tukey ($P<0,05$).

¹ Erro padrão da média.

² Efeitos dos contrastes linear (LIN) e quadrático (QUA).

3.2 Fermentação Ruminal

Houve uma interação dieta×tempo para pH ruminal ($P<0,05$; Tabela 3); o que resultou em menores valores no pH ruminal no tempo 2 para dietas contendo 140 e 210 g/kg de glicerina ($P<0,05$), e menor valor para dieta controle 8 h após alimentação da

manhã ($P < 0,05$; Figura 1). As concentrações de $N-NH_3$ ruminal reduziram linearmente ($P < 0,05$), em especial quando inclusão de glicerina alcançou 140 g/kg MS.

A concentração total de AGCC não foi alterada pelas dietas ($P > 0,05$; Tabela 3). Porém, as concentrações de acetato e isobutirato reduziram linearmente ($P < 0,05$), enquanto propionato aumentou linearmente ($P < 0,05$), principalmente quando a glicerina foi adicionada até 210 g/kg de MS. Houve uma interação dieta \times tempo nas concentrações de butirato e valerato, e para relação acetato: propionato ($P < 0,05$). Houve aumento nas concentrações de butirato nos tempos 2, 4, 6, 8, 10 e 12 h após a alimentação da manhã com inclusão de glicerina as dietas quando comparado a dieta controle ($P < 0,05$; Figura 2). A inclusão de glicerina as dietas promoveu aumento nas concentrações de valerato nos tempos 0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 h comparado a dieta controle ($P < 0,05$; Figura 3), principalmente quando a glicerina foi adicionada até 210 g/kg de MS. Houve uma redução na relação acetato: propionato nos tempos 2, 4, 6, 8, 10 e 12 h após a alimentação da manhã com adição de glicerina as dietas ($P < 0,05$; Figura 4), principalmente na dieta contendo 210 g/kg de glicerina. A inclusão de glicerina as dietas não afetou as concentrações de isovalerato ($P > 0,05$; Tabela 3).

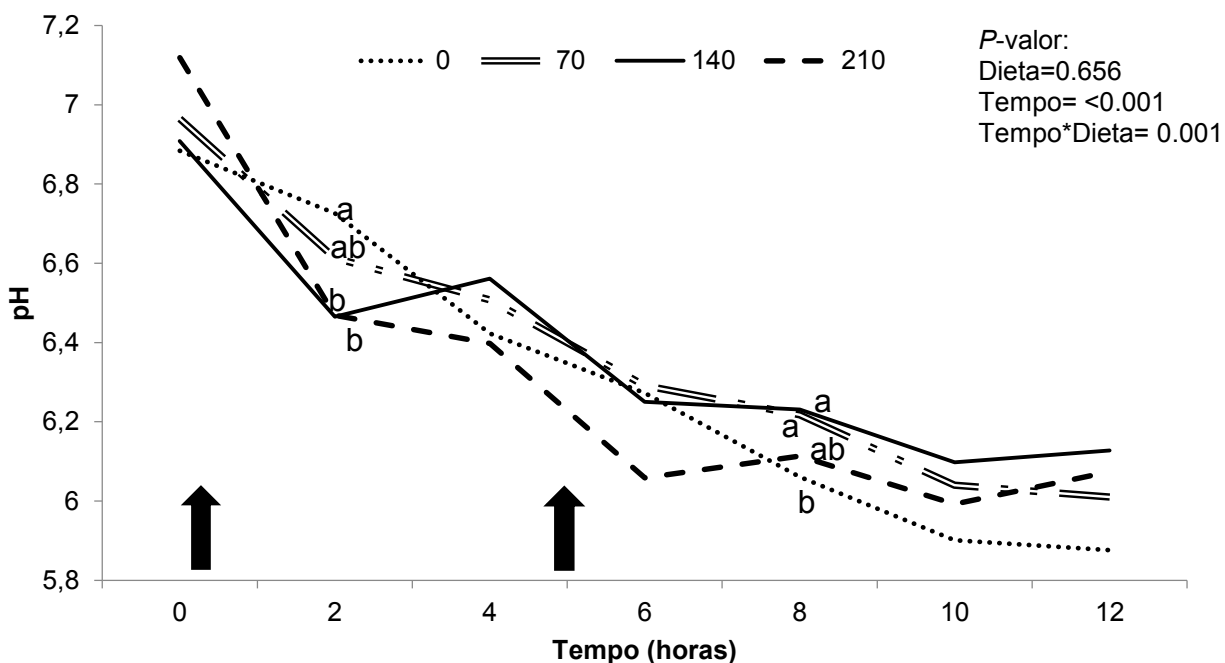


Figura 1 – Efeitos da glicerina bruta sobre pH ruminal em diferentes tempos pós-alimentação da manhã (↑ horário de alimentação). ^{a, d} Médias com diferentes letras dentro de cada tempo diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Tabela 3 – Efeitos da glicerina bruta sobre a fermentação ruminal de vacas leiteiras

| Item | Inclusão de glicerina, g/kg de MS | | | | EPM ¹ | P-valor ² | | | | |
|---------------------------|-----------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|------------------|----------------------|--------|-------------|--------|--------|
| | 0 | 70 | 140 | 210 | | Dieta | Tempo | Dieta*Tempo | LIN | QUAD |
| pH | 6,31 | 6,38 | 6,38 | 6,32 | 0,03 | 0,656 | <0,001 | 0,001 | 0,885 | 0,219 |
| N-NH ₃ , mg/dL | 23,74 ^a | 21,52 ^a | 18,05 ^b | 17,54 ^b | 0,49 | 0,001 | <0,001 | 0,197 | <0,001 | 0,392 |
| AGCC total, mM | 119,11 | 111,40 | 108,16 | 113,87 | 2,26 | 0,411 | <0,001 | 0,850 | 0,368 | 0,161 |
| Acetato, mM | 74,37 ^a | 58,82 ^b | 55,37 ^b | 53,12 ^b | 1,42 | <0,001 | 0,041 | 0,444 | <0,001 | 0,059 |
| Propionato, mM | 24,76 ^a | 25,11 ^a | 27,06 ^a | 33,68 ^b | 0,74 | <0,001 | <0,001 | 0,098 | <0,001 | 0,057 |
| Butirato, mM | 14,27 | 21,16 | 20,21 | 19,46 | 0,44 | <0,001 | <0,001 | 0,001 | 0,001 | <0,001 |
| Valerato, mM | 1,85 | 2,74 | 3,21 | 3,79 | 0,09 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | 0,300 |
| Isobutirato, mM | 1,40 ^a | 1,30 ^{ab} | 1,13 ^b | 1,16 ^b | 0,03 | <0,001 | 0,122 | 0,383 | <0,001 | 0,187 |
| Isovalerato, mM | 2,47 ^a | 2,27 ^{ab} | 2,12 ^b | 2,02 ^c | 0,05 | 0,154 | 0,001 | 0,435 | 0,027 | 0,729 |
| C2:C3 ³ | 3,05 | 2,39 | 2,21 | 1,73 | 0,05 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | 0,199 |

^{a, d} Médias com diferentes letras dentro da mesma linha diferem pelo teste de Tukey (P<0,05).

¹ Erro padrão da média.

² Efeitos dos tratamentos (Dieta), Tempo, Interação Dieta × Tempo, e contrastes linear (LIN) e quadrático (QUA).

³ Relação acetato: propionato.

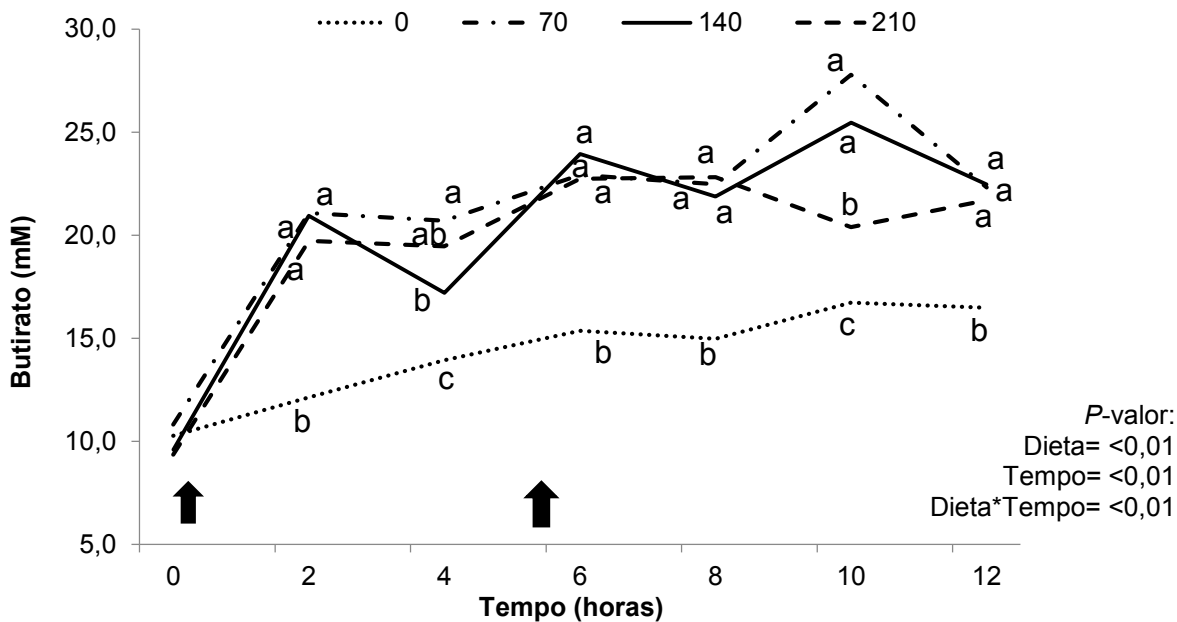


Figura 2 - Efeitos da glicerina bruta sobre as concentrações de butirato em diferentes tempos pós-alimentação da manhã (↑ horário de alimentação). ^{a, d} Médias com diferentes letras dentro de cada tempo diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

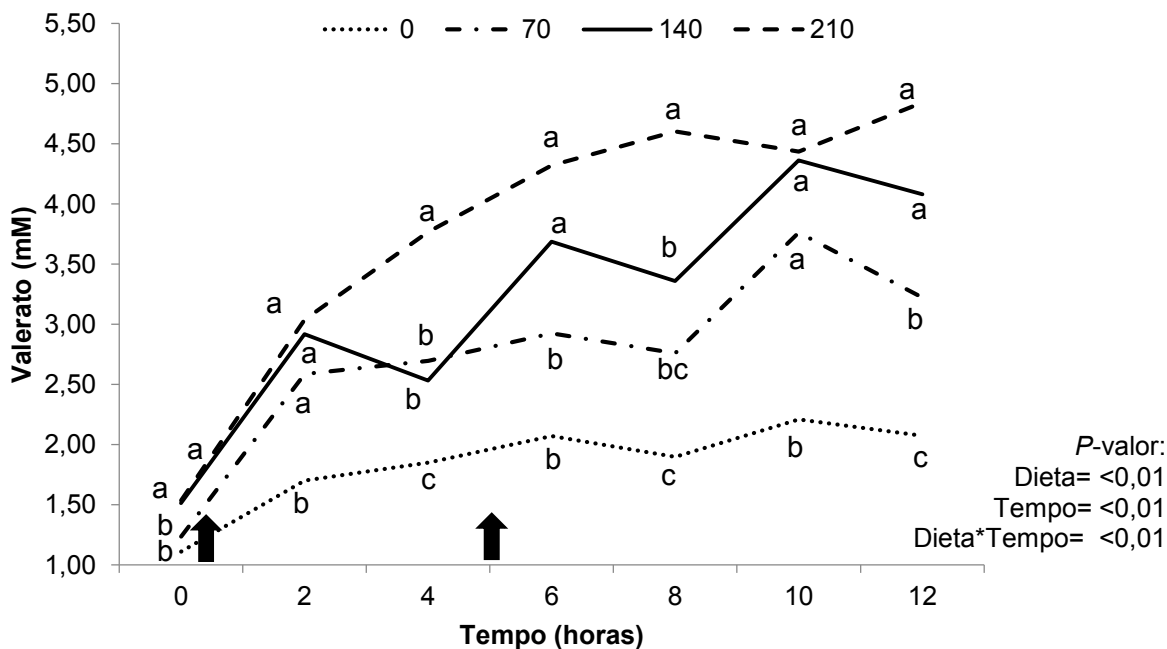


Figura 3 - Efeitos da glicerina bruta sobre as concentrações de valerato em diferentes tempos pós-alimentação da manhã (↑ horário de alimentação). ^{a, d} Médias com diferentes letras dentro de cada tempo diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

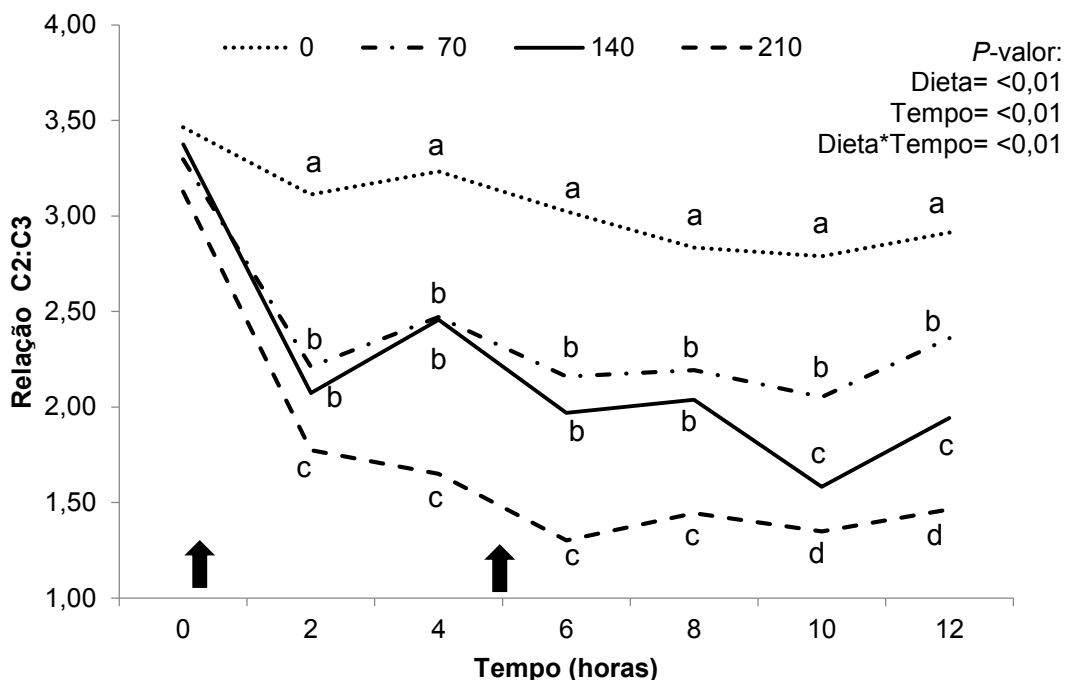


Figura 4 - Efeitos da glicerina bruta sobre a relação acetato:propionato em diferentes tempos pós-alimentação da manhã (↑ horário de alimentação). ^{a, d} Médias com diferentes letras dentro de cada tempo diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

3.3 Metabólitos Sanguíneos, Balanço de Nitrogênio e Síntese Microbiana

As concentrações de glicose aumentaram linearmente ($P < 0,05$), em especial a partir da inclusão de 70 g de glicerina/kg MS (Tabela 4). A adição de glicerina proporcionou efeito quadrático na ureia sanguínea ($P < 0,05$), com menores valores em dietas contendo 70 e 140 g de glicerina/kg MS quando comparados pelo teste de médias. Contudo, as concentrações de AST e GGT foram similar entre as dietas ($P > 0,05$).

Consumo de N, N na urina, N nas fezes, N no leite e eficiência uso de N foram reduzidas linearmente ($P < 0,05$; Tabela 4), especialmente quando a glicerina foi adicionada em 210 g/kg MS. O nitrogênio microbiano e eficiência de síntese microbiana foi similar entre as dietas ($P > 0,05$).

Tabela 4 – Efeitos da glicerina bruta nos metabólitos sanguíneos, balanço de nitrogênio e síntese de proteína microbiana em vacas leiteiras

| Item | Inclusão de glicerina, g/kg de MS | | | | EPM ¹ | P-valor ² | |
|-------------------------------|-----------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|------------------|----------------------|-------|
| | 0 | 70 | 140 | 210 | | LIN | QUA |
| <i>Metabólitos sanguíneos</i> | | | | | | | |
| Glicose, mg/dL | 78,84 ^b | 83,93 ^a | 83,96 ^a | 86,40 ^a | 0,74 | <0,001 | 0,303 |
| Ureia, mg/dL | 36,95 ^a | 32,50 ^b | 32,26 ^b | 33,36 ^{ab} | 0,76 | 0,131 | 0,011 |
| AST, ³ U/L | 63,91 | 62,68 | 61,07 | 60,41 | 1,12 | 0,092 | 0,592 |
| GGT, ⁴ U/L | 29,77 | 30,23 | 29,59 | 32,24 | 0,83 | 0,081 | 0,195 |
| <i>Balanço de Nitrogênio</i> | | | | | | | |
| N consumido, g/d | 584,19 | 587,50 | 575,15 | 559,05 | 8,59 | 0,039 | 0,301 |
| N urina, g/d | 193,25 ^a | 189,65 ^a | 163,95 ^b | 169,73 ^b | 4,52 | 0,002 | 0,491 |
| N fecal, g/d | 158,23 ^a | 155,47 ^a | 139,34 ^b | 127,38 ^c | 3,21 | <0,001 | 0,227 |
| N leite, g/d | 136,52 ^a | 126,78 ^b | 130,15 ^b | 121,38 ^c | 2,51 | <0,001 | 0,831 |
| Eficiência ⁵ | 23,69 ^a | 22,00 ^b | 22,48 ^b | 22,08 ^b | 0,41 | 0,001 | 0,145 |
| N microbiano, g/d | 391,43 | 386,47 | 370,88 | 371,68 | 10,81 | 0,201 | 0,578 |
| Eficiência ⁶ | 43,08 | 40,59 | 39,00 | 39,82 | 1,20 | 0,155 | 0,358 |

^{a,b,c} Médias com diferentes letras dentro da mesma linha diferem pelo teste de Tukey (P<0,05).

¹ Erro padrão da média.

² Efeitos dos contrastes linear (LIN) e quadrático (QUA).

³ AST= aspartato aminotransferase.

⁴ GGT= gamma-glutamil transferase.

⁵ Eficiência de uso do N = 100 × N no leite (g/d) / N consumido (g/d).

⁶ Eficiência = g N microbiano/kg de MODR.

3.4 Produção e Composição do Leite

A inclusão de glicerina as dietas promoveu redução linear na produção de leite, PLC, eficiência (PLC:CMS), e nas produções de gordura, proteína e lactose (P<0,05; Tabela 5), principalmente quando a glicerina foi adicionada em 210 g/kg MS comparada pelo teste de médias. No entanto, as proporções de gordura, proteína e lactose, e ECC foi similar entre as dietas (P>0,05).

Tabela 5 – Efeitos da glicerina bruta sobre produção e composição do leite

| Item | Inclusão de glicerina, g/kg de MS | | | | EPM ¹ | <i>P</i> -valor ² | |
|------------------------------|-----------------------------------|---------------------|--------------------|--------------------|------------------|------------------------------|-------|
| | 0 | 70 | 140 | 210 | | LIN | QUA |
| Produção de leite, kg/d | 27,74 ^a | 26,19 ^{ab} | 26,43 ^a | 24,64 ^b | 0,51 | <0,001 | 0,810 |
| PLC 3,5 %, kg/d ³ | 31,74 ^a | 30,24 ^a | 30,30 ^a | 27,89 ^b | 0,52 | <0,001 | 0,426 |
| Gordura, kg/d | 1,21 ^a | 1,16 ^a | 1,17 ^a | 1,06 ^b | 0,02 | <0,001 | 0,348 |
| Proteína, kg/d | 0,87 ^a | 0,82 ^{ab} | 0,83 ^{ab} | 0,78 ^b | 0,02 | <0,001 | 0,955 |
| Lactose, kg/d | 1,31 ^a | 1,21 ^b | 1,24 ^b | 1,16 ^c | 0,02 | <0,001 | 0,735 |
| <i>Composição</i> | | | | | | | |
| Gordura, g/kg | 44,07 | 44,70 | 44,31 | 43,60 | 0,60 | 0,592 | 0,377 |
| Proteína, g/kg | 31,41 | 31,38 | 31,40 | 31,52 | 0,12 | 0,524 | 0,523 |
| Lactose, g/kg | 47,10 | 47,04 | 47,00 | 47,17 | 0,17 | 0,751 | 0,471 |
| PLC:CMS ⁴ | 1,49 ^a | 1,38 ^b | 1,42 ^{ab} | 1,33 ^c | 0,03 | <0,001 | 0,855 |
| ECC ⁵ | 2,77 | 2,76 | 2,79 | 2,79 | 0,30 | 0,161 | 0,648 |

^{a,d} Médias com diferentes letras dentro da mesma linha diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

¹ Erro padrão da média.

² Efeitos dos contrastes linear (LIN) e quadrático (QUA).

³ PLC 3,5% = $(0,432 + 0,165 \times \% G)$ kg de leite (Sklan et al., 1992).

⁴ PLC:CMS = kg de leite/kg MS consumido

⁵ ECC = escore de condição corporal em escala de 1-5 pontos de acordo com Wildman et al. (1982).

4. Discussão

Atualmente, o crescimento na indústria do biodiesel tem levado ao aumento na disponibilidade de glicerina bruta, um co-produto com potencial para substituir fontes de amido em dietas para vacas leiteiras. No presente estudo foi observado uma redução no CMS com adição de glicerina as dietas, especialmente quando a inclusão chegou à 210 g de glicerina/kg MS. Ezequiel et al. (2015) relataram 15% de redução no CMS em vacas leiteiras alimentadas com dietas contendo 30% de glicerina/MS comparado a dieta controle. Os efeitos negativos da glicerina bruta no metabolismo e desempenho animal podem ser atribuídos a três fatores: a qualidade da glicerina bruta, devido as impurezas como methanol e minerais (Thompson e He, 2006; Chung et al., 2007); a velocidade com

que o glicerol é fermentado no rúmen (Rémond et al., 1993; Wang et al., 2009; Shin et al., 2012) e sua capacidade de ser absorvido através da parede ruminal para oxidação no fígado (Rémond et al., 1993; Krehbiel, 2008). Ezequiel et al. (2015) mostraram que dietas contendo 30% de glicerina bruta levaram a aumento de 500% na concentração de NaCl na dieta e reduziu o CMS em vacas leiteiras. Além disso, altos níveis dietéticos de minerais e sódio podem resultar em desbalanço eletrolítico e afetar a palatabilidade de dietas contendo glicerina bruta (Chung et al., 2007; Dasari, 2007). Por outro lado, a glicerina bruta contém alto valor energético que podem influenciar as reações de oxidação e intermediários do ciclo de krebs no fígado, estimulando a saciedade e diminuindo o CMS (Benson et al., 2002; Trabue et al., 2007; Allen et al., 2009).

A digestibilidade aparente total da MS, PB e EE foi aumentada quando a glicerina foi adicionada a dieta. Estes resultados estão de acordo com estudo de Donkin et al. (2009), que reportaram aumento na digestibilidade da MS quando a glicerina foi adicionada até 15% da dieta; embora, outros estudos não demonstrem efeitos da glicerina sobre a digestibilidade da MS (Wilbert et al., 2012; Shin et al., 2012; Boyd et al., 2013). Contudo, no presente estudo altos níveis de glicerina tiveram efeito negativo na digestibilidade da FDN. Estudos *in vitro*, mostram que o glicerol inibe a atividade e crescimento de bactérias celulóticas (Roger et al., 1992; Abo El Nor et al., 2010), que pode refletir nos efeitos negativos da glicerina sobre a digestibilidade da FDN. Abo El Nor et al. (2010) e Abughazaleh et al. (2011) relataram redução na população de *Butyrivibrio fibrisolvens* quando a glicerina foi adicionada até 7% da dieta. Outros estudos *in vivo* também mostram redução na digestibilidade da FDN com inclusões de glicerina até 15% da MS (Donkin et al., 2009; Shin et al., 2012). Além disso, neste estudo a redução na digestibilidade da FDN pode estar associada com mudanças no pH ruminal, propionato e acetato sugerindo efeitos da glicerina sobre microrganismos ruminais.

A adição de glicerina as dietas alterou a fermentação ruminal. Redução no pH ruminal é esperada quando fontes de energia mais facilmente digestível são utilizadas na dieta. A inclusão de glicerina às dietas reduziu (Mach et al., 2009; Wang et al., 2009), ou não afetou o pH ruminal (Carvalho et al., 2011; Kass et al., 2012; Shin et al., 2012). Neste estudo, o menor pH ruminal em alguns tempos de amostragem pode estar associado com aumento de propionato e redução de acetato com adição de glicerina as

dietas, indicando que a degradação da glicerina no rúmen foi provavelmente mais rápida que das fontes de amido. Estes resultados são similares àqueles relatados em outros estudos, com redução nas concentrações de acetato e aumento em propionato, butirato e valerato quando a glicerina foi incluída à dieta de vacas leiteiras (Carvalho et al., 2011; Kass et al., 2009; Shin et al., 2012). Segundo Krehbiel (2008), o glicerol desaparece do rúmen por fermentação, absorção através da parede ruminal e passagem com a digesta. Além disso, 39 a 69% do glicerol consumido é fermentado a AGCC, principalmente a propionato (Rémond et al., 1993); o que explicaria aumento na disponibilidade de propionato no rúmen de vacas alimentadas com dietas contendo glicerina.

A inclusão de glicerina às dietas não afetou o total de AGCC no rúmen, similar a outros estudos com vacas leiteiras (Carvalho et al., 2011; Kass et al., 2009; Shin et al., 2012). Mudanças nos AGCC estão normalmente associadas a alterações em microrganismos ruminais. No rúmen, o glicerol é metabolizado por *Megasphaera elsdenii*, *Streptococcus bovis* e *Selenomas ruminantium* (Stewart et al., 1997). *Selenomas ruminantium* convertem o succinato produzido por outros microrganismos a propionato (Wolin et al., 1997). *Megasphaera elsdenii* é associada com aumentos nas concentrações de butirato, sendo uma bactéria chave para utilização de ácido láctico no rúmen (Klieve et al., 2003), e tem o propionato como principal produto final de fermentação (Shin et al., 2012). Assim, altas inclusões de glicerina podem alterar a população de microrganismos ruminais e o perfil de AGCC, com aumento em propionato, butirato e valerato, como neste estudo. Porém, em estudos *in vivo* estes efeitos não estão totalmente claros e precisam ser avaliados em mais estudos.

A redução no N-NH₃ ruminal e na ureia sanguínea é consistente com a diminuição no CMS e balanço de nitrogênio em vacas alimentadas com alta inclusão de glicerina, apesar de um aumento na digestibilidade da PB. Menor N-NH₃ ruminal e ureia no sangue podem estar relacionados a melhora na eficiência de utilização do N no rúmen. De fato, no presente estudo a adição de glicerina às dietas não alterou a síntese e eficiência microbiana. Do mesmo modo, a inclusão de glicerina até 15% da dieta não afetou a síntese microbiana (Donkin et al., 2009; Shin et al., 2012).

As glicose sanguínea aumentou com adição de glicerina às dietas. As concentrações de glicose foram reduzidas (Carvalho et al., 2011), inalteradas (Kass et

al., 2012; Shin et al., 2012) ou aumentadas (Donkin et al., 2009) quando a glicerina foi adicionada até 15% da dieta. Diferenças entre estudos podem ser relacionadas a pureza da glicerina, quantidade de glicerina adicionado a dieta e tempo de amostragem do sangue em relação a alimentação. Como a glicerina é rapidamente fermentada no rúmen, especialmente a propionato (Tabela 3) e este é um precursor gliconeogênico, a glicerina pode promover aumentos na glicose sanguínea.

Altas inclusões de glicerina à dieta de vacas em lactação levou a redução na produção de leite de 11% ou 3,1 kg/d (Tabela 5) quando comparados à dieta controle (sem glicerina) e 210 g de glicerina/kg MS, neste estudo. Do mesmo modo, Boyd et al. (2013) mostrou redução na produção de leite com inclusão de glicerina às dietas. No entanto, este resultado contrasta com outros estudos prévios que relatam não haver diferença na produção de leite em vacas no terço médio de lactação suplementadas com glicerina (Donkin et al., 2009; Kass et al., 2012; Shin et al., 2012; Wilbert et al., 2013); porém, em todos estes estudos a glicerina foi adicionada até 15% da dieta. No presente estudo, a redução na produção de leite pode estar relacionada a diminuição no CMS e composição da dieta. Apesar da inclusão de glicerina bruta levar a aumento na digestibilidade dos nutrientes, o teor de PB e CMS foram reduzidos, o que pode ter alterado a disponibilidade de proteína metabolizável no duodeno e conseqüentemente reduzir a produção de leite. Ainda, o tipo de forragem utilizado pode influenciar a resposta a inclusão de glicerina as dietas. Donkin et al. (2009), utilizando silagem de milho, silagem e feno de alfafa como fontes de forragens, não relataram efeitos da glicerina na produção de leite. Vacas alimentadas com casca de algodão produziram 5% mais leite que aquelas com dietas a base de silagem de milho com inclusão de glicera até 10% (Shin et al., 2012). Segundo Kass et al. (2012), a inclusão de glicerina até 15% da MS em dietas a base de silagem de capim não alterou a produção de leite mas aumentou o CMS. Silagem de milho contém altos teores de amido, porém menores de PB e FDN comparado a silagem de capim (NRC, 2001), assim, o tipo de forragem usado poderia alterar a fermentação ruminal, CMS e produção de leite em resposta a altas inclusões de glicerina a dieta.

A falta de efeito da glicerina na composição de leite em vacas no terço médio de lactação são similares aos obtidos por Donkin et al. (2009), mas contrasta com outros

estudos onde a glicerina aumentou a proteína do leite (Shin et al., 2012; Wilbert et al., 2013), provavelmente associado a diferenças no metabolismo de N. Assim, os resultados do presente estudo indicam que inclusões de glicerina em 210 g/kg MS em dietas a base de silagem de milho contendo alto concentrado não melhoram o desempenho de vacas leiteiras no terço médio de lactação.

5. Conclusão

Inclusão de altos níveis de glicerina bruta à dieta (210 g/kg) de vacas leiteiras no terço médio-final de lactação, promove aumento na digestibilidade da matéria seca e propionato ruminal mas afeta negativamente o consumo de matéria seca, digestibilidade da fibra em detergente neutro e a produção de leite. Contudo, nossos resultados sugerem que a glicerina bruta pode ser incluída até 140 g/kg MS em substituição ao milho grão sem afetar o metabolismo e desempenho de vacas leiteiras.

6. REFERÊNCIAS

- Abo El-Nor, S., Abughazaleh, A.A., Potu, R.B., Hastings, D., Khattab, M.S.A., 2010. Effects of differing levels of glycerol on rumen fermentation and bacteria. *Anim. Feed Sci. Technol.* 162, 99-105.
- Abughazaleh, A.A., Abo El-Nor, S., Ibrahim, S. A., 2011. The effect of replacing corn with glycerol on ruminal bacteria in continuous culture fermenters. *J. Anim. Physiol. Anim. Nut.* 95, 313–319.
- Allen, M.S., Bradford, B.J., OBA, M., 2009; Bord-invited review: The hepatic oxidation theory of the control of feed intake and its application to ruminants. *Journal Animal Sci.* 87, 3317-3334.
- ARC - Agricultural Research Council, 1984. The nutrient requirements of ruminant livestock. Commonwealth Agricultural Bureau, Farnham Royal, UK.
- AOAC, 2000. Official Methods of Analysis, 17th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.
- Benson, J.A., Reynolds, C.K., Aikman, P.C., Lupoli, B., Beever, D.E., 2002. Effects of abomasal vegetable oil infusion on splanchnic nutrient metabolism in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Sci.* 85, 1804-1814.

- Boyd, J., Bernard, J.K., West, J.W., 2013. Effects of feeding different amounts of supplemental glycerol on ruminal environment and digestibility of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 96, 470–476.
- Broderick, G.A., Kang, J.H., 1980. Automated simultaneous determination of ammonia and total amino-acids in ruminal fluid and *in vitro* media. *J. Dairy Sci.* 63, 64-75.
- Carvalho, E.R., Schmelz-roberts, N.S., White, H.M., 2011. Replacing corn with glycerol in diets for transition dairy cows. *J. Dairy Sci.* 94, 908-916.
- Casali, A. O., Detmann, E., Valadares Filho, S. C., Pereira, J. C., Henrique, L. T., Freitas, S. G.; Paulino, M. F., 2008. Influence of incubation time and particles size on indigestible compounds contents in cattle feeds and feces obtained in situ procedures. *Braz. J. Anim. Sci.* 37, 335-342.
- Chen, X. B., Gomes, M. J., 1992. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives - an overview of technical details. Bucksburnd, Aberdeen: International Feed Research Unit; Rowett Research Institute. 21 p.
- Chizzotti, M. L., Valadares Filho, S.C., Valadares, R. F. D., Chizzotti, F. H. M., Tedeschi, L. O., 2008. Determination of creatinine excretion and evaluation of spot urine sampling in Holstein cattle. *Livest. Sci.* 113, 218-225.
- Chung, Y. H., D. E. Rico, C. M. Martinez, T. W. Cassidy, V. Noiro, A. Ames, and G. A. Varga. 2007. Effects of feeding dry glycerin to early postpartum Holstein dairy cows on lactational performance and metabolic profiles. *J. Dairy Sci.* 90, 5682–5691.
- Dasari, M.A. 2007. Crude glycerol potential described. *Feedstuffs* 15, 1-3.
- Donkin, S.S., 2008. Glycerol from biodiesel production: the new corn for dairy cattle. *Braz. J. Anim. Sci.* SE, 280-286.
- Donkin, S.S., Koser, S.L., White, H.M., Doane, P.H., Cecava, M.J., 2009. Feeding value of glycerol as a replacement for corn grain in rations fed to lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92, 5111-5119.
- Erwin, E.S., Marco, G.J., Emery, E.M., 1961. Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. *J. Dairy Sci.* 44, 1768–1771.

- Ezequiel, J.M.B., Sancanari, J.B.D., Machado Neto, O.R., Silva, Z.F., Almeida, M.T.C., Silva, D.A.V., van Cleef, F.O.S., van Cleef, E.H.C.B., 2015. Effects of high concentrations of dietary crude glycerin on dairy cow productivity and milk quality. *J. Dairy Sci.* 98, 8009-8017.
- Fisher, L.J., Erfle, J.D., Lodge, G.A., Sauer, F.D., 1973. Effects of propylene glycol or glycerol supplementation of the diet of dairy cows on feed intake, milk yield and composition, and incidence of ketosis. *Can. J. Anim. Sci.* 53, 289-296.
- Fujihara, S., Yamaguchi, M., 1978. Effects of allopurinol 4-hydroxypyrazolo (3,4-d)pyrimidine on metabolism of allantoin in soybean plants. *Plant Physiology*, 62, 134-138.
- Getachew, G., Makkar, H.P.S., Becker, K., 2002. Tropical browses: contents of phenolic compounds, in vitro gas production and stoichiometric relationship between short chain fatty acid and in vitro gas production. *J. Agr. Sci.* 139, 341–352.
- Hall, M.B., 2000. Calculation of non-structural carbohydrate content of feeds that contain non-protein nitrogen. University of Florida, P.A-25 (Bulletin 339, April 2000).
- Johnson, R.B., 1954. The treatment of ketosis with glycerol or propylene glycol. *Cornell Vet.* 44, 6-21.
- Kass, M., Ariko, T., Rihma, E., Ots, M., Arnev, D., Kart, O., 2012. Effect of replacement of barley meal with crude glycerol on lactation performance of primiparous dairy cows fed a grass silage based diets. *Livest. Sci.* 150, 240-247.
- Kaylegian, K. E., Houghton, G.E., Lynch, J. M., Fleming, J. R., Barbano, D. M., 2006. Calibration of infrared milk analyzers: Modified milk versus producer milk. *J. Dairy Sci.* 89, 2817-2832.
- Krehbiel, C. R., 2008. Ruminal and physiological metabolism of glycerin. *J. Dairy Sci.* 86, supplement.
- Mach, N., Bach, A., Devant, M., 2009. Effects of crude glycerin supplementation on performance and meat quality of Holstein bulls fed high-concentrate diets. *J. Anim. Sci.* 87, 632-638.
- Mertens, D. R., Allen, M., Carmany, J., Clegg, J., Davidowicz, A., Drouches, M., Frank, K., Gambin, D., Garkie, M., Gildemeister, B., Jeffress, D., Jeon, C. S., Jones, D., Kaplan, D., Kim, G. N., Kobata, S., Main, D., Moua, X., Paul, B., Robertson, J.,

- Tayson, D., Thiex, N., Williams, J., Wolf, J. M., 2002. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: collaborative study. *J. AOAC Int* 85, 1217–1240.
- National Research Council, 2001. Nutrient requirements of dairy cattle, 7th ed. Nat. Acad. Press, Washington DC. 381 p.
- Nocek, J. E., 1988. In situ and other methods to estimate ruminal protein and energy digestibility. A review. *J. Dairy Sci.* 71, 2051-2069.
- Piantoni, P., Allen, M.S., 2015. Evaluation of propylene glycol and glycerol infusions as treatments for ketosis in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 98, 1-11.
- Remond, B., Souday, E., Jouany, J. P., 1993. In vitro and In vivo fermentation of glycerol by rumen microbes. *Anim. Feed Sci. Technol.* 41, 121–132.
- Shin, J.H., Wang, D., Kim, S.C., Adesogan, A.T., Staples, C.R., 2012. Effects of feeding crude glycerin on performance and ruminal kinetics of lactating Holstein cows fed corn silage or cottonseed hull-based, low-fiber diets. *J. Dairy Sci.* 95, 4006-4016.
- Sklan, D.R., Ashkenazi, R., Braun, A., Devorin, A., Tabori, K., 1992. Fatty acids, calcium soaps of fatty acids, and cotton seeds fed to high yielding cows. *J. Dairy Sci.* 75, 2463–2472.
- Tan, H.W., Abdul Aziz, A.R., Aroua, M.K., 2013. Glycerol production and its applications as a raw material: A review. *Renew. Sust. Energy Rev.* 27: 118-127.
- Thompson, J.C., He, B.B., 2006. Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. *Appl. Eng. Agric.* 22, 261-265.
- Trabue, S., Kenwood, S., Tjandrakusuma, S., Rasmussen, M. A., Reilly, P. J., 2007. Ruminal fermentation of propylene glycol and glycerol. *J. Agric. Food Chem.* 55, 7043–7051.
- USDA – 2014 - <http://www.ers.usda.gov/topics/farm-economy/bioenergy/findings.aspx> acesso em: 06/08/2015.
- Wang, C., Liu, Q., Huo, W.J., Yang, W.Z., Dong, K.H., Huang, Y.X., Guo, G., 2009. Effects of glycerol on rumen fermentation, urinary excretion of purine derivatives and feed digestibility in steers. *Livest. Sci.* 121, 15-20.

CAPÍTULO 3

O artigo a seguir está regido conforme as normas de publicação do *Animal Production Science*, exceto o idioma oficial de publicação e posicionamento de tabelas. (Aceito para publicação em 06/10/2015).

Efeitos da quitosana na fermentação ruminal, digestibilidade dos nutrientes, produção e composição em vacas leiteiras

RESUMO: O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do fornecimento de quitosana no consumo, digestibilidade dos nutrientes, fermentação ruminal e desempenho de vacas leiteiras. Oito vacas da raça Holandesa canuladas no rúmen (215 ± 60 DEL; $641,6 \pm 41,0$ kg/PC) foram distribuídas em duplo Quadrado Latino 4×4 , com períodos experimentais de 21 dias. Os animais foram distribuídas para receber 1 dos 4 tratamentos, como segue: CO) controle (sem adição de quitosana), Q75, Q150 e Q225 adição de 75, 150 e 225 mg de quitosana/kg de PC via canula ruminal, respectivamente. O fornecimento de quitosana não afetou o consumo de matéria seca, porém, aumentou a digestibilidade da proteína bruta. A quitosana não alterou o pH, NH_3 e acetato no rúmen. A adição de quitosana aumentou as concentrações de propionato ruminal, enquanto as concentrações de butirato, isobutirato, isovalerato e a relação acetato: propionato foram reduzidas com adição de quitosana. As concentrações sanguíneas de glicose, ureia, AST e GGT foram semelhantes entre os tratamentos. O balanço de nitrogênio não foi alterado, porém a quitosana aumentou o N no leite. A quitosana não alterou a síntese de proteína microbiana. A adição de quitosana aumentou a produção de leite, PLC, proteína e lactose. A quitosana é um modulador de fermentação ruminal natural alternativo. O uso de 225 mg de quitosana/kg PC proporcionou aumento na concentração de propionato ruminal e produção de leite.

Palavras-chave: aditivo, antimicrobiano, consumo de matéria seca, produção de leite

Effects of chitosan on ruminal fermentation, nutrient digestibility, and milk yield and composition of dairy cows

ABSTRACT: This study aimed to evaluate the effects of chitosan level on intake, nutrient digestibility, ruminal fermentation and performance of lactating dairy cows. Eight rumen cannulated Holstein cows (215.4 ± 60.9 DIM; 641.6 ± 41.06 kg of BW) were assigned in a replicated 4 x 4 Latin squares design with 21 d periods. Cows were assigned to receive 1 of 4 treatments, as following: CO) control (without chitosan), C75, C150 and C225 addition of 75, 150 and 225 mg/kg of BW chitosan placed through rumen cannula, respectively. Chitosan supply had no effect on dry matter intake, however, increased crude protein digestibility. Chitosan had no effect on ruminal pH, NH_3 , and acetate concentrations. Propionate concentration was increased, while butyrate, isobutyrate, isovalerate and acetate: propionate ratio was decreased by chitosan. Glucose, urea, AST and GGT blood concentrations was similar between treatments. Nitrogen balance was not affected, but chitosan increased N milk. Microbial protein synthesis was not affected by chitosan. The chitosan addition increased milk production, FCM, protein and lactose production. Chitosan is a natural alternative modulator of ruminal fermentation. The use of chitosan up to 225 mg/kg of BW has increased ruminal propionate and milk production of dairy cows.

Keywords: additive, antimicrobial, dry matter intake, milk yield

1. Introdução

Atualmente, atender as exigências de vacas leiteiras de alta produção é um grande desafio para os nutricionistas. Com isso, estratégias como aumentar a densidade energética da dieta e uso de aditivos têm sido adotados. Na nutrição de ruminantes, o uso de aditivos para modular a fermentação ruminal e melhorar o desempenho é uma realidade (Calsamiglia et al., 2007; Goiri et al., 2010). Os ionóforos são a principal classe de aditivos utilizados atualmente, porém seu uso tem sido repensado e restringido devido ao potencial efeito sobre a resistência microbiana à antibióticos (Russell e Houlihan, 2003).

Quitosana é um biopolímero natural, não-tóxico e biodegradável derivado da deacetilação da quitina que tem sido empregado com sucesso na indústria de alimentos, farmacêutica, cosméticos e agricultura, em especial por sua atividade antimicrobiana (Kong et al., 2010). Em ruminantes, estudos prévios *in vitro* demonstram que a quitosana pode modular a fermentação ruminal, com alteração no perfil de ácido graxos de cadeia curta (AGCC) e aumento em propionato (Goiri et al., 2009a; Goiri et al., 2009b). No entanto, estes mesmos autores relatam efeito negativo da quitosana sobre a digestibilidade da matéria seca (MS) e da fibra em detergente neutro (FDN). Por outro lado, Goiri et al. (2010) relataram que a quitosana aumentou o teor de propionato ruminal sem alterar a digestibilidade em ovinos, tornando a fermentação energeticamente mais eficiente. Com isso, dada a importância da fermentação ruminal no metabolismo e desempenho animal e a possibilidade de uso da quitosana como alternativa aos ionóforos, mais estudos *in vivo* são necessários para indentificar o real efeito da quitosana sobre fermentação ruminal e desempenho, especialmente em vacas leiteiras.

Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de doses crescentes de quitosana sobre o consumo, digestibilidade dos nutrientes, fermentação ruminal e desempenho de vacas leiteiras no final da lactação. A hipótese científica avaliada neste estudo sugere que o uso de quitosana na dieta de vacas leiteiras, modifica o padrão de fermentação ruminal e altera a proporção de ácidos graxos no rúmen melhorando a produção de leite sem afetar o consumo e digestibilidade dos nutrientes.

2. Material e métodos

2.1 Local, Instalações e Animais

O experimento foi conduzido no Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite (LPBL) do Departamento de Nutrição e Produção Animal (VNP) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), em Pirassununga, SP.

A localização geográfica do LPBL é 21° 57' 28" de latitude sul, 47° 27' 21" de longitude oeste e altitude de 635 metros. O clima da região é tropical, com temperatura média durante o experimento de 18,29° C. As temperaturas máximas e mínimas registradas foram de 30,20 e 6,4° C, respectivamente. A umidade relativa do ar média foi de 76,32% e a velocidade do vento de 0,80 km/h.

Oito vacas da raça Holandesa, multíparas, canuladas no rúmen, com 215 ± 60 dias em lactação, peso corporal (PC) médio de 641,6 ± 41,0 kg foram utilizadas neste estudo. Os animais foram distribuídos em duplo Quadrado Latino 4 × 4, balanceados e contemporâneos. Produção de leite inicial, dias em lactação e peso corporal foram utilizados para alocar os animais aos quadrados. Cada período experimental teve a duração de 21 dias, sendo os 14 primeiros de adaptação aos tratamentos e os demais destinados a coleta de dados. Os animais foram alojados em estábulo tipo "free-stall", com ventilação forçada, em baias individuais de 17,5 m² de área, providas de camas de areia e livre acesso a água.

2.2 Tratamentos Experimentais, Coletas e Análises de Alimentos

Em cada período, os animais foram distribuídos em cada quadrado para receber 1 dos 4 tratamentos, como segue: CT) controle (sem adição de quitosana); ou Q75, Q150 e Q225 com adição de 75, 150 e 225 mg/kg de PC de quitosana, respectivamente. A quitosana utilizada neste estudo continha as seguintes especificações: densidade aparente 0,32 g/mL; pH 7,9; viscosidade <200 cPs; cinzas 1,35%; e grau de desacetilação de 86,3% (Polymar Indústria e Com. Imp. e Exp. LTDA, Fortaleza, Ceará, Brasil; Apêndice 2). A quantidade de quitosana fornecida a cada animal foi pesada diariamente em *bags* de papel, dividida em duas iguais porções colocadas direto no

rúmen via cânula, às 08:00 e às 16:00 h. A dieta controle, fornecida a todos animais, foi formulada segundo as recomendações do NRC (2001) para atender as exigências de uma vaca de 600 kg/PC, produzindo 25 kg/leite/dia contendo 3,5% de gordura e 2,8% de proteína (Tabela 1). A dieta foi fornecida como ração total duas vezes ao dia às 07:00 e às 13:00 h, de maneira a permitir de 5 a 10% de sobras. O consumo de alimento foi mensurado diariamente pela diferença entre quantidade de dieta fornecida e de sobras.

Tabela 1 – Ingredientes e composição da dieta experimental basal

| Item | Dieta |
|---|-------|
| <i>Ingredientes, % MS</i> | |
| Silagem de milho | 63,08 |
| Milho moído | 22,52 |
| Farelo de soja | 11,50 |
| Ureia | 0,75 |
| Sulfato de amonia | 0,15 |
| Mistura mineral ¹ | 1,80 |
| Sal | 0,20 |
| <i>Composição, % MS</i> | |
| Matéria seca | 52,79 |
| Matéria orgânica | 94,07 |
| Proteína bruta | 14,90 |
| Extrato etéreo | 2,89 |
| Carboidratos não fibrosos ² | 38,11 |
| Fibra em detergente neutro | 39,74 |
| Energia líquida ³ (Mcal/kg MS) | 1,47 |

¹ Contém por kg: 88,0 g de Ca; 42,0 g de P; 18,0 g de S; 45,0 g de Mg; 123,0 g de Na; 14,0 mg de Co; 500,0 mg de Cu; 20,0 mg de Cr; 1050,0 mg de Fe; 28,0 mg de I; 1400,0 mg de Mn; 18,0 mg de Se; 2800,0 mg de Zn; 80,0 mg de Biotina; 200.000,00 UI Vit A; 40.000,00 UI Vit D; 1.200,00 UI Vit E.

² CNF = 100 – ([PB - PB da ureia + %ureia] + FDN + EE + cinzas); Hall (2000).

³ Estimado com modelos do NRC (2001).

Do 15º ao 21º dia de cada período, amostras individuais de ingredientes e sobras de cada vaca foram coletadas, perfazendo uma amostra composta por vaca e

armazenadas à -20°C até as análises. Amostras de ingredientes e sobras foram secas em estufa de ventilação forçada à 55°C por 72 h, moídas em moinho de facas tipo Willey (Marconi® - MOD - 0.48) com peneiras de 1 mm de crivo e então analisadas quanto aos teores de matéria seca (MS; 930.15; AOAC, 2000), proteína bruta (PB; N x 6.25; 984.13; AOAC, 2000), extrato etéreo (EE; 920.39; AOAC, 2000) e cinzas (942.05; AOAC, 2000). Os teores de fibra em detergente neutro foram determinados de acordo com Mertens (2002), usando α -amilase e sem adição de sulfito de sódio ao detergente em sistema Ankon® (Ankom Tech. Corp., Fairport, NY).

Do 16º ao 18º dia de cada período, amostras de fezes foram coletadas de vaca, duas vezes ao dia, perfazendo uma amostra composta por vaca. A fibra em detergente ácido indigestível (FDAi) foi utilizado como marcador para estimativa da excreção fecal e digestibilidade dos nutrientes. Amostras de ingredientes, sobras e fezes foram secas em estufa de ventilação forçada à 55°C por 72 h, moídas em moinho de facas tipo Willey (Marconi® - MOD - 0.48) com peneiras de 2 mm de crivo. Estas amostras foram então pesadas em *bags* de tecido não-tecido (100 g/m²) seguindo a recomendação de no máximo 20 mg de MS/cm² (Nocek, 1988) e então incubadas por 264 h no rúmen de duas vacas Holandesas previamente adaptadas de acordo com técnica descrita por Casali et al. (2008). Após a retirada do rúmen, os *bags* foram lavados em água corrente, secos em estufa de ventilação forçada à 55°C e submetidos à tratamento em solução detergente ácido para determinar a concentração de FDAi (973.18; AOAC, 2000). A digestibilidade dos nutrientes foi calculada pela relação de FDAi consumido (corrigido para sobras) e fezes.

2.3 Produção e Composição do Leite

Os animais foram ordenhados duas vezes ao dia, às 06:00 e às 16:00 h e produção de leite registrada eletronicamente (Alpro®, DeLaval – Tumba, Sweden). Do 16º ao 18º dia de cada período, amostras proporcionais as duas ordenhas diárias foram coletadas e analisadas a fresco para proteína, gordura e lactose (Milkoscan; Foss Electric, Hillerod - Denmark). A produção de leite foi corrigida para 3,5% de gordura de acordo com Sklam et al. (1992).

2.3 Escore de Condição Corporal e Peso

O escore de condição corporal (ECC) foi avaliado no sétimo e último dia de cada período, por 2 técnicos treinados utilizando sistema de 1-5 pontos de acordo com Wildman et al. (1982). Em cada período, o peso corporal foi mensurado a cada sete dias após ordenha da manhã (Brete ME 2.80; Coimma®, Dracena - Brasil), para ajustar a quantidade de quitosana fornecida à cada animal.

2.4 Parâmetros Sanguíneos

Amostras de sangue foram coletadas no 15º dia de cada período, por punção da veia coccígea em tubos com vácuo (vacutainer®) antes da alimentação da manhã. Amostras de sangue foram centrifugadas à 3000 × g por 10 min e o plasma separado e armazenado a -20° C até as análises. As análises foram realizadas utilizando kits comerciais (Glicose: cat. no. K-082; Ureia: cat. no. K-056; AST: cat. no. K-048; GGT: cat. no. K-080; Bioclin, Belo Horizonte, Brasil), e as leituras realizadas em analisador automático (SBA 200, CELM, São Caetano do Sul, Brasil).

2.5 Balanço de Nitrogênio e Síntese de Proteína Microbiana

No 19º dia de cada período, amostras *spot* de urina foram coletadas de cada vaca 4 h após alimentação da manhã. As amostras de urina foram filtradas e subamostras de 10 mL foram diluídas em 40 mL de ácido sulfúrico e armazenadas à -20°C para análises de ácido úrico e alantoína. Amostras de urina pura foram armazenadas para determinação de N total e creatinina. As concentrações de ácido úrico e creatinina foram determinadas com uso de kits comerciais (Ácido urico líquido estável: cat. no. k-052; Creatinine cinética: cat.no. K-067; Bioclin). O volume de urina foi estimado a partir das excreções diárias de creatinina, como 24,05 mg/kg de PC (Chizzotti et al., 2008) e das concentrações de creatinina na amostra *spot* ($\text{Volume de urina} = \text{PC} \times 24,05 / \text{Creatinina na amostra spot}$). As excreções de ácido úrico na urina, e alantoína na urina e leite foram determinados por método colorimétrico (Fujihara e Yamaguchi, 1978), considerados como sendo a excreção total de derivados de purina e a síntese de proteína microbiana estimada a partir dessas concentrações de acordo com Chen e Gomes (1992). O nitrogênio total nas amostras de urina foi determinado (984.13; AOAC, 2000), e o balanço

obtido pela diferença entre N consumido e excretado nas fezes e urina, e secretado no leite.

2.6 Fermentação Ruminal

No 20º dia de cada período, amostras de líquido ruminal foram coletadas nas áreas cranial, ventral e caudal do rúmen nos tempos: 0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 h após alimentação da manhã. O pH ruminal foi imediatamente determinado com uso de peagâmetro (MB-10, Marte Centífica, Santa Rita do Sapucaí, Brasil). Após, amostras de fluído ruminal (50 mL) foram centrifugadas à 7000 × g por 15 min, e uma subamostra de 2 mL de sobrenadante foi misturado com 0,4 mL de ácido fórmico PA e armazenadas à -20°C para análise de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). Outros 2 mL de sobrenadante foi adicionado de 1 mL de ácido sulfúrico (1 N) e armazenadas à -20°C para determinação de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) pelo método fenol-hipoclorito (Broderick e Kang, 1980). As concentrações de AGCC no fluído ruminal foram mensuradas em cromatógrafo a gás (GC-2014, Shimadzu, Tokyo, Japão) equipado com coluna capilar (Stabiliwax; Restek, Bellefonte, EUA) de acordo com método descrito por Erwin et al. (1961) e adaptado por Getachew et al. (2002). As amostras foram descongeladas a temperatura ambiente e centrifugadas a 14500 × g a 4°C por 10 min, e o sobrenadante (1 mL) foi transferido para um frasco seco e limpo com 100 µL do padrão interno (ácido 2-etil-butírico 100 mM, Chemservice, USA). Hélio foi utilizado como gás de arraste (vazão 8,01 mL/min), o ar sintético como comburente (vazão 40 kPa) e o hidrogênio como combustível (vazão 60 kPa). A temperatura de operação utilizadas do injetor split/splitless e do detector de ionização de chamas foram de 250°C e da coluna de 145°C. O padrão externo foi preparado com ácidos acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico e valérico (Chemservice, USA). O software GCSolution (Shimadzu, Japão) foi utilizado para cálculo das concentrações de AGCC.

2.7 Análises Estatísticas

Os dados foram analisados com PROC MIXED (Statistical Analysis System for Windows 9.0 - SAS - SAS Institute Inc., Cary, USA), de acordo com seguinte modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + S_i + P_j + T_k + A_l(S_j) + e_{ijk},$$

Where Y_{ijk} = variável dependente; μ = média geral; S_i = efeito fixo de quadrado; P_j = efeito fixo de período; T_k = efeito fixo de tratamento; $A_i(S_j)$ = efeito aleatório de animal dentro de quadrado; e , e_{ijk} = erro residual. As variáveis de fermentação ruminal (pH, $\text{NH}_3\text{-N}$, e AGCC) foram analisados como medidas repetidas no PROC MIXED do SAS 9.0, considerando no modelo estatístico os efeitos de animal, período, quadrado, tratamento, além dos efeitos de tempo e suas interações com os tratamentos. Estruturas de covariância testadas incluem CS, CSH, UNIV, TOEP, TOEPH, AR (1) e ARH (1). A metodologia de Akaike foi utilizada para determinar a matriz de covariância a ser utilizada. Resultados são reportados como média dos quadrados mínimos. Respostas aos tratamentos foram testadas com contrastes linear e quadrático, considerados significantes a $P < 0,05$. Comparações múltiplas também foram feitas utilizando teste de Tukey ajustado quando os contrastes linear e quadrático foram significativos.

3. Resultados

3.1 Consumo e Digestibilidade dos Nutrientes

O consumo de matéria seca, seja em valor absoluto ou relativo ao peso corporal foi similar entre as vacas dos tratamentos ($P > 0,05$; Tabela 2). A adição de quitosana não afetou a digestibilidade aparente total da MS, MO e FDN ($P > 0,05$). Contudo, a digestibilidade da PB aumentou linearmente ($P < 0,05$) com adição de quitosana, com maiores valores observados nos tratamentos contendo 150 e 225 mg de quitosana/kg PC quando comparados pelo teste de média.

3.2 Fermentação Ruminal

A adição de quitosana não afetou o pH ruminal e as concentrações de N-NH_3 ($P > 0,05$; Tabela 3). Não houve efeito da quitosana sobre as concentrações de AGCC, acetato, isobutirato e valerato ($P > 0,05$). Contudo, a quitosana aumentou linearmente as concentrações de propionato ($P < 0,05$), e quando comparado pelo teste de média o maior valor foi observado no tratamento contendo 225 mg/kg PC. O butirato reduziu linearmente ($P < 0,05$) com uso de quitosana, com maior valor no tratamento com 75 mg/kg PC. As concentrações de isovalerato foram reduzidas linearmente ($P < 0,05$) pela

adição de quitosana, com menores valores observados nos tratamentos contendo 150 e 225 mg de quitosana/kg PC quando comparado pelo teste média. O uso de quitosana reduziu linearmente a relação acetato: propionato ($P < 0,05$), com menor valor no tratamento 225 mg/kg PC pelo teste de média.

Tabela 2 – Efeitos de doses de quitosana sobre o consumo de matéria seca e a digestibilidade em vacas leiteiras

| Item | Tratamentos ¹ | | | | EPM ² | P-valor ³ | |
|------------------------|--------------------------|---------------------|--------------------|--------------------|------------------|----------------------|------|
| | CO | Q75 | Q150 | Q225 | | LIN | QUA |
| CMS, kg/d | 19,84 | 20,22 | 19,44 | 20,25 | 0,47 | 0,79 | 0,57 |
| CMS, %PC | 2,97 | 3,03 | 2,9 | 2,99 | 0,08 | 0,73 | 0,47 |
| <i>Digestibilidade</i> | | | | | | | |
| Matéria seca | 0,650 | 0,660 | 0,670 | 0,670 | 0,009 | 0,29 | 0,66 |
| Matéria orgânica | 0,670 | 0,680 | 0,690 | 0,690 | 0,001 | 0,24 | 0,56 |
| Proteína bruta | 0,700 ^b | 0,720 ^{ab} | 0,731 ^a | 0,731 ^a | 0,009 | 0,05 | 0,39 |
| FDN | 0,601 | 0,570 | 0,590 | 0,580 | 0,011 | 0,47 | 0,36 |

^{a,b} Médias com diferentes letras dentro da mesma linha diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

¹ CO = controle; Q75, Q150 e Q225 = 75, 150 e 225 mg de quitosana/kg de PC fornecidos via cânula ruminal.

² Erro padrão da média.

³ Efeitos dos contrastes linear (LIN) e quadrático (QUA).

3.3 Metabólitos Sanguíneos, Balanço de Nitrogênio e Síntese Microbiana

As concentrações sanguíneas de glicose, ureia, AST e GGT não foram alteradas pela quitosana ($P > 0,05$; Tabela 4). O consumo de N, a excreção de N na urina e fezes, o balanço de N foi similar entre os tratamentos ($P > 0,05$). No entanto, o uso de quitosana aumentou linearmente o N no leite e a eficiência de uso do N ($P < 0,05$), com maiores valores observados no tratamento com 225 mg/kg PC pelo teste de média. A síntese de nitrogênio e proteína microbiana, e eficiência não foi afetada pela adição de quitosana ($P > 0,05$).

Tabela 3 – Efeitos de doses de quitosana na fermentação ruminal em vacas leiteiras

| Item | Tratamentos ¹ | | | | EPM ² | <i>P</i> -valor ³ | | | | |
|---------------------------|--------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|------------------|------------------------------|-------|------|-------|------|
| | CO | Q75 | Q150 | Q225 | | QUI | Tempo | Int | LIN | QUA |
| pH | 6,42 | 6,42 | 6,38 | 6,34 | 0,04 | 0,67 | <0,01 | 0,40 | 0,25 | 0,70 |
| N-NH ₃ , mg/dL | 26,70 | 24,11 | 25,64 | 26,93 | 0,70 | 0,69 | 0,77 | 0,71 | 0,79 | 0,30 |
| AGCC total, mM | 109,56 | 103,90 | 104,53 | 105,27 | 2,07 | 0,65 | <0,01 | 0,65 | 0,43 | 0,36 |
| Acetato, mM | 72,29 | 66,08 | 68,01 | 67,42 | 1,41 | 0,24 | <0,01 | 0,26 | 0,20 | 0,21 |
| Propionato, mM | 19,65 ^a | 19,60 ^a | 21,56 ^a | 23,25 ^b | 0,48 | 0,09 | <0,01 | 0,07 | 0,02 | 0,43 |
| Butirato, mM | 11,69 ^a | 13,14 ^b | 10,73 ^a | 10,33 ^a | 0,27 | 0,02 | <0,01 | 0,72 | 0,03 | 0,15 |
| Valerato, mM | 1,52 | 1,49 | 1,47 | 1,55 | 0,04 | 0,93 | <0,01 | 0,46 | 0,86 | 0,58 |
| Isobutirato, mM | 1,16 ^a | 1,11 ^a | 1,02 ^b | 1,02 ^b | 0,04 | 0,17 | 0,22 | 0,59 | 0,04 | 0,64 |
| Isovalerato, mM | 2,52 ^a | 2,21 ^{ab} | 1,88 ^b | 1,80 ^b | 0,05 | <0,01 | <0,01 | 0,26 | <0,01 | 0,19 |
| C2:C3, ⁴ mM | 3,67 | 3,47 | 3,25 | 3,01 | 0,04 | 0,01 | 0,04 | 0,06 | 0,01 | 0,86 |

^{a,b} Médias com diferentes letras dentro da mesma linha diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

¹ CO = controle; Q75, Q150 e Q225 = 75, 150 e 225 mg de quitosana/kg de PC fornecidos via cânula ruminal.

² Erro padrão da média.

³ Efeitos dos tratamentos (QUI), Tempo, Interação QUI × Tempo, e contrastes linear (LIN) e quadrático (QUA).

⁴ Relação acetato: propionato.

Tabela 4 – Efeitos de doses de quitosana nos metabólitos sanguíneos, balanço de nitrogênio e síntese microbiana em vacas leiteiras

| Item | Tratamentos ¹ | | | | EPM ² | P-valor ³ | |
|-------------------------------|--------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|------------------|----------------------|------|
| | CO | Q75 | Q150 | Q225 | | LIN | QUA |
| <i>Metabólitos sanguíneos</i> | | | | | | | |
| Glicose | 83,56 | 80,74 | 78,73 | 77,36 | 2,62 | 0,30 | 0,87 |
| Ureia | 30,75 | 29,89 | 27,95 | 29,48 | 1,25 | 0,49 | 0,52 |
| AST ⁴ | 58,15 | 62,64 | 59,99 | 60,45 | 1,75 | 0,69 | 0,41 |
| GGT ⁵ | 37,39 | 32,44 | 37,16 | 32,30 | 2,44 | 0,52 | 0,99 |
| <i>Balanço de nitrogênio</i> | | | | | | | |
| N consumido, g/d | 491,36 | 503,09 | 481,34 | 500,03 | 11,79 | 0,92 | 0,72 |
| N urina, g/d | 153,08 | 141,75 | 157,78 | 155,12 | 3,98 | 0,48 | 0,54 |
| N fecal, g/d | 148,68 | 139,95 | 128,65 | 131,80 | 6,48 | 0,09 | 0,45 |
| N leite, g/d | 98,67 ^a | 100,78 ^a | 103,29 ^b | 109,69 ^b | 4,69 | 0,02 | 0,49 |
| Balanço de N, g/d | 90,93 | 120,62 | 91,62 | 103,42 | 8,78 | 0,83 | 0,31 |
| N leite/N consumido | 20,11 | 20,22 | 21,42 | 21,96 | 0,83 | 0,02 | 0,72 |
| N microbiano, g/d | 224,86 | 232,66 | 227,22 | 238,42 | 7,13 | 0,44 | 0,96 |
| PB Microbiana, g/d | 1405,39 | 1454,10 | 1420,14 | 1490,14 | 44,58 | 0,44 | 0,96 |
| Eficiência ⁶ | 100,08 | 103,16 | 102,90 | 105,34 | 3,32 | 0,48 | 0,92 |

^{a,b} Médias com diferentes letras dentro da mesma linha diferem pelo teste de Tukey (P<0,05).

¹ CO = controle; Q75, Q150 e Q225 = 75, 150 e 225 mg de quitosana/kg de PC fornecidos via cânula ruminal.

² Erro padrão da média.

³ Efeitos dos contrastes linear (LIN) e quadrático (QUA).

⁴ AST = aspartato aminotransferase.

⁵ GGT = gamma-glutamyl tranferase.

⁶ Eficiência = g PB mic/kg de NDT consumido.

3.4 Produção e Composição do Leite

A adição de quitosana aumentou linearmente a produção de leite, proteína e lactose (P<0,05), com maiores valores observados no tratamento contendo 225 mg de quitosana/kg PC quando comparados pelo teste de média (Tabela 5). A produção de

leite corrigida, gordura, e as proporções de gordura, proteína e lactose não foram afetadas pelos tratamentos ($P>0,05$). A eficiência (PL/CMS) foi similar entre os tratamentos ($P>0,05$), porém a adição de quitosana aumentou numericamente a eficiência de uso da dieta.

Tabela 5 – Efeitos de doses de quitosana sobre a produção e composição do leite

| Item | Tratamentos ¹ | | | | EPM ² | P-valor ³ | |
|-----------------------------|--------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|------------------|----------------------|------|
| | CO | C75 | C150 | C225 | | LIN | QUA |
| Produção de leite, kg/d | 20,06 ^a | 20,42 ^a | 21,10 ^a | 22,20 ^b | 0,91 | 0,02 | 0,55 |
| PLC 3,5%, ⁴ kg/d | 24,40 | 25,33 | 25,16 | 26,24 | 1,06 | 0,16 | 0,93 |
| Gordura, kg/d | 0,97 | 1,01 | 0,98 | 1,02 | 0,04 | 0,42 | 0,92 |
| Proteína, kg/d | 0,63 ^a | 0,64 ^a | 0,66 ^{ab} | 0,70 ^b | 0,03 | 0,02 | 0,46 |
| Lactose, kg/d | 0,95 ^a | 0,96 ^a | 0,99 ^{ab} | 1,05 ^b | 0,04 | 0,02 | 0,47 |
| <i>Composição</i> | | | | | | | |
| Gordura, % | 4,77 | 5,07 | 4,65 | 4,65 | 0,13 | 0,16 | 0,22 |
| Proteína, % | 3,13 | 3,15 | 3,12 | 3,14 | 0,02 | 0,86 | 0,69 |
| Lactose, % | 4,71 | 4,72 | 4,66 | 4,70 | 0,03 | 0,45 | 0,45 |
| Leite/CMS ⁵ | 1,23 | 1,27 | 1,29 | 1,30 | 0,05 | 0,18 | 0,76 |
| ECC ⁶ | 2,78 | 2,78 | 2,78 | 2,80 | 0,03 | 0,41 | 0,48 |

^{a,b} Médias com diferentes letras dentro da mesma linha diferem pelo teste de Tukey ($P<0,05$).

¹ CO = controle; Q75, Q150 e Q225 = 75, 150 e 225 mg de quitosana/kg de PC fornecidos via cânula ruminal.

² Erro padrão da média.

³ Efeitos dos contrastes linear (LIN) e quadrático (QUA).

⁴ PLC 3,5% = $(0,432 + 0,165 \times \% G)$ kg de leite (Sklan et al., 1992).

⁵ PL/CMS = kg de leite/kg de matéria seca consumido.

⁶ ECC = escore de condição corporal em escala de 1-5 pontos de acordo com Wildman et al. (1982).

4. Discussão

Atualmente existe um crescente interesse por aditivos naturais que modulem a fermentação ruminal e melhorem o desempenho de ruminantes. No presente estudo, apesar da quitosana não alterar o CMS, a digestibilidade da PB melhorou quando os

animais receberam quitosana. Goiri et al. (2010) em estudo com ovinos alimentados com dieta de alto concentrado e suplementados com quitosana não observaram diferença no CMS e digestibilidade dos nutrientes, exceto uma tendência à redução na digestibilidade da FDN comparada à dieta controle. Contudo, doses crescentes de quitosana aumentou a digestibilidade da MS, FDN e PB sem afetar o CMS (Araújo et al., 2015); o que segundo os autores pode estar relacionado a alterações na fermentação ruminal. O mecanismo pelo qual a quitosana alterou a digestibilidade da PB pode ainda estar relacionado a quantidade de aminoácidos que escapam a fermentação ruminal e a absorção de peptídeos no duodeno, uma vez que as concentrações de N-NH₃ e a síntese microbiana não foram afetados pela quitosana. Segundo Yang e Russel (1993), alguns aditivos podem melhorar a eficiência de uso do nitrogênio pela redução na deaminação ruminal de aminoácidos, e conseqüentemente mais chegariam ao duodeno para absorção.

Na última década, foram publicados diversos estudos com uso de quitosana para alterar a fermentação ruminal (Goiri et al., 2009; Goiri et al., 2010; Araújo et al., 2015). Goiri et al. (2010) relataram aumento nas concentrações de propionato e redução em acetato em estudo *in vitro* com quitosana quando amido foi usado como substrato, mas não com celulose. Normalmente, dietas de vacas leiteiras são ricas em amido (25% ou mais da MS) e este fato poderia contribuir para aumentar a produção de propionato com uso de quitosana neste estudo. Além disso, a digestibilidade de CNF aumentou linearmente com uso de quitosana (dados não apresentados) o que também poderia estar associado ao aumento de propionato. Araújo et al. (2015) com dieta similar a utilizada no presente estudo (60:40 vol:con) observaram aumento linear de propionato com uso de doses de crescentes de quitosana em novilhos Nelores. Por outro lado, mudanças nos produtos finais da fermentação ruminal e aumento em propionato ruminal sugerem efeitos da quitosana em bactérias gram-positivas (McGuffey et al., 2001). Geralmente, a quitosana exerce forte efeito antimicrobiano sobre bactérias gram-positivas comparadas a gram-negativas (Senel e McClure, 2004; Zhong et al., 2008), o que está relacionado a membrana externa em bactérias gram-negativas. Segundo Kong et al. (2010), quando o pH do meio esta acima do pKa da quitosana (6,3 - 6,5) as capacidades hidrofóbicas e quelantes da quitosana são responsáveis por sua ação antimicrobiana, porém, no presente estudo a adição de quitosana não afetou o pH

ruminal ($6,4 \pm 0,04$). Além disso, quando comparado a outros AGCC e eficiência de fermentação do propionato é maior e pode reduzir a perda de energia por metano associada a produção de acetato e butirato (Hungate, 1996).

A quitosana pode reduzir a desaminação ruminal de aminoácidos, o que pode ser explicado pela redução na concentração ruminal de ácidos graxos de cadeia ramificada como isobutirato e isovalerato, que são produzidos a partir da deaminação ruminal de isoleucina, leucina e valina (Chalupa, 1980; Horton, 1980). Este fato poderia aumentar o fluxo de aminoácidos para o duodeno e melhorar a digestibilidade da PB e eficiência de utilização do nitrogênio para produção de leite. De fato, neste estudo a quitosana aumentou excreção de nitrogênio no leite sem alterar o consumo de nitrogênio, melhorando a eficiência de uso do nitrogênio. Ainda, apesar de sua ação antimicrobiana (Kong et al., 2010) a quitosana não afetou a síntese de proteína microbiana neste estudo.

Na literatura, estudos de desempenho com ruminantes recebendo quitosana ainda são escassos; contudo, quitosana parece melhorar o digestão e metabolismo em ruminantes, especialmente pelo aumento de propionato no rúmen (Goiri et al., 2010; Araújo et al., 2015). No presente estudo, a produção de leite, proteína e lactose aumentou quando receberam quitosana, o que pode ser associado ao aumento na produção de propionato e digestibilidade da PB que levou a maior disponibilidade de energia e nitrogênio para produção de leite.

5. Conclusão

O uso de 225 mg de quitosana/kg PC proporciona aumento na concentração de propionato ruminal e produção de leite. Além disso, o uso de quitosana melhora a eficiência de uso do nitrogênio. Assim, a quitosana pode ser utilizada até 225 mg/kg PC para melhorar o desempenho de vacas leiteiras em final de lactação.

6. REFERÊNCIAS

- AOAC, 2000. Official Methods of Analysis, 17th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.
- Araújo, A.P.C., Venturelli, B.C., Santos, M.C.B., Gardinal, R., Cônsolo, N.R.B., Calomeni, G.D., Freitas, J.E., Barletta, R.V., Gandra, J.R., Paiva, P.G., Rennó, F.P., 2015. Chitosan affects total nutrient digestion and ruminal fermentation in Nellore steers. *Anim. Feed Sci. Technol.* 206, 114-118.
- Broderick, G.A., Kang, J.H., 1980. Automated simultaneous determination of ammonia and total amino-acids in ruminal fluid and *in vitro* media. *J. Dairy Sci.* 63, 64-75.
- Calsamiglia, S., Busquet, M., Cardozo, P.W., Castillejos, L., Ferret, A., 2007. Invited review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.* 90, 2580-2595.
- Casali, A. O., Detmann, E., Valadares Filho, S. C., Pereira, J. C., Henrique, L. T., Freitas, S. G.; Paulino, M. F., 2008. Influence of incubation time and particles size on indigestible compounds contents in cattle feeds and feces obtained in situ procedures. *Braz. J. Anim. Sci.* 37, 335-342.
- Chalupa, W., 1980. Chemical control of rumen microbial metabolism. In: Ruckebusch, Y., Thivend, P. ed. *Digestive Physiology and Metabolism in Ruminants*. Westport: AVI Publishing Co., 1980. p. 325-347.
- Chen, X. B., Gomes, M. J., 1992. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives - an overview of technical details. Bucksburnd, Aberdeen: International Feed Research Unit; Rowett Research Institute. 21 p.
- Chizzotti, M. L., Valadares Filho, S.C., Valadares, R. F. D., Chizzotti, F. H. M., Tedeschi, L. O., 2008. Determination of creatinine excretion and evaluation of spot urine sampling in Holstein cattle. *Livest. Sci.* 113, 218-225.
- Erwin, E.S., Marco, G.J., Emery, E.M., 1961. Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. *J. Dairy Sci.* 44, 1768-1771.
- Fujihara, S., Yamaguchi, M., 1978. Effects of allopurinol 4-hydroxypyrazolo (3.4-d) pyrimidine on metabolism of allantoin in soybean plants. *Plant Physiology*, 62, 134-138.

- Getachew, G., Makkar, H.P.S., Becker, K., 2002. Tropical browses: contents of phenolic compounds, *in vitro* gas production and stoichiometric relationship between short chain fatty acid and *in vitro* gas production. *J. Agr. Sci.* 139, 341–352.
- Goiri, I., Oregui, L. M., Garcia-Rodriguez, A., 2009a. Dose-response effects of chitosans on *in vitro* rumen digestion and fermentation of mixtures differing in forage-to-concentrate ratios. *Anim. Feed Sci. Technol.* 151, 215-227.
- Goiri, I., Garcia-Rodriguez, A., Oregui, L.M., 2009b. Effect of chitosan on mixed ruminal microorganism fermentation using the rumen simulation technique (Rusitec). *Anim. Feed Sci. Technol.* 152, 92-102.
- Goiri, I., Oregui, L.M., Garcia-Rodriguez, A., 2010. Use of chitosans to modulate ruminal fermentation of 50:50 forage-to-concentrate diet in sheep. *J. Anim. Sci.* 88, 749-755.
- Hall, M.B., 2000. Calculation of non-structural carbohydrate content of feeds that contain non-protein nitrogen. University of Florida, P.A-25 (Bulletin 339, April 2000).
- Horton, G. M. J., 1980. Use of feed additives to reduce ruminal methane production and deaminase activity in steers. *J. Anim. Sci.* 50, 1160–1164.
- Hungate, R. E., 1966. *The Rumen and Its Microbes*. Academic Press, New York, NY.
- Kong, M., Chen, X.G., Xing, K., Park, H.J., 2010. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *Int. J. Food Microbiol.* 144, 51-63.
- McGuffey, R.K., Richardson, L.F., Wilkinson, J.I.D., 2001. Ionophores for dairy cattle: current status and future outlook. *J. Dairy Sci.*, 84, SE, 194-203.
- Mertens, D. R., Allen, M., Carmany, J., Clegg, J., Davidowicz, A., Drouches, M., Frank, K., Gambin, D., Garkie, M., Gildemeister, B., Jeffress, D., Jeon, C. S., Jones, D., Kaplan, D., Kim, G. N., Kobata, S., Main, D., Moua, X., Paul, B., Robertson, J., Tayson, D., Thiex, N., Williams, J., Wolf, J. M., 2002. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: collaborative study. *J. AOAC Int* 85, 1217–1240.
- National Research Council, 2001. *Nutrient requirements of dairy cattle*, 7th ed. Nat. Acad. Press, Washington DC. 381 p.
- Nocek, J. E., 1988. *In situ* and other methods to estimate ruminal protein and energy digestibility. A review. *J. Dairy Sci.* 71, 2051-2069.

- Russell, J. B., A. J. Houlihan, A.J., 2003. Ionophore resistance of ruminal bacteria and its potential impact on human health. *FEMS Microbiol Rev.* 27, 65-74.
- Senel, S., McClure, S.J., 2004. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. *Adv. Drug Delivery Rev.* 56, 1467-1480.
- Sklan, D.R., Ashkenazi, R., Braun, A., Devorin, A., Tabori, K., 1992. Fatty acids, calcium soaps of fatty acids, and cotton seeds fed to high yielding cows. *J. Dairy Sci.* 75, 2463–2472.
- Wildman, E.E., Jones, G.M., Wagner, P.E.A., 1982. Dairy cow body condition system and its relationship to selected production characteristics. *J. Dairy Sci.* 65, 495-501.
- Yang, C.M., Russell, J.B., 1993. The effect of monensin supplementation on ruminal ammonia accumulation in vivo and the numbers of amino acid-fermenting bacteria. *J. Anim. Sci.* 71, 3470–3476.
- Zhong, Z., Xing, R., Liu, S., Wang, L., Cai, S., Li, P., 2008. Synthesis of acyl thiourea derivatives of chitosan and their antimicrobial activities in vitro. *Carbohydrate Research* 343, 566–570.

APÊNDICE 1 – Certificado de Qualidade Glicerina



ADM do Brasil Ltda.
Avenida Senador Atilio Fontana, 1001 - Distrito Industrial
Rondonópolis - MT - CEP: 78745-900
Tel.: (66) 3411-2800

Certificado de Qualidade

(Certificate of Analysis)

Informações de carregamento (Shipment Info): ADM DO BRASIL LTDA

| | |
|--|---|
| Produto (Product): Glicerina (Glycerin) | Número do certificado (Certificate #): 130220086 |
| Numero do Lote (Lot #): 762320022013 | Data da produção (Date of Production): 20/02/2013 |
| Lote Estocado no Tanque (Tank): 7623 | Data da análise (Date Analysis): 20/02/2013 |
| Quantidade de Produto no Tanque (m3) (Amount in Tank): 225.848 | |

| <u>Característica</u> (Parameter) | <u>Unidade</u> (Unit) | <u>Metodo de Ensaio</u> (Methodology) | <u>Especificação</u> (Specification) | <u>Resultado</u> (Result) |
|--------------------------------------|--------------------------|--|---|------------------------------|
| Cinzas Sulfatadas (Sulfated Ash) | % (m/m) | ASTM D874 | máx. 7,5 | 6,3 |
| Cloro (Chloride) | % (m/m) | AOCS Ea 2-38 | Anotar (Record Only) | 2,97 |
| NaCl | % (m/m) | AOCS Ea 2-38 | máx. 7 | 4,89 |
| Residual Metanol (Methanol) | % (m/m) | Método Interno ADM (ADM Internal Method) | máx. 0,2 | 0,026 |
| pH | - | Método Interno ADM (ADM Internal Method) | Anotar (Record Only) | 6,3 |
| Umidade (Moisture) | % (m/m) | Método Interno ADM (ADM Internal Method) | máx. 15 | 12,467 |
| MONG | % (m/m) | ISO 2464 | máx. 1,5 | 0,6 |
| Glicerol (Glycerol) | % (m/m) | AOCS Ea 6-94 | mín. 80 | 80,660 |
| Sódio (Sodium) | % (m/m) | AOCS Ea 2-38 | Anotar (Record Only) | 1,92 |
| Densidade a 20°C (Density at 20°C) | g/ml | ASTM D5453 | 1,20 a 1,30 | 1,26 |
| Índice de Acidez (Acid Value) | mgKOH/g | AOCS Cd 3d-63 | Anotar (Record Only) | 1,3 |

Observação:

Os resultados desta análise têm significação restrita e se aplicam somente às amostras analisadas.
A reprodução deste Certificado somente pode ser total e depende da aprovação formal deste laboratório.
Os métodos utilizados neste(s) ensaio(s) apresentam-se conformes em relação ao método referenciado. Caso o ensaio tenha apresentado desvios, adições ou exclusões, estes estarão listados no item informações adicionais.

| | |
|-----------------------------------|---|
| Atestado por (Certificate by): | Ronir de Souza Campos <i>Ronir de Souza Campos</i> |
| Registro no CRQ (CRQ Register #): | CRQ - 16200045 - 16ª Região |

APÊNDICE 2 – Certificado de Qualidade Quitosana



INDÚSTRIA E COM. IMP. E EXP. LTDA

CERTIFICADO DE ANÁLISES

| Controle de Qualidade – Produto acabado | |
|--|-------------------|
| PRODUTO ACABADO | : QUITOSANA EM PÓ |
| FABRICANTE | : POLYMAR |
| LOTE | : 010912 |
| DATA FABRICAÇÃO | : 09/2012 |
| DATA VALIDADE | : 09/2015 |

Armazenamento: Armazenar a temperatura ambiente de 20 - 30°C, em recipiente perfeitamente fechado, protegido da luz e umidade.

| | TESTE | ESPECIFICAÇÃO | RESULTADOS |
|----|--|---------------------------------------|---|
| 01 | Identificação | Conforme prescrito | De acordo |
| 02 | Aparência | Pó de cor creme e odor característico | De acordo |
| 03 | Aspecto da solução em ac. acético a 1% | Cor variando de amarelo a creme | De acordo |
| 04 | Densidade aparente | Informativo | 0,32 g/ml |
| 05 | Granulometria | 95,0% passa em 80 mesh | De acordo |
| 06 | Perda por dessecação | 10,0 % máx | 9,30 % |
| 07 | Cinzas totais | 2,0 % máx | 1,35 % |
| 08 | pH | 7,0 – 9,0 | 7,90 |
| 09 | Viscosidade | < 200 cPs | 50 cPs a 20°C, LVt 31, torque de 11,7 % |
| 10 | Grau de desacetilação | 85,0 % min | 86,30 % |

Controle Químico:

01/2013

APÊNDICE 3 – Implicações no uso de glicerina bruta na dieta de ruminantes

“Este texto foi preparado baseado em minha experiência com a condução de experimentos utilizando glicerina bruta na dieta de ruminantes”

A glicerina bruta, coproduto da indústria do biodiesel tem sido empregado na alimentação animal como ingrediente energético. Assim, pesquisas com uso de glicerina tem sido conduzidas especialmente em substituição ao milho grão da dieta de ruminantes. No Brasil, estudos tem sido conduzidos para avaliar o uso da glicerina na dieta de bovinos de leite, corte, ovinos e caprinos; sejam mantidos em confinamento ou criados à pasto.

Por se tratar de um produto líquido, o uso da glicerina traz algumas complicações práticas: necessidade de recipiente para seu transporte e armazenamento; misturador apropriado para promover mistura da glicerina ao concentrado. Em nosso estudo especificamente, a glicerina foi transportada e armazenada em bombonas de 200 L; no entanto, por se tratar de embalagem grande e pesada quando cheia, maneja-lá manualmente é trabalhoso, havendo a necessidade de máquina para seu manuseio adequado. Ainda, bombonas de 200 L normalmente contém apenas uma ou duas pequenas saídas, onde adapta-se torneiras para escoar o líquido; atividade que as vezes pode se tornar trabalhosa e demorada.

Para sua mistura ao concentrado utilizamos um misturador horizontal com capacidade de 500 kg. Este equipamento facilitou a adição e homogeneização da glicerina ao concentrado, uma vez que em nosso estudo foram utilizados até 21% da MS de inclusão de glicerina a dieta de vacas leiteiras, ou seja, aproximadamente 42% do concentrado. O concentrado era preparado semanalmente utilizando o misturador horizontal e armazenado em sacos comuns de armazenamento de concentrado até sua utilização. O que podemos observar que altas inclusões de glicerina 21% da MS da dieta (\pm 42% do concentrado) produziu um concentrado muito úmido, havendo necessidade de uso de embalagens, sacos plásticos para armazenamento desse concentrado especificamente, ou caso contrário a glicerina escorria da embalagem e a perdíamos. Ainda, o concentrado da dieta 21% de glicerina (\pm 42% do concentrado) a partir do 3 dia

após preparo do concentrado formava blocos duros que adquiriam o formato em função de como foram armazenados; assim, era necessário que diariamente os blocos de concentrado fossem desintegrados manualmente para retorná-los a sua forma farelada e facilitar sua mistura ao volumoso da dieta, silagem de milho em nosso caso especificamente. Assim, inclusões de glicerina acima de 14% da dieta ($\pm 28\%$ do concentrado) não são recomendadas em situações em que o concentrado precise ficar armazenado por um período até sua utilização.

Porém em fazendas comerciais, desde que haja estrutura adequada de armazenamento (tanques, bombonas, etc.) a mistura da glicerina as dietas pode ser realizada com uso de vagões de mistura total, ou serem misturados ao concentrado em inclusões de até 14% da dieta.

Mais um fator importante a se destacar é qualidade da glicerina, pois no Brasil encontramos glicerina bruta contendo de 40 a 80% de glicerol, ou seja, contém alta quantidade de contaminantes tais como extrato etéreo, água, minerais (especialmente sódio) o que influenciará diretamente o consumo e desempenho dos animais quando da sua suplementação. Lembrando que os dados observados no presente estudo foram obtidos com glicerina bruta contendo 80% de glicerol. Assim, diante do observado no presente estudo e de dados disponíveis na literatura para se observar repostas positivas com uso de glicerina bruta em dietas para ruminantes faz se necessário que esta contenha no mínimo 80% de glicerol.

APÊNDICE 4 – Implicações no uso de quitosana na dieta de ruminantes

“Este texto foi preparado baseado em minha experiência com a condução de experimentos utilizando a quitosana na dieta de ruminantes”

A quitosana co-produto da indústria pesqueira derivado da quitina é um biopolímero natural, biodegradável e atóxico tem sido proposta com usos diversos em diferentes áreas como na indústria farmacêutica, cosmética, alimentos e agropecuária. Por sua ação antimicrobiana, pesquisas tem sido desenvolvidas em nutrição de ruminantes para uso da quitosana como um modulador da fermentação ruminal alternativo ao uso de ionoforos.

Por se tratar de um produto seco e em pó (farelada) não há grandes dificuldades para se usar quitosana na alimentação de ruminantes; a mesma pode ser adicionada ao concentrado durante o preparo da mistura e armazenada normalmente até uso do concentrado. O que precisa ainda ser estabelecido em pesquisas futuras é realmente qual melhor dose para uso nas diferentes espécies e categorias de ruminantes; pois, em nosso estudo por exemplo a utilização de 225 mg/kg PC (dose máxima usada no presente estudo) melhorou a fermentação ruminal e a produção de leite.

O que pode ser hoje um entrave ao uso de quitosana na nutrição de ruminantes em larga escala é o preço de aquisição da mesma. No Brasil, sobre meu conhecimento existem três indústrias que produzem quitosana em larga escala, localizadas na região nordeste e sul do país. Atualmente, podemos adquirir quitosana em embalagens de 25 kg que são entregues nas diferentes regiões do país via transportadora; porém, realmente não sei relatar aqui qual seria o procedimento e prazo de entrega para uma grande quantidade (toneladas) de quitosana. Uma coisa está clara, a quitosana funciona como modulador de fermentação ruminal e tem grande potencial para uso na nutrição de ruminantes; no entanto, acredito que ainda são necessárias mais pesquisas com a quitosana nas diferentes espécies de ruminantes e fases de produção para realmente afirmarmos a dose a ser utilizada para alcançarmos melhoras no desempenho animal e redução de impacto ambiental, já que mesma melhora o padrão de fermentação no rúmen podendo assim reduzir a perda de energia por produção de metano por exemplo.