

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

**INFLUÊNCIA DA QUITOSANA E DO GRÃO DE SOJA CRU E INTEGRAL  
SOBRE AS FASES DAS DIGESTAS RUMINAL E RETICULAR E  
METABOLISMO NITROGENADO EM BÚFALOS**

**DAYANE DE SOUZA SILVA**

**SALVADOR - BAHIA  
JULHO - 2016**



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

**INFLUÊNCIA DA QUITOSANA E DO GRÃO DE SOJA CRU E INTEGRAL  
SOBRE AS FASES DAS DIGESTAS RUMINAL E RETICULAR E  
METABOLISMO NITROGENADO EM BÚFALOS**

**DAYANE DE SOUZA SILVA**  
Zootecnista

**SALVADOR - BAHIA  
JULHO - 2016**

**DAYANE DE SOUZA SILVA**

**INFLUÊNCIA DA QUITOSANA E DO GRÃO DE SOJA CRU E  
INTEGRAL SOBRE AS FASES DAS DIGESTAS RUMINAL E  
RETICULAR E METABOLISMO NITROGENADO EM BÚFALOS**

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

Área de Concentração: Produção de Ruminantes

Orientador: Prof. Dr. José Esler de Freitas Júnior  
Co-orientador: Prof. Dr. Gleidson Giordano Pinto de Carvalho

**SALVADOR - BA  
JULHO - 2016**

**PARECER DE DEFESA DO TRABALHO DE DISSERTAÇÃO  
FORNECIDO PELA SECRETARIA**

*“Para chegar onde a maioria não chega  
É preciso fazer algo que a maioria não faz”*

*Bill Gates*

*À Natalie, mon ange du ciel*

## AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da UFBA pela oportunidade de cursar o Mestrado, aos Professores: Aureliano Pires, Edson Mauro, José Esler, Luis Fernando, Robson Oliveira, Stefanie Alvarenga e Vanessa Michalsky, pela difusão de conhecimento ao longo destes três semestres da minha formação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia - FAPESB pelo apoio da bolsa de mestrado concedida.

Ao meu estimado orientador, Prof. Dr. José Esler de Freitas Júnior pela oportunidade e honra de tê-lo como meu mentor desde a graduação. Obrigada pela confiança e pelo desafio experimental. Obrigada pela infinita compreensão, paciência, orientação, dedicação profissional, discussões construtivas, apoio e aprendizado. Obrigada por sempre estar me impulsionando no meio científico e me mostrar que não existe o “Eu não consigo”, hoje sei que existe o “Eu posso!”, basta querer. Gratidão eterna pela inspiração profissional.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Gleidson Giordano Pinto de Carvalho pelas oportunidades e conselhos. Trabalhar com o Prof. sempre será um privilégio.

Ao Prof. Dr. José Esler pelo projeto inovador com búfalos na UFBA, Ao Prof. Dr. Jeferson Gandra pela formulação das dietas experimentais, ao Diretor Prof. Dr. Lisboa pela doação dos búfalos experimentais, ao Prof. Dr. Fabiano Silva pela realização da cirurgia de fistulação ruminal dos búfalos experimentais, ao Prof. Dr. Gleidson Giordano Pinto de Carvalho pelo auxílio financeiro indireto (via CNPq) do trabalho e à Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Kécya Moita pela doação da quitosana.

Aos funcionários da Fazenda Experimental da UFBA em Entre Rios, principalmente a Nerivaldo pela amizade e dedicação aos animais pré-experimental, aos funcionários da Fazenda Experimental da UFBA de São Gonçalo dos Campos, Sr. Geovane, Edgar, “Seu Zé”, Dil, Duca e Roberto pelo auxílio no manejo dos animais e apoio experimental.

À equipe experimental, que encarou o trabalho com seriedade e dedicação pelo “desconhecido”: Laís, Antônio, Victor, Maria Leonor, Lucas Bulcão e Filipe. Aos colaboradores: Mayara Miranda, Tainá “*Menininha*”, Renato, Profª Drª Camila Maida, Camila Oliveira, Thanielle, Lucas Feitosa, Fleming, Caterine, Jaqueline, Daniel, Tércia, Leonardo, Marconi Félix, Liliana Bury, Liliane Silva, “*Mirinha*”, Henry, Adin, Messias, Deise, Elaine, Bruna, Paula Rocha, Dayanne Sanders e as gêmeas Taiana e Tatiana. Obrigada a todos vocês por fazerem parte desta experiência com os búfalos Montanha, Orelhinha, Anônimos, Capitão e Teimoso.

À Profª Drª Stefanie Alvarenga pela concessão dos Laboratórios Lana, Laninha e Multiuso para preparação e análise das amostras. À Profª Drª Mara Lúcia pela concessão do Laboratório de Fisiologia Animal da UESB e à equipe, George, Msc. Weiber, Drª Taiala, Drª Alana, Karine e Erick pelos ensinamentos e auxílio sobre as análises de urina. Ao Prof. Dr. Aureliano Pires pela concessão do Laboratório de Forragicultura e Pastagem da UESB e ao técnico José Queiroz pelo auxílio nas análises químico-bromatológicas. Ao Prof. Dr. Vagner Leite e equipe pela concessão do Laboratório de Solos para realização das análises químico-bromatológicas das digestas ruminal e reticular.

Aos colegas que me acompanharam nessa jornada do mestrado: Laís, por ter sido meu braço direito nessa caminhada científica, pelo aprendizado, e crescimento científico. À Maria Leonor, pelo auxílio intelectual de sempre. Ao Antônio Carneiro por ter sido meu braço esquerdo nessa caminhada científica. À Paula pela disponibilidade de sempre e empenho pelo o que realiza: “*Cabelinho de anjo*” também te agradece! À todos os colegas da Pós Graduação, em especial: Maria Leonor, Paula, Antônio, Victor, Sylvania, Caroline, Bárbara, Alessandro, Maria José, Vanja, Bruna, Cíntia, Mayara e Nelson pelo grupo de estudos!

Ao Prof. Dr. José Esler e ao doutorando Henry Daniel pelo auxílio no processo estatístico dos dados experimentais.

Às *Petites filles*, doutorandas Laís Bezerra e Maria Leonor por estarem sempre “aqui” por mim. Obrigada pela oportunidade maravilhosa de trabalharem no experimento de vocês. Obrigada Laís pelo senso de justiça e por sempre estar me impulsionando.



Obrigada Maria por ser tão altruísta. Obrigada pelo auxílio nas análises laboratoriais e na revisão da dissertação!

Aos doutorandos Lais Bezerra e Henry Daniel pelo auxílio na construção do artigo científico.

Aos meus pais Vânia e Elias, minhas irmãs Débora e Heloise, e sobrinhas Mariana e Alice. Obrigada por serem a Minha Família, pois quem tem família, tem tudo. Obrigada pelo apoio, companheirismo, cumplicidade, auxílio psicológico e financeiro. Vocês são o meu porto seguro. Gratidão.

Ao Marconi Félix pelo apoio, paciência e colaboração financeira inicial ao experimento.

À minha irmãzinha italiana de coração Laisa Mendonça do Bonfim pela amizade de 10 anos e pelo auxílio financeiro para conclusão deste trabalho. *Lontano dagli occhi, vicino al cuore!*

*À mon amie française Msc. Léa Guinard pour ses soutiens moraux et financiers, qui m'ont aidé à la réalisation de ce travail. Je t'aime bien, ma belle!*

Aos meus BF's amados: Vick Scantlebury, Caio Matias, Jonh Felisberto, Ivanês Lian e Beatriz Mendes pelos momentos descontraídos e apoio.

À Banca examinadora, Dr<sup>a</sup> Luana Rufino e Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Mara Lúcia. Obrigada pela contribuição científica.

A todos aqueles que contribuíram diretamente e indiretamente para realização deste trabalho. Um sonho que se sonha junto, não é mais sonho, é uma realidade.

**LISTA DE GRÁFICOS**

Gráfico	Título	Página
Gráfico 1 -	Relação entre o volume urinário observado e o volume urinário estimado no dia 1 (a), dia 2 (b) e dia 3 (c) de coleta em búfalos Murrah.....	45

## LISTA DE TABELAS

Tabela	Título	Página
Tabela 1 -	Composição químico-bromatológica dos ingredientes utilizados nas dietas experimentais.....	25
Tabela 2 -	Composição químico-bromatológica das dietas experimentais.....	25
Tabela 3 -	Efeito das dietas experimentais sobre o consumo de matéria seca (CMS), peso corporal (PC) e escore de condição corporal (ECC)....	31
Tabela 4 -	Composição químico-bromatológica da digesta ruminal com a separação da fase sólida (FS) e fase líquida (FL) de acordo com as dietas experimentais.....	33
Tabela 5 -	Composição químico-bromatológica da digesta reticular com a separação da fase sólida (FS) e fase líquida (FL) de acordo com as dietas experimentais.....	34
Tabela 6 -	Efeito do sítio de amostragem sobre a composição químico-bromatológica da fase sólida e fase líquida das digestas ruminal e reticular.....	36
Tabela 7 -	Balanço de nitrogênio (N) de acordo com as dietas experimentais..	37
Tabela 8 -	Excreção e absorção de derivados de purinas totais (DPT) e estimativa de síntese de proteína microbiana (SPM) das amostras da coleta de urina total de acordo com as dietas experimentais.....	39
Tabela 9 -	Excreção de derivados de purinas totais em mmol/dia e em porcentagem (%DPT) de acordo com o número de dias de coleta de urina total.....	41
Tabela 10 -	Médias das excreções urinárias de alantoína, derivados de purinas totais (DPT), purinas absorvidas (Pabs) e da produção de nitrogênio microbiano (Nmic) estimadas com três dias de coleta de urina <i>spot</i> 4 horas pós-prandial.....	42
Tabela 11 -	Médias das excreções urinárias de alantoína (Ala), ácido úrico (AcU), xantina e hipoxantina (Xt+Ht), derivados de purinas totais (DPT) em mmol/dia e da produção de nitrogênio microbiano (Nmic) em gN/dia, expressas por dia e por método de coleta (total <i>x spot</i> ).....	43
Tabela 12 -	Médias e coeficiente de variação (CV%) obtido e estimado do volume urinário total (VUT) de acordo com o número de dias e por método de coleta (total <i>x spot</i> ) .....	44
Tabela 13 -	Médias das excreções urinárias de creatinina obtida com três dias de coleta de urina total.....	46

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

AGNE	Ácidos graxos não esterificados
AGV	Acido graxo volátil
ATP	Adenosina trifosfato
BN	Balanço de nitrogênio
CLA	Ácido linoleico conjugado
CMS	Consumo de matéria seca
CNF	Carboidratos não-fibrosos
CO	Controle
CT	Carboidratos totais
CV	Coeficiente de variação
DNA	Acido desoxirribonucleico
DP	Derivados de purinas
DPT	Derivados de purinas totais
ECC	Escore de condição corporal
EE	Extrato etéreo
EPM	Erro padrão da média
FDA	Fibra em detergente ácido
FDN	Fibra em detergente neutro
FDNcp	Fibra em detergente neutro corrigido para cinzas e proteína
FDNi	Fibra em detergente neutro indigestível
FDNpd	Fibra em detergente neutro potencialmente digestível
FL	Fase líquida
FS	Fase sólida
GS	Grão de soja
GSI	Grão de soja integral
H	Horas
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
Kg	Quilos
L	Litro
LIG	Lignina
mg	Miligramas
MM	Matéria mineral
mm	Milímetros
MO	Matéria orgânica
MS	Matéria seca
N	Nitrogênio
NDT	Nutrientes digestíveis totais
Nmic	Nitrogênio microbiano
NNP	Nitrogênio não proteico

NR	Nitrogênio ruminal
NRC	Nutrition Research Council
NT	Nitrogênio total
NUP	Nitrogênio ureico plasmático
Pabs	Purinas absorvidas
PB	Proteína bruta
PC	Peso corporal
PDR	Proteína degradável no rúmen
pH	Potencial hidrogeniônico
Pmic	Proteína microbiana
PNDR	Proteína não degradável no rúmen
QT	Quitosana
QT+GSI	Quitosana x Grão de soja integral
RNA	Ácido ribonucleico
SCAG	Sais de cálcio de ácidos graxos
SPM	Síntese de proteína microbiana
TGI	Trato gastrointestinal
VUT	Volume urinário total
Xt+Hx	Xantina + hipoxantina

## SUMÁRIO

RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1 Quitosana como aditivo alimentar para ruminantes.....	3
2.2 Gordura protegida para ruminantes.....	5
2.2.1 Grão de soja .....	6
2.3 Caracterização das digestas ruminal e reticular .....	10
2.4 Metabolismo nitrogenado .....	14
2.4.1 Excreções urinárias .....	17
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	23
3.1 Local, animais, instalações e manejo experimental .....	23
3.2 Dietas experimentais e análise dos alimentos .....	24
3.3 Coletas das digestas ruminal e reticular .....	27
3.4 Excreções urinárias .....	28
3.4.1 Balanço de compostos nitrogenados.....	29
3.4.2 Derivados de purinas e síntese de proteína microbiana .....	29
3.5 Análises estatísticas.....	30
3.5.1 Digestas ruminal e reticular .....	30
3.5.2 Excreções urinárias .....	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	31
5. CONCLUSÕES .....	47
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E IMPLICAÇÕES.....	48
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
ANEXOS .....	60

## Influência da quitosana e do grão de soja cru e integral sobre as fases das digestas ruminal e reticular e metabolismo nitrogenado em búfalos

### RESUMO

Objetivou-se neste estudo avaliar a influência da quitosana e grão de soja cru e integral sobre a composição das fases sólida e líquida das digestas ruminal e reticular e sobre o metabolismo nitrogenado através das excreções urinárias utilizando três dias de coleta em dois tipos de métodos (coleta de urina total e *spot*) em búfalos Murrah. Foram utilizados quatro búfalos, com peso corporal de  $351 \pm 15$  kg (média  $\pm$  desvio padrão), com aproximadamente 24 meses, machos castrados, canulados no rúmen, distribuídos em um quadrado latino 4 x 4, alimentados com as seguintes dietas: 1) Controle (CO), composta por uma dieta basal constituída por concentrado a base de milho moído, farelo de soja, mistura mineral e ureia; 2) Quitosana (CO+QT), composta pela dieta 1 com a inclusão de 150 mg/kg de peso corporal de quitosana incubada via cânula ruminal; 3) Grão de soja integral (GSI), composta pela substituição total do farelo de soja pelo grão de soja na dieta basal; e 4) Grão de soja + quitosana (GSI+QT), composta pela dieta 3 com a inclusão de 150 mg/kg de peso corporal de quitosana incubada via cânula ruminal. A quitosana e o grão de soja integral não alteraram a composição das fases das digestas do rúmen e do retículo. Entretanto, a interação da quitosana com o grão de soja integral promoveu maior teor de MS na fase líquida do retículo. O balanço de compostos nitrogenados foi positivo para todas as dietas, porém não houve influência da quitosana e/ou grão de soja. Com relação aos derivados de purinas, a quitosana com interação do grão de soja integral proporcionou maiores excreções de hipoxantina e xantina, porém não alterou a concentração dos derivados de purinas e nitrogênio microbiano. Quando foram avaliados nos três dias de coleta, as metodologias de coleta de urina total e *spot* não diferiram entre si, com relação às excreções de derivados de purinas totais e nitrogênio microbiano. O valor médio de creatinina encontrado no presente experimento foi de 18,07 mg/Kg/PC ou  $79,93 \text{ mg/Kg}^{0,75}$  ou  $0,71 \text{ mmol/Kg}^{0,75}$ .

**Palavras-chave:** Balanço de N, creatinina, derivados de purinas, Murrah, N-microbiano

## **Influence of chitosan and whole raw soybean over the phases of ruminal and reticular digestas and nitrogen metabolism in buffaloes**

### **ABSTRACT**

The objective in this study was to evaluate the influence of chitosan and whole raw soybean over the solid and liquid phases of rumen and reticular digestas and the nitrogen metabolism through of the urinary excretions using three collection days on two types of methods (collection of total and *spot* urine) in Murrah buffaloes. Were used four buffaloes, with a body weight of  $351 \pm 15$  kg (average  $\pm$  standard deviation), approximately 24 months of age, castrated, cannulated in the rumen, distributed in a 4 x 4 latin square, fed with the following diets: 1) control (CO), composed for a basal dieta with a concentrate with ground corn, soybean meal, mineral mixture and urea; 2) Chitosan (CO+CT), composed of the Diet 1 with inclusion of 150 mg/kg/BW of chitosan incubated via ruminal canula; 3) Whole raw soybean (WS), composed by the total replacement of soybean meal in control diet by whole raw soybean; and 4) Whole raw soybean + chitosan (WS+CT), composed of Diet 3 with inclusion of 150 mg/kg/BW of chitosan incubated via ruminal canula. Chitosan and whole raw soybean not changed the composition of the phases from the rumen and reticulum digestas. However the interaction of chitosan with and whole raw soybean promoted higher DM level in the reticulum liquid phase. The nitrogen balance was positive for all diets, but there was not influence of chitosan and/or whole raw soybean. About the purines derivatives, the chitosan and whole raw soybean interaction resulted in higher excretions of hypoxanthine and xanthine, but was not changed the purines derivatives and microbial nitrogen concentrations. Total and spot urine collection methods do not differ when were evaluated in three days of excretions of the total purine derivatives and microbial nitrogen. The average value of creatinine found in this experiment was 18.07 mg/kg/BW or  $79.93 \text{ mg/kg}^{0.75}$  or  $0.71 \text{ mmol/kg}^{0.75}$ .

**Keywords:** creatinine, Murrah, microbial N, N balance, purine derivatives



## 1. INTRODUÇÃO

A bubalinocultura brasileira está em crescente desenvolvimento no país e representa hoje uma alternativa rentável, isso se deve ao fato do búfalo ser adaptável em ambientes com forrageiras de baixa qualidade, sendo que o sistema de criação é exclusivamente extensivo quando o objetivo da criação é a produção de carne, e semi-intensivo quando o objetivo é a produção de leite.

O rebanho brasileiro de búfalos (*Bubalus bubalis*), segundo o IBGE (2011) foi de 1 277 199 cabeças, havendo o norte contribuído com 64% do total de cabeças com destaque para o Pará com 40% do rebanho brasileiro. O nordeste é o segundo maior produtor com 10% do rebanho brasileiro, com o Maranhão, como primeiro Estado do nordeste com 66%, seguido da Bahia, com 22% do rebanho nordestino.

Nas últimas décadas ocorreu um aumento do número de pesquisas realizadas com búfalos devido às particularidades fisiológicas e anatômicas destes animais que possibilitam maior desempenho quando comparado com os bovinos em determinadas situações. Como exemplos, podem ser citadas a maior concentração da população de bactérias da espécie *Fibrobacter succinogenes* (gram -) que das espécies *Ruminococcus flavefaciens* e *Ruminococcus albus* (gram +) em búfalos do pântano (WANAPAT e CHERDTHONG, 2009); maior reciclagem de N para o rúmen através da saliva conferindo maiores valores de pH ruminal (PIMPA et al., 2007); e maior capacidade ruminal e reticular e menor intestino delgado (FRANZOLIN, 1994). Essas diferenças permitem o aumento da digestibilidade da FDN, a redução da excreção de nitrogênio, e consequentemente, aumento da síntese de proteína microbiana (ABLAS et al., 2003).

Entretanto, com poucos estudos na nutrição de búfalos, muito se tem usado estimativas de parâmetros dos bovinos, acarretando em estimativas errôneas, já que búfalos possuem particularidades na sua anatomia, processos digestivos e aproveitamento de nutrientes.

Neste contexto, é preciso considerar a alta correlação produção animal x ingestão de alimentos que decorre do fato que o consumo de alimentos é o principal determinante do ingresso de nutrientes para o entendimento das exigências de manutenção e produção dos animais (CHIZZOTTI et al., 2007). Pois, a alimentação é responsável pela maior parcela dos custos da atividade o que leva produtores e pesquisadores a

testarem alimentos de mais baixo custo e que proporcionem aos animais melhor eficiência alimentar (LEAL, 2005).

O grão de soja na sua forma íntegra começou a ser avaliado por diversos pesquisadores em substituição principalmente ao farelo de soja, por ser considerado um alimento proteico-energético com 38,5% de proteína bruta, 19% de extrato etéreo e 90,5% de nutrientes digestíveis totais (CQBAL 3.0). Além disso, apresenta baixo custo (custo reduzido pela ausência de processamento) e aceitabilidade pelos animais quando adaptados (FREITAS JUNIOR et al., 2013; NAVES et al., 2013; RENNÓ et al., 2015).

Além dos estudos de novos alimentos, uma das formas nutricionais de se aumentar a eficiência produtiva seria manipular a fermentação ruminal com o uso de aditivos, a exemplo dos antibióticos ionóforos que se apresentaram como alternativas promissoras desde a década de 70 (NRC, 2001).

Com características semelhantes aos ionóforos, a quitosana tem despertado o interesse de pesquisadores como modulador natural da fermentação ruminal, uma vez que os antibióticos ionóforos foram proibidos na União Europeia desde 2003 (Regulação 1831/2003/EC), pelo questionamento da resistência microbiana em detrimento da saúde humana (GOIRI et al., 2009a, b; GOIRI et al., 2010; KONG et al., 2010).

Estudos avaliando a nutrição de ruminantes, na maioria das vezes requerem a prática de diversas cirurgias invasivas para a implantação de fístulas ao longo do trato gastrointestinal. Contudo, estas técnicas podem gerar desconforto animal, possivelmente alterando o consumo de matéria seca, influenciando os parâmetros avaliados. Diante desta perspectiva, alternativas metodológicas para estimar o fluxo de nutrientes pós-rúmen têm sido utilizadas, como a amostragem reticular, para minimizar o uso de técnicas invasivas aos animais ruminantes (KRIZSAN et al., 2010; FACIOLA, 2014; FATEHI et al., 2015).

Objetivou-se com este estudo avaliar a quitosana e o grão de soja cru e integral sobre a composição física e química das fases sólida e líquida das digestas ruminal e reticular e sobre o metabolismo nitrogenado através do balanço de N. Além disso, buscou-se avaliar a excreção de derivados de purina e produção de nitrogênio microbiano através do número de dias de coleta de dois tipos de metodologias de coleta de urina (total e *spot*) em búfalos Murrah.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Quitosana como aditivo alimentar para ruminantes

A quitosana, como segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, é derivada da desacetilação da quitina, um componente do exoesqueleto de crustáceos e insetos. É um biopolímero não tóxico e biodegradável utilizado na medicina, indústria farmacêutica, cosmetologia e na preservação de alimentos pela sua atividade antimicrobiana (SENEL e McCLURE, 2004; KONG et al., 2010).

A quitosana como moduladora da fermentação ruminal em substituição aos antibióticos ionóforos, tem maior ação sobre as bactérias gram-positivas do que as gram-negativas, com ação sobre os protozoários e fungos, porém depende do grau de desacetilação, tornando-a eficaz quando maiores graus são conferidos. Sua ação antimicrobiana é justificada a três mecanismos: primeiro, a maior atividade antimicrobiana é encontrada em pH variando entre 4,5 a 5,9, pois em meio ácido, as cargas positivas da quitosana interferem nas cargas negativas das macromoléculas (lipopolissacarídeos e proteínas de membrana) da superfície bacteriana, competindo com o  $\text{Ca}^+$  por cargas negativas, interferindo nas trocas de nutrientes do interior e exterior das células, resultando na morte microbiana; segundo, a quitosana tem um mecanismo que atua como quelante, criando ligações covalentes com minerais essenciais aos microrganismos; e terceiro, estabelece que o baixo peso molecular é capaz de entrar no núcleo da célula microbiana, interagindo com o DNA, interferindo na síntese do RNA mensageiro, afetando a síntese de proteínas (SIGNINI e CAMPANA FILHO, 2001; SENEL e McCLURE, 2004; DUTTA et al., 2009; MARTÍNEZ-CAMACHO et al., 2010).

Em experimentos *in vitro* e *in situ* da nutrição de ruminantes, a quitosana tem modulado a fermentação ruminal, principalmente na concentração dos AGV's, aumentando a concentração de propionato, causando redução na proporção molar acetato:propionato; promoveu a redução da concentração de metano, consequentemente proporcionando melhor aproveitamento da eficiência energética; melhorou a digestibilidade da MS, MO, FDNcp e PB, reduziu a concentração de N-amoniaco no rúmen, indicando que as bactérias celulolíticas foram selecionadas e eficientes no aproveitamento da amônia ruminal para sua síntese e multiplicação (GOIRI et al., 2009a,b; GOIRI et al., 2010; LI et al., 2013).

Diante destes resultados, a quitosana mostrou-se um aditivo promissor na nutrição de ruminantes e muitos pesquisadores avaliaram-na sobre a fermentação ruminal de bovinos. Araujo et al. (2015) testaram níveis de quitosana (0, 50, 100, 150mg/Kg/PC) em nelores alimentados com silagem de milho (60:40) e observaram melhor digestibilidade da MS, PB e FDN; redução do acetato e butirato e aumento do propionato, reduzindo a relação acetato:propionato, favorecendo o incremento de glicose no sangue. Mingoti et al. (2016) testaram níveis de quitosana (0, 50, 100, 150mg/Kg/PC) em vacas leiteiras alimentadas com silagem de milho (50:50) e observaram melhor digestibilidade da MS, MO, PB e FDN conforme foram aumentando as doses. Paiva et al. (2016) testaram níveis de quitosana (0, 75, 150, 225mg/Kg/PC) em vacas leiteiras alimentadas com silagem de milho (63:37) e observaram que a quitosana não teve influência sobre o CMS, porém aumentou a digestibilidade da PB o que acarretou em maiores excreções de nitrogênio no leite, além do aumento do propionato e redução da proporção molar acetato:propionato. Vendramini et al. (2016), observaram o uso de aditivos: óleos essenciais (1g/dia), quitosana (150mg/Kg/PC) e monensina (24mg/Kg.MS) na dieta de vacas leiteiras, e concluíram que a quitosana não influenciou o CMS, a produção e composição do leite, porém melhorou a digestibilidade da PB, possibilitou a redução do acetato e aumento do propionato, acarretando em menor proporção molar acetato:propionato.

Não há estudos na literatura sobre a influência da quitosana sobre a fermentação ruminal de búfalos. Entretanto, estudos com aditivos naturais semelhantes aos mecanismos de ação dos antibióticos ionóforos apresentaram resultados interessantes. Zeoula et al. (2011) avaliaram o uso de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) comparando com a monensina sobre a fermentação ruminal em búfalos Murrah e observaram redução na proporção molar acetato:butirato. Costa Junior et al. (2012) trabalharam com doses de própolis em búfalos Murrah x Jafarabadi alimentados com feno *Cynodon spp.* (70:30) e obtiveram maiores concentrações de butirato no rúmen, aumentando os AGV's de cadeia curta; a digestibilidade da MS, MO, FDN, CT e NDT foram maiores com a adição do própolis.

Diante da perspectiva destes resultados sobre a modulação na fermentação ruminal de búfalos, há a hipótese que a quitosana poderia influenciar a fermentação ruminal de búfalos.

## 2.2 Gordura protegida para ruminantes

A suplementação com gordura é comumente utilizada para aumentar a densidade energética da dieta de ruminantes, principalmente em vacas leiteiras, com o intuito de reduzir o balanço negativo de energia, evitando a manifestação de distúrbios metabólicos, melhorando o desempenho da lactação e reprodutivo, além de facilitar a restituição da condição corporal (HAVERTINE e ALLEN, 2006).

Como o uso de gordura como suplemento ocorre na sua grande maioria com animais em lactação, benefícios são atribuídos pela grande disponibilidade de fontes de gordura insaturada promovendo aumento da eficiência do uso da energia bruta (aumento da ingestão de energia líquida quando a ingestão de MS é reduzida). Assim, quando se adiciona fontes de gorduras na dieta, ocorre a substituição de carboidratos rapidamente fermentáveis por lipídeos possibilitando o melhor consumo de forragem e fermentação ruminal (partição de nutrientes para secreção do leite e qualidade da carne), segundo Palmquist e Mattos (2006).

Esses benefícios não estão somente ligados aos aspectos produtivos, mas também no produto final, pois podem gerar mudanças químicas, físicas e sensoriais em alimentos para trazer benefícios à saúde humana, como os compostos anticarcinogênicos, denominado ácido linoleico conjugado (CLA) contido em alimentos de origem animal. O desenvolvimento de alimentos funcionais e produtos nutracêuticos têm sido cada vez mais estudados e voltados diretamente aos consumidores, o que reflete em segurança e qualidade alimentar (FERNANDES, 2007).

Modificações da suplementação lipídica fornecidas aos ruminantes são realizadas no rúmen pelos microrganismos, sendo a lipase e a biohidrogenação. A lipase consiste na hidrólise dos lipídeos sendo os produtos finais ácidos graxos livres (saturados e insaturados) e glicerol. A biohidrogenação é realizada com a adição de hidrogênio nos ácidos graxos insaturados, denominados ácidos graxos não esterificados (AGNE) tornando-os saturados para a redução da toxidez que os AGNE provocam em bactérias gram-positivas (JENKINS, 1993). A intensidade da biohidrogenação vai depender da fonte e quantidade dos ácidos graxos provindos da dieta, chegando até 90%, apenas escapando os ácidos graxos complexados (JENKINS et al., 2007).

O intuito de se usar gordura protegida na alimentação de ruminantes consiste na sua lenta ou pouca disponibilidade no rúmen e aumento da absorção de ácidos graxos

insaturados no intestino delgado. Isso se deve ao fato de que o fornecimento de ácidos graxos livres acima de 5% da MS na dieta total pode causar efeitos deletérios devido à toxidez em alguns microrganismos do rúmen e provocar uma barreira física na fibra, impedindo a formação do biofilme nas partículas a serem degradadas (JENKINS, 1993).

Na literatura, pesquisadores têm estudado as formas de se complexar os lipídeos e avaliarem o efeito no ambiente ruminal. Os sais de cálcio de ácidos graxos (SCAG), denominados gorduras inertes, foram desenvolvidos com o intuito de aumentar a concentração energética das dietas com a mínima interferência na fermentação ruminal, sofrendo escape da lipólise, conseqüentemente da biohidrogenação. Porém, há ocorrências que o escape da proteção pode chegar até 40% (ALLEN, 2000; NRC, 2001; CHILLIARD et al., 2007). A técnica se mostrou satisfatória, porém onerosa para pequenos e médios produtores, devido ao seu alto custo.

Por outro lado, o uso de sementes oleaginosas na dieta é conhecido por conter fontes de gordura naturalmente protegidas, pois sua liberação no ambiente ruminal vai depender de mecanismos físicos do animal, como o ato de ruminar, triturar e disponibilizar lentamente os ácidos graxos no rúmen (PALMQUIST, 1991; DELGADO et al., 2011; CÔNSOLO et al., 2015).

Dentre as diferentes fontes de gordura naturalmente protegida disponíveis na alimentação de ruminantes no Brasil, o grão de soja como semente oleaginosa destaca-se pela grande disponibilidade e custo compatível com seu rico conteúdo de nutrientes.

### **2.2.1 Grão de soja**

A produção mundial de soja na safra 2014/2015 foi contabilizada em 317 milhões de toneladas, sendo os EUA o principal produtor com 108 milhões de toneladas, seguido do Brasil com 95 milhões de toneladas. A perspectiva da safra 2015/2016 no Brasil é que a produção seja aumentada em até 6,8%, podendo atingir 102,8 milhões de toneladas (CONAB, 2015).

O grão de soja inteiro (GSI) com o pericarpo intacto é resistente à digestão dos microrganismos ruminais, por não permitir a adesão das bactérias, além de possuir uma matriz proteica intacta. Quando os grãos são menos processados, implicam na menor digestibilidade e redução da proteína microbiana (BEAUCHEMIN, 1994). Por esses motivos a utilização do GSI na alimentação de ruminantes tem sido evitada além da possível presença de substâncias tóxicas, sendo a maior preocupação a presença de

fatores que inibem a atividade da tripsina ou quimiotripsina. A presença destes fatores poderia afetar na redução da digestibilidade da proteína da dieta e aumentar a excreção de compostos nitrogenados (McDONALD et al., 2002).

Por possuir elevados níveis de proteínas de qualidade com alta degradabilidade ruminal (PDR), o grão de soja foi alvo de diversos estudos na tentativa de proteger o perfil de aminoácidos, realizando tratamentos térmicos (tostagem, extrusão, peletização) para aumentar a PNDR e inativar fatores antinutricionais à microbiota ruminal, principalmente para vacas de alta produção. Tais processamentos acarretariam no incremento da produção de leite, além da redução de N-amoniaco no rúmen, devido à proteólise bacteriana (DELGADO et al., 2011).

Em contrapartida, com a atribuição do grão de soja integral possuir 38,5% PB, 19% EE e 90,5% NDT, sua contribuição na alimentação de ruminantes com o propósito de fonte proteica, foi considerada, além de ser fonte de gordura protegida e possuir fibra de alta digestibilidade (CQBAL 3.0). A adaptação dos animais ao fornecimento é indispensável, mas geralmente tem aceitabilidade (BARLETTA, 2010). As vantagens da sua inclusão às dietas são a lenta liberação de lipídios no rúmen, recorrente às sementes oleaginosas, pois a maioria dos lipídeos se encontra no germe ou presos a matriz proteica e, portanto há necessidade da degradação da parede celular para que a hidrólise se inicie (PALMQUIST, 1991). Efeitos físicos como o umedecimento salivar e a quebra do grão pela mastigação no ato de ruminar são contabilizados na disponibilidade lentamente dos nutrientes contidos no grão, não superando a capacidade de biohidrogenação dos microrganismos ruminais, impedindo possível perda da digestibilidade da fibra pelo efeito negativo que gorduras insaturadas prontamente disponíveis no rúmen podem causar em bactérias fibrolíticas (PALMQUIST, 1991).

Neste âmbito, diversos estudos têm avaliado a substituição do farelo de soja ao grão de soja integral (GSI) e seu principal impacto a nível econômico é a ausência do processamento do grão (quebra, moagem, extrusão ou peletização), no qual resulta em menores custos de produção. O GSI a nível nutricional, além de ser uma fonte proteica, contribui com fontes lipídicas influenciando a produção animal como a carne com maiores teores de lipídios e leite com maior produção de sólidos (CÔNSOLO et al., 2015).

Delgado et al. (2011) testaram o efeito da PNDR em búfalos mediterrâneos (300Kg) alimentados com feno Coast Cross e concentrado a base de milho moído e grão de soja cru e integral *versus* o grão de soja extrusado (ambos 21,4% na MS). A dieta foi balanceada para conter 14% de PB onde o grão de soja cru integral e o grão de soja extrusado continham 28% e 44% de PNDR e 60,9% e 61,3% de FDN, respectivamente. Estes autores observaram que o nível da PNDR não influenciou a degradabilidade ruminal da dieta. Devido ao nível elevado da PNDR na dieta com grão de soja extrusado, uma redução da fração proteica era esperada no rúmen, o que não aconteceu. É possível que fatores relacionados ao processamento de grãos, teor de MS, teor de carboidrato solúvel, ruminação, taxa de passagem afetam a degradabilidade do grão de soja integral, consequentemente a solubilidade de proteínas no rúmen, indicando que o que mais afeta a degradabilidade da MS seria o teor de FDN, o que estimula maior ruminação e tempo de retenção da digesta no rúmen, disponibilizando proteína e ácidos graxos para biohidrogenação.

Barletta et al. (2012) avaliaram a substituição do farelo de soja pelo GSI (0, 8, 16 e 24% na MS) na dieta de vacas leiteiras e não verificaram diferença no consumo de MS para a inclusão de 16% de GSI na dieta. Freitas Junior et al. (2013; 2014) testaram diversas fontes lipídicas na dieta de vacas leiteiras (óleo de soja, GSI e SCAG), avaliando a inclusão de 16% do GSI. Os autores observaram redução do CMS e nutrientes, porém houve aumento no consumo de EE e maior consumo de FDN quando comparado com os SCAG. Ainda conforme estes estudos, o GSI possibilitou o aumento da digestibilidade do EE e redução dos CNF, porém promoveu redução na produção e gordura no leite; possibilitou maior nitrogênio ureico plasmático, possivelmente pelo alto valor de PDR do GSI. Nenhuma fonte lipídica exerceu influência sobre as excreções de derivados de purina na urina nem na estimativa de síntese de proteína microbiana.

Ao avaliarem o uso do GSI e grão de soja moído a 2 e 4 mm com inclusão de 20% MS na dieta de vacas leiteiras, Naves et al. (2013; 2015) verificaram que houve redução no CMS em todos os tipos de fornecimento do grão de soja. Contudo, o GSI promoveu aumento do consumo de EE e redução dos CNF, promoveu maior energia líquida para lactação e maior concentração de ácidos graxos insaturados no leite. Estes autores recomendaram que o grão de soja pode ser incluso na dieta de forma integral já



que não houve diferenças no fornecimento do grão de soja moído ou fornecido de forma integral. Cònsolo et al. (2015) avaliaram a inclusão de até 24% na MS de GSI na dieta de bovinos e não observaram diferenças no desempenho animal. Entretanto, a carne apresentou maiores concentrações de CLA e maciez conferida em análise sensorial com o uso de 16 e 24% de GSI na dieta de bovinos em terminação.

Rennó et al. (2015) avaliaram a inclusão de 24% de GSI na dieta (MS) de bovinos de corte e vacas leiteiras e perceberam redução no CMS, porém a digestibilidade da MS e da FDN não foram afetadas nem os ganhos produtivos. Os maiores níveis de GSI na dieta, promovem maior excreção do grão nas fezes, pois quando se utiliza sementes inteiras na alimentação animal, percebem-se fragmentos da semente ou sementes inteiras nas fezes dos animais, o que causa a impressão que o alimento não foi bem aproveitado pelo organismo, e que parte dos nutrientes contidos nas sementes foram perdidos nas fezes. Entretanto, a composição de grão de soja na excreta fecal não foi afetada, devido ao coeficiente de digestibilidade não ter sido alterado pela inclusão do GSI. Esses resultados indicam que mesmo os lipídeos sendo protegidos pela matriz proteica em sementes de oleaginosas *in natura*, houve um aproveitamento dos lipídios contidos no grão, já que o valor de extrato etéreo do grão de soja *in natura* é de aproximadamente 20% e o extrato etéreo do grão excretado foi de 5,9%. Portanto, houve aproveitamento dos lipídeos sem efeitos negativos no ambiente ruminal dos animais. Por fim, estes autores concluíram que níveis crescentes de GSI podem ser utilizados em ambas as categorias de bovinos (corte e leite) sem que ocorram prejuízos na produção animal.

Venturelli et al. (2015) incluíram o GSI em 27% da MS na dieta de vacas leiteiras e obtiveram o consumo de MS e CNF reduzidos, porém o consumo de MO, PB e FDN não foram afetados e a energia líquida de produção foi aumentada. Houve decréscimo na produção de leite à medida que foi aumentando a inclusão de GSI na dieta, porém houve aumento de lipídios insaturados, consequentemente maior gordura na composição do leite. O balanço de N e a síntese de Pmic não foram afetados pela inclusão do GSI.

Almeida et al. (2016) testaram o efeito do GSI (12% na MS) e caroço de algodão em substituição parcial ao milho na dieta de vacas leiteiras e observaram que as fontes lipídicas não tiveram efeito na produção de leite ou na composição, porém houve

redução do consumo da MS e CNF para ambas as fontes e aumento do consumo e digestibilidade do EE. O GSI promoveu menores concentrações de amônia ruminal e maiores concentrações de propionato no rúmen, além do maior consumo de N com menores perdas do que o caroço de algodão, entretanto em ambas as fontes lipídicas houve balanço de N positivo sem influência na produção de Pmic.

Gandra et al. (2016a) avaliaram a linhaça, o GSI e os SCAG (16% da MS) na dieta de vacas no período de transição e observaram redução no CMS no pré-parto para todas as fontes lipídicas estudadas. Entretanto, não houve influencia do CMS no pós-parto, pois todas as fontes lipídicas promoveram maior energia líquida no pós-parto. A digestibilidade da PB foi aumentada para a dieta com GSI, além da maior composição de sólidos no leite, mas não afetou o desempenho.

A redução no CMS com a inclusão do GSI pode ser atribuída pelo grão conter alto teor EE, ao qual fornece 2,25 vezes mais energia que carboidratos ou proteínas, proporcionando um *status* energético positivo, controlando o centro da saciedade (ILLIUS e JESSOP, 1996; ALLEN, 2000).

Em parte destes estudos verificou-se que a redução na produção de leite foi devida a redução da fermentação da fibra. A redução da digestibilidade da fibra pode ser justificada pelo lipídeo ficar adsorvido na partícula, formando um filme e impedindo a adesão de bactérias para fermentação ou ainda seu efeito tóxico em bactérias fibrolíticas (JENKINS et al., 2007). A redução da digestão da fibra não está associada à quantidade de GSI na dieta, mas na sua composição, pois GSI é rico em ácidos graxos insaturados (FREITAS JUNIOR et al., 2013).

Apesar de se ter diversos estudos consolidados sobre o nível aceitável do uso de grão de soja integral na dieta de bovinos sem causar efeitos deletérios na fauna ruminal, relatos na literatura são escassos sobre a sua influência no CMS e metabolismo ruminal em búfalos.

### **2.3 Caracterização das digestas ruminal e reticular**

Os animais ruminantes são reconhecidos pela capacidade de coletar, armazenar e processar o alimento fibroso através de fatores físicos (ato de ruminar) e químicos (processo fermentativo), convertendo em substâncias nutritivas que posteriormente são refletidas na produção de carne, leite lã e trabalho. Com quatro estômagos (três pré-

estômagos fermentativos e um estômago químico), os ruminantes possuem função simbiótica com os microrganismos. No seu trato gastrointestinal (TGI), a digesta consiste em partículas, incluindo microrganismos e água, nos quais estão dissolvidos materiais orgânicos e inorgânicos provindos da dieta e das secreções endógenas (DIJKSTRA et al., 2005; BEZERRA et al., 2010).

O rúmen é o principal compartimento fermentativo com maior quantidade de microrganismos. No processo simbiótico, os microrganismos produzem substratos para o animal hospedeiro, como AGV's e proteína microbiana. Para tal processo, os microrganismos requerem um pH ideal, temperatura, anaerobiose, substrato e taxa de passagem da digesta no TGI. Destes, os substratos disponíveis e o pH são os fatores mais importantes para prevalência dos microrganismos no rúmen (VAN SOEST, 1994).

Embora animais ruminantes tenham a capacidade de digerir material fibroso, não se exclui a digestibilidade dos alimentos em relação aos mesmos. Pequenos animais ruminantes são mais seletivos quanto ao tipo de alimento disponível em relação a grandes ruminantes, devido à sua capacidade ruminal e conseqüentemente à taxa de passagem. Pequenos ruminantes possuem TGI menor, e por requererem energia de forma mais rápida, selecionam alimentos volumosos mais tenros com nutrientes concentrados, assim, maior fluxo da digesta (taxa de passagem), enquanto grandes ruminantes não se tornam seletivos, por terem capacidade ruminal maior com maior TGI (VAN SOEST, 1994).

Os búfalos, quando comparados aos bovinos, são animais não seletivos, com anatomia do TGI em proporções diferentes. Franzolin (1994) em revisão sobre as particularidades dos búfalos em relação aos bovinos relata que búfalos possuem maior rúmen e retículo e menor intestino delgado por peso corporal. Com essa diferença anatômica e por possuírem maiores contrações ruminais, acarretam em melhor aproveitamento de alimentos volumosos com alto teor de fibra. Por essa razão, búfalos possuem maior tempo de ruminação chegando a mais de 40% que bovinos produzindo de 50 a 56 L/dia de saliva (PIMPA et al., 2007), 35% superior na mastigação do bolo ruminal fazendo com que a retenção da digesta seja menor em até 30% pela maior proporção de pequenas partículas ruminais que bovinos.

A fauna microbiana ruminal de búfalos no Brasil é diferente em alguns aspectos dos bovinos, mas assemelha-se com os zebus da Índia e Tailândia e parece apresentar

microrganismos idênticos aos búfalos da Indonésia (FRANZOLIN, 1994). Wanapat e Cherdthong (2009) relataram em estudo que búfalos do pântano possuem maior concentração da população de bactérias da espécie *Fibrobacter succinogenes* que das espécies *Ruminococcus flavefaciens* e *Ruminococcus albus*, além de possuírem maior quantidade de protozoários que exercem um pequeno papel sobre a digestibilidade da fibra como os *Diplodiniinae spp.* e *Entodimium sp.*, alcançando maior aproveitamento da fibra de baixa qualidade em relação à bovinos (FRANZOLIN et al., 2002). Logo, uma maior atividade celulolítica é esperada em búfalos.

Outros fatores também estão relacionados com o melhor aproveitamento de alimentos de baixa qualidade em búfalos. Maeda et al. (2007) relataram diversos estudos que devido ao maior número de protozoários, também acarretavam em melhor fermentação de carboidratos estruturais e devido a alta taxa de ruminação, conferia um pH ruminal mais elevado em favor da maior secreção de bicarbonato salivar melhorando o processo fermentativo da MS de alimentos fibrosos.

Embora já se tenha identificado essas particularidades, as funções metabólicas que envolvem o sistema digestivo de bubalinos, ainda não estão bem definidas como em outros ruminantes, pois a digestão de alimentos é um processo complexo que envolve microrganismos, enzimas e ações dinâmicas (ALVES et al., 2009). Isso acaba se tornando alvo de muitos pesquisadores como tentativa de elucidar esses processos, entretanto, pesquisas envolvidas em avaliação de alimentos, muitas vezes submetem os animais a procedimentos cirúrgicos, com a implantação de fístulas nas diferentes partes do TGI, o que pode causar desconforto no animal e estimativas errôneas dos parâmetros digestivos, de um lado devido à redução da ingestão de MS e por outro lado dificuldades inerentes a certos procedimentos (LEAL, 2005).

O destaque internacional visando o bem-estar animal tem sugerido aos pesquisadores a procura por novas metodologias de coletas a técnicas não invasivas, com o intuito da redução do uso de fístulas no TGI. Nesse âmbito, o estudo de compartimentos e sua correlação entre eles começaram a serem objetos de estudos como forma de substituição a aquelas técnicas invasivas.

Com a necessidade de se estudar os contínuos processos digestivos, permitindo estimar a produção de proteína microbiana ou ainda o fluxo de nutrientes, pesquisadores buscaram alternativas não invasivas (ou menos invasivas), a aquelas que exigiam várias

fístulas (ruminal, abomasal/duodenal) em um mesmo animal. O uso da técnica de coleta da digesta omasal em substituição à técnica da coleta da digesta abomasal/duodenal compete na vantagem de se utilizar somente a fístula ruminal, além de que a digesta omasal não ter sofrido influência das secreções abomasais e redução da interferência do N endógeno. Essa técnica consiste em inserir uma mangueira via cânula ruminal, passando pelo retículo, pelo orifício rúmen-reticular e pelo orifício retículo-omasal, coletando a digesta por meio de aspiração a vácuo através de uma bomba. Vale ressaltar que para o uso desta técnica é necessário utilizar marcadores para as fases da digesta, principalmente a fase de grandes partículas, já que para representar a digesta duodenal, essa fase é relativamente menor no duodeno (HUHTANEN et al., 1997; AHVENJÄRVI et al., 2000; VALADARES FILHO et al., 2011; FACIOLA, 2014).

Um dos gargalos da coleta da digesta omasal via cânula ruminal é a dificuldade em coletar amostras que representem a digesta verdadeira, uma vez que o omaso apresenta baixa quantidade de líquidos devido a sua capacidade absorptiva de água, sais minerais e AGV's e por isso considerado um compartimento com pouca motilidade (HUHTANEN et al., 1997; AHVENJÄRVI et al., 2000; DIJKSTRA et al., 2005). Por fim, Faciola (2014) relatou que para o uso de tal técnica, são necessários equipamentos modernos, com mão de obra devidamente treinada, além das limitações inerentes ao animal, como o tamanho (técnica inviável para pequenos ruminantes), a dificuldade em coletar amostras homogêneas e possível redução no consumo de MS.

Krizsan et al. (2010) propuseram uma alternativa à técnica da coleta da digesta omasal, em que consiste no uso da coleta da digesta reticular com a premissa de que com o fluxo da digesta nos compartimentos, as partículas vão sendo digeridas e reduzidas. A amostra representativa da digesta omasal coletada no retículo seria selecionada em até 1 mm, pois a digesta omasal é representada por partículas inferiores a 1 mm. Esta técnica se mostrou promissora, pois a partir da digesta reticular com o uso de marcadores das fases (fase de grandes e pequenas partículas e fase líquida), permitiu avaliar a composição química das digestas e relacionar com o fluxo de nutrientes, uma vez que os compartimentos apresentaram uma pequena diferença na digestibilidade do FDN entre os compartimentos.

Fatehi et al. (2015) aperfeiçoaram a técnica de Krizsan et al. (2010), pois a seleção da digesta verdadeira em até um 1 mm não seria suficiente para representar a

digesta omasal, uma vez que nas fezes, partículas de até 11 mm são encontradas. Assim propuseram um estudo correlacionado com todas as fases (fases de grande, média e pequenas partículas e fase líquida) das digestas ruminal, reticular e omasal comparando com o tamanho de várias partículas excretadas nas fezes.

O estudo das fases da digesta ruminal em búfalos foi relatado por Abdullah et al. (1991), onde utilizaram o Cobalto-EDTA para marcar a fase líquida e o Cromo para marcar a fase sólida com base na partícula média do material fecal (1,4 mm), estimando o fluxo de nutrientes. Entretanto, não há relatos na literatura sobre a composição química das fases das digestas reticulares de búfalos e diferenças no processo digestivo proposta pela metodologia desenvolvida por Krizsan et al. (2010) e Fatehi et al. (2015).

#### **2.4 Metabolismo nitrogenado**

Em ruminantes, o nitrogênio ruminal pode ser oriundo tanto da dieta quanto de forma endógena. O nitrogênio ruminal (NR) provindo da dieta pode ser na sua parte originado a partir de uma fração do nitrogênio não proteico (NNP) e outra fração oriunda da proteína verdadeira, ao qual, se dividem em proteína degradável no rúmen (PDR) e proteína não degradável no rúmen (PNDR). O nitrogênio endógeno é denominado pela soma das partes de N da lise bacteriana, descamações epiteliais e pela reciclagem da ureia (SANTOS, 2006; PEREIRA et al., 2007).

Como no Brasil a alimentação de ruminantes é oriunda basicamente das forragens tropicais, e muitas vezes utilizados métodos de conservação como a silagem, há uma alta contribuição de NNP através das silagens, podendo chegar até 65% devido à proteólise inerente à fermentação no processo de ensilagem, o que em alimentos concentrados, o teor médio é 12%. Já a PDR dietética vai ser degradada pela proteólise dos microrganismos ruminais a peptídeos, aminoácidos e amônia, ao qual vai ser incorporada pelos microrganismos para síntese de proteína microbiana (SPM) (SANTOS, 2006).

No rúmen, enquanto o NNP é rapidamente assimilado pelas bactérias ruminais juntamente com uma fonte de enxofre, a taxa de degradação da PDR pode variar, principalmente em função do tipo do alimento (volumoso ou concentrado) e complexidade (fração proteica). Porém, tanto o NNP quanto a degradação da PDR podem ser afetados pela taxa de passagem ruminal, o que diminui quando há redução do

tamanho da partícula, além de requerer um pH ótimo para a sua degradação. Em búfalos, o pH para digestão da proteína e fibra é maximizada quando se encontra em 6,5 (GANDRA et al., 2011).

Enquanto os peptídeos e aminoácidos são utilizados pelos protozoários e algumas bactérias, a amônia vai ser incorporada pela célula microbiana por difusão passiva, principalmente pelas bactérias celulolíticas e sua eficiência depende entre outros fatores, da disponibilidade de energia da dieta. A amônia que não foi utilizada pelas bactérias, é absorvida pela parede ruminal na sua forma não ionizada ( $\text{NH}_3$ ) à proporção que esta vai se acumulando no rúmen, pois na forma ionizada ( $\text{NH}_4^+$ ), a parede ruminal não absorve. Assim, o baixo pH ruminal, reflete em baixa absorção da amônia, enquanto o pH em níveis aceitáveis para fermentação, aumenta a absorção da amônia ruminal (SANTOS, 2006).

Após absorção pelo epitélio ruminal, a amônia será carreada via veia porta até o fígado e convertida a ureia, pois concentração acima de 2mg/dL de amônia no sangue é considerada tóxica para ruminantes. Rações com alta PDR quando há falta energética na dieta, refletem em maiores concentrações de amônia no fígado, havendo maior gasto energético para converter a amônia em ureia para então ser excretada. Parte da ureia vai para os rins, filtrada nos glomérulos e reabsorvida ao longo dos túbulos renais por difusão passiva, posteriormente à reabsorção de fluidos, sendo reciclada ao rúmen pela saliva ou por difusão do epitélio ruminal (nitrogênio endógeno), e a outra parte, sendo em excesso no metabolismo nitrogenado é excretado via urina. De forma geral, o nitrogênio reciclado (endógeno) para o rúmen é equivalente de 10 a 15% do nitrogênio ingerido pelo animal (MANILC E MARCONDES, 1986; SANTOS, 2006; PEREIRA et al., 2007).

A excreção de ureia na urina uma vez correlacionada com a concentração de nitrogênio ureico plasmático (NUP), também está relacionada com a ingestão de N. Assim, um excesso de ingestão de N, refletirá em todo metabolismo de N, principalmente no NUP, indicando ineficiência utilização da proteína dietética influenciada pelos teores de PDR e PNDR. (VAN SOEST, 1994; VALADARES et al., 1997b; VALADARES et al., 1999; LEAL, 2005).

Para que o nitrogênio seja bem assimilado pelos microrganismos ruminais, necessita-se de um equilíbrio entre a degradação da proteína e carboidratos. Um

sincronismo entre ambas as degradações propicia eficaz fermentação ruminal e ganho produtivo. Porém, quando a proteína é degradada rapidamente e há falta de energia, a concentração de amônia ruminal aumenta, as excreções de compostos nitrogenados aumentam, ocorrendo o aumento da excreção da ureia, o que envolve um custo energético, além da perda de N. Mas, quando há baixa concentração de amônia ruminal, e a degradação da energia ultrapassa a velocidade da degradação proteica, os microrganismos, deficientes em N desviam ATP para o uso de carboidrato e não para a síntese de proteína microbiana (SPM). Em ambos os casos, uma fermentação incompleta é reflexo de dietas com alto PNDR e desbalanço proteína:energia, o que acaba limitando o crescimento microbiano e eficiência da SPM, devido à deficiência de fontes de N, ou na maioria dos estudos, falta de energia (GABARRA, 2001; PEREIRA et al., 2007; ALVES et al., 2009).

A proteína microbiana (Pmic) é maior fonte de proteína metabolizável dos ruminantes, suprindo até 90% dos aminoácidos que chegam ao duodeno, seguido da PNDR e a proteína endógena. Em ruminantes a pasto, a proteína metabolizável oriunda da Pmic pode exceder a 65%, contendo 62,5% de PB, sendo 80% considerada como proteína verdadeira e 20% de ácidos nucleicos (NRC, 2001).

A eficiência da SPM é controlada pela disponibilidade de nutrientes e pelo balanço das quantidades entre energia e proteína, sendo geralmente limitada pela falta de energia e não de proteína, embora esse último possa alterar o CMS, alterando a eficiência (ALVES et al., 2009). Os búfalos possuem alta produção de Pmic quando alimentados com baixa PB e baixa energia na dieta, geralmente alimentados com volumosos forrageiros grosseiros, porém a eficiência de Pmic reduzida (FRANZOLIN, 1994; CHEN et al., 1996), possivelmente pela falta de energia disponível para o sincronismo além da menor taxa de passagem (SILVA et al., 2001; RENNÓ et al., 2008). Dependendo da fonte de carboidratos não fibrosos (CNF), pode ocorrer aumento da produção de AGV e redução da concentração de amônia no rúmen, aumentando a eficiência da utilização de energia e da produção de carne e leite em bubalinos (ALVES et al., 2009).

O metabolismo nitrogenado em búfalos é altamente eficiente quando comparado a bovinos. Em revisão relatada por Maeda et al. (2007), concluíram que búfalos possuem maior atividade celulolítica e melhor aproveitamento de componentes fibrosos, melhor



fermentação de carboidratos estruturais devido ao maior número de protozoários *Diplodiniinae spp.*, maior pH ruminal em decorrência da maior secreção salivar (reciclagem de N), maior poder tampão em função da salivação, altas concentrações de amônia ruminal (devido à alta atividade proteolítica e reciclagem salivar de ureia) e manutenção do balanço de N positivo devido a maior eficiência de utilização do N-amoniaco. Contudo, conclui-se que as vantagens estão principalmente na microbiota ruminal e da baixa taxa de filtração glomerular, aumentando os compostos nitrogenados no metabolismo e assimilando-os (PIMPA et al., 2003; MAEDA et al., 2007; GANDRA et al., 2011).

#### **2.4.1 Excreções urinárias**

Dentre os diversos métodos para avaliar o bom desempenho do metabolismo nitrogenado (avaliações fermentativas do rúmen, concentrações plasmáticas, avaliações de carcaça, ganho produtivos pela produção de leite e carne, etc.), as concentrações dos metabólitos nas excreções urinárias são utilizadas para determinar o balanço de N (através do N ingerido e N excretado das fezes e urina), além de se estimar a síntese de proteína microbiana (através de equações dos derivados de purina).

A urina é na sua maior proporção constituída de água (95%), sais minerais e compostos nitrogenados. A concentração da excreção de compostos nitrogenados na urina é variável em função do volume urinário total e difere entre espécies, estado fisiológico e tamanho dos animais (BRODY, 1945).

A creatinina é um metabólito originado da creatina, formada no tecido muscular de forma não enzimática pela remoção de água do fosfato a uma taxa constante pelo metabolismo proteico (HARPER et al., 1982). Diversos estudos comprovaram que a creatinina é excretada de forma constante e em grandes quantidades pelos rins, devido ao metabolismo não precisar para formar novos compostos e, por estar associada ao tecido muscular é diretamente relacionada ao peso corporal do animal, sendo pouca ou não afetada pela dieta, tornando-a dessa forma um marcador natural do volume urinário total (VUT) (VALADARES et al., 1997b; VALADARES et al., 1999; RENNÓ et al., 2000; PIMPA et al., 2003; LEAL et al., 2007).

Como alguns metabólitos nitrogenados são influenciados pela dieta, podem ocorrer variações das concentrações na excreção do VUT, a coleta de urina total se torna uma metodologia primordial para muitos estudos. Chen e Gomes (1992)

sugeriram que devido às flutuações de certos metabólitos nitrogenados ao longo do dia, seriam necessários pelo menos cinco dias de coleta de urina total para melhor acurácia. Na coleta de urina total, os animais são colocados em gaiolas metabólicas ou ainda ferramentas são utilizadas de forma metodológica como a sonda Folley para fêmeas ou funis coletores para machos. Isso se torna um gargalo metodológico por necessitar demasiadamente de mão de obra treinada, ocorrência de perdas urinárias, possível desconforto animal, possível infecção urinária e prática inviável em estudos realizados a pasto.

Nesta perspectiva, pesquisadores buscaram alternativas para reduzir o número de dias de coleta e metodologias mais simples. A técnica da coleta de urina *spot* consiste na coleta de uma amostra pontual de urina através da massagem da vulva em fêmeas ou prepúcio em machos, sendo a concentração da creatinina na amostra *spot* relacionada como marcador natural do VUT. A premissa é que a partir da concentração da creatinina de uma amostra de coleta de urina total, e esta sendo relacionada com o peso corporal do animal, é possível quantificar essa concentração na urina *spot* e assim estimar o VUT (VALADARES et al., 1999). Entretanto, como animais podem apresentar diferentes proporções de tecido no estágio de desenvolvimento, é possível que haja flutuações nas excreções diárias de creatinina, além do que, se um animal estiver em balanço energético negativo, pode corresponder a excreções de creatinina errôneas, já que nestas condições, o animal mobiliza músculo para produzir energia (TAS e SUSENBETH, 2007).

Estudos com bovinos têm sido realizados para verificar a redução do número de dias e o uso da técnica de coleta de urina *spot* sem prejudicar a acurácia dos parâmetros estudados. Foram testados dias de coletas de urina total com 24 horas até 96 horas e concluíram que não houve diferença no VUT da coleta de urina em 24 H, 48 H e 72 H e que 96 H acarretou em perdas de volume urinário, desconforto e infecção pelo uso de sondas em vacas, problemas estes relacionados pelo uso dessa técnica por longos períodos (VALADARES et al., 1997a). Este estudo foi corroborado por outros autores que também validaram o método da coleta de urina *spot* e concluíram que tanto a coleta de urina total pode ser realizada em 24 H, quanto à utilização do método de coleta de urina *spot* é viável para estimar o VUT, principalmente 4 H pós-prandial, onde este metabólito já teria alcançado seu platô (RENNÓ et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2001;

SILVA et al., 2001; BARBOSA et al., 2006; LEAL et al., 2007; CHIZZOTTI et al., 2008; RENNÓ et al., 2008).

Kozloski et al. (2005) realizaram uma meta-análise de quatro experimentos com coleta de urina total e *spot* de duas em duas horas em ovinos alojados em gaiolas metabólicas durante cinco dias e concluíram que 24 H de coleta de urina total era suficiente. Entretanto, a coleta de urina *spot* não poderia ser obtida através de uma única amostra, visto que as concentrações de creatinina na amostra *spot* flutuaram ao longo do dia e ainda houve diferença entre os experimentos. Assim, sugeriram que para que a coleta *spot* seja realizada em ovinos, uma coleta de urina total 24 H deveria ser realizada e várias coletas *spot* de urinas deveriam ser realizadas ao longo do dia, para a partir da concentração média de creatinina *spot*, estimar o VUT.

No Brasil, não há relatos na literatura sobre pesquisas conduzidas no país da excreção de creatinina urinária em búfalos. Os poucos trabalhos conduzidos (MACHADO, 2014; GANDRA et al., 2011) usaram número variável de dias de coleta de urina total ou amostras de urina *spot* com estimativas derivadas de bovinos ou de trabalhos estrangeiros, como relatado em Chen et al. (1996) que búfalas Murrah excretam  $0,44 \text{ mmol/Kg}^{0,75}$  de creatinina diariamente e por Dipu et al. (2006), que búfalos Murrah excretam de  $0,66$  a  $0,73 \text{ mmol/Kg}^{0,75}$  de creatinina diariamente.

Vale salientar que estimando o VUT a partir da amostra de urina *spot*, é possível estimar a excreção de outros compostos nitrogenados, como a ureia e os derivados de purina para estimar a SPM (CHIZZOTTI et al., 2008.; RENNÓ et al., 2008). Como a concentração da excreção destes outros compostos nitrogenados podem flutuar em razão da dieta, Gonçalves (2015) afirmou que a variação destes compostos entre os dias de coleta não é devido ao número de dias de coletas em si, mas à estabilidade do consumo de matéria seca (CMS) após período adaptativo à dieta.

Outro composto nitrogenado excretado na urina é a ureia. Sua concentração na urina é dependente da concentração de nitrogênio ureico plasmático (NUP) e à ingestão de N, sendo também usada como indicador do metabolismo nitrogenado, já que altas concentrações de amônia ruminal implicam em maior síntese de ureia. Uma concentração plasmática elevada de ureia indica em maior excreção via urina resultando em perdas nitrogenadas, mas sua excreção pode ser variável também pela taxa de filtração glomerular nos rins e a sua reabsorção indo para a saliva ou rúmen

(OLIVEIRA et al., 2001; SILVA et al., 2001). Em búfalos, essa reabsorção é ocorrida em altas taxas, principalmente pela baixa filtração dos glomérulos ao que permite tempo hábil para maior reabsorção da ureia, refletindo em produção de saliva com maior tamponamento e maiores concentrações de nitrogênio amoniacal no rúmen, além da concentração sérica elevada em torno de 50mg/dL, enquanto Nelores possuem 39mg/dL e vacas holandesas 25,2mg/dL de ureia circulante no sangue (PIMPA et al., 2003; DIPU et al., 2006; MAEDA et al., 2007; GANDRA et al., 2011).

Os derivados de purinas da adenina e guanina excretados na urina, também denominados compostos nitrogenados, são contabilizado pela soma (mmol/dia) dos metabólitos alantoína, ácido úrico, xantina e hipoxantina e da fração endógena, que através de equações, a produção de proteína microbiana (Pmic) pode ser estimada (CHEN e GOMES, 1992). A excreção de derivados de purinas totais (DPT) é correlacionada diretamente ao CMS, possivelmente pelo aumento da taxa de passagem de líquidos e sólidos em animais submetidos a ingestões de MS mais altas, o que diminui a proporção da utilização de energia pelas bactérias para manutenção (RENNÓ et al., 2008). Em búfalos, a excreção de DPT é menor quando comparados a bovinos em até 57%, e a proporção dos metabólicos das purinas podem variar em função do CMS. A alantoína é o maior metabólito excretado, representando entre 60 a 75% dos DPT em búfalos, seguido do ácido úrico e uma baixa excreção da xantina somada à hipoxantina variando entre 1 e 3%; dessa forma, as concentrações de xantina e hipoxantina são contabilizadas como ácido úrico, o que este representa 25 a 40% dos DPT, e que a alantoína pode chegar até 90% da proporção dos DPT a depender da dieta (LIANG et al., 1994; CHEN et al., 1996; PIMPA et al., 2003, DIPU et al., 2006; WANAPAT et al., 2014).

Chen et al. (1996) em estudo com búfalas Murrah, realizaram coleta total de urina durante cinco dias e concluíram que a baixa excreção de derivados de purinas (DP) em búfalos é devida à baixa taxa de filtração glomerular. Estes mesmos autores concluíram que como em bovinos, devido à alta taxa da xantina oxidase no plasma, fígado e intestino, a xantina e a hipoxantina não foram computadas como soma dos DPT por não haverem quantidades significantes na urina, sendo somente consideradas as concentrações de alantoína (90% DPT) e ácido úrico (10% DPT) com coeficiente de

variação em 31% entre os dias de coleta e 13% entre os animais. A média de alantoína excretada foi de 20 mmol/dia e ácido úrico 2 mmol/dia.

Pimpa et al. (2003) testaram a excreção de DP em búfalos utilizando o ácido úrico ( $^{14}\text{C}$ ) como marcador, com doses de 0 a 95 mmol/dia de derivados de purina da adenina e guanina infundidos via fístula duodenal e os resultados mostraram que somente 12% dos DPT infundidos foram excretados na urina e o mínimo excretado foi de 12,8 mmol/dia. Estes autores concluíram que os DPT são perdidos por vias não renal, sendo que a taxa de recuperação dos DP no plasma pode ser 12% superior que em bovinos.

Com base no estudo de Chen et al. (1996), diversos estudos (PIMPA et al., 2003; WANAPAT e PIMPA, 1999; DIPU et al., 2006; MACHADO, 2014) têm relacionado a ausência de quantidades de xantina e hipoxantina, considerando somente a soma das concentrações de alantoína e ácido úrico como DP ou ainda considerando somente a concentração de alantoína pela equação proposta por Liang et al. (1994) como forma de DP. Por outro lado, Gandra et al. (2011) em experimento com búfalos e bovinos, contestaram e foram encontrados níveis significativos de xantina e hipoxantina na urina de búfalos, chegando até 5% dos DPT enquanto a alantoína teve 90% e o ácido úrico 5% dos DPT.

Os DPT são analisados na urina como forma de estimar a síntese de proteína microbiana (SPM) no rúmen. É uma metodologia não invasiva, simples como alternativa às pesquisas que utilizam animais com fístulas ruminais e/ou duodenais para estimar a SPM (VALADARES et al., 1999; TAS e SUSENBETH, 2007; SERRANO e SIERRA, 2011; SANTANA JÚNIOR et al., 2015).

A síntese de proteína microbiana é realizada no rúmen, e estes microrganismos contêm na sua composição ácidos nucleicos, formados por nucleotídeos. Cada nucleotídeo é formado por uma pentose de açúcar, um fosfato e uma base nitrogenada (purina ou pirimídica). Assim, há a premissa que o fluxo de ácidos nucleicos no duodeno é oriundo predominantemente a partir da lise microbiana. Há também uma pequena parte de ácidos nucleicos oriundos da dieta, da saliva e da descamação do epitélio ruminal, mas a sua participação no fluxo duodenal é insignificante. Após lise dos microrganismos, no duodeno, os ácidos nucleicos microbianos são hidrolisados à nucleosídeos e bases purinas (adenina e guanina), onde após absorção pelo epitélio

intestinal, parte é convertida em hipoxantina, xantina, onde são oxidadas pela xantina oxidase e convertida a ácido úrico. No fígado, o ácido úrico é oxidado pela uricase à alantoína. Esses metabólitos, não sendo utilizados pelos tecidos, são excretados via urina (FRANZOLIN, 1994; CHIZZOTTI et al., 2007; TAS e SUSENBETH, 2007).

Os DPT são analisados na urina como forma de estimar a SPM no rúmen, que tem como premissa que a excreção de DP está diretamente relacionada com absorção de purinas no duodeno. A recuperação incompleta das purinas absorvidas (Pabs) tem sido reportada por Chen e Gomes (1992), sendo a saliva e o leite as principais rotas não renal para excreção de DP. A taxa de recuperação das Pabs em bovinos é 85% e em ovinos 84% (CHEN e GOMES, 1992), enquanto que em búfalos, a taxa é mais baixa representando 74% (DIPU et al., 2006), devido à alta taxa de reabsorção nos rins, sendo 22% recuperados via saliva (PIMPA et al., 2007).

A fração endógena que pode ser estimada em função do peso metabólico do animal, foi determinada em búfalos por quatro estudos: Liang et al. (1994), determinaram que a fração endógena representava 20% do peso metabólico, enquanto Dipu et al. (2006) obtiveram aproximadamente 12% do peso metabólico de DP endógena em búfalos Murrah, corroborando com Pimpa et al. (2003); já Thanh e Orskov (2006) obtiveram 32% do peso metabólico de fração endógena de DP para bezerros búfalos. Em bovinos leiteiros, a fração endógena foi representada por 24 e 51% do peso metabólico por Chizzotti et al. (2007). Dessa forma, a contribuição endógena pode variar entre animais e depende da condição fisiológica durante o jejum estudado nestes animais, embora o jejum não represente a verdadeira contribuição na excreção e sim em relação ao peso metabólico (ORELLANA BOERO et al., 2001) ou ainda devido à atividade da xantina oxidase nos diferentes tecidos (CHEN et al., 1996).

A partir da excreção de DPT, equações foram desenvolvidas para estimar a SPM ruminal, a partir da digestibilidade dos microrganismos, onde 70 é o conteúdo de N nas purinas (g N/mol); 0,83 é a digestibilidade intestinal das purinas microbianas; e 0,116 representa a relação N purina: N total das bactérias (CHEN E GOMES, 1992), sendo que a alantoína, o ácido úrico e xantina junto à hipoxantina contém 35,4%, 33,3% e 36,8% de N, respectivamente (LIANG et al., 1994).

Embora a alantoína seja o DP maior excretado na urina em relação aos DPT, pode ocorrer variações nas proporções dos mesmos, principalmente em relação ao tipo de

dieta (PEREZ et al.,1997). O ácido úrico pode ser o mais afetado na excreção, de acordo com o nível de PB na dieta, onde dietas mais ricas em PB, desde que não sincronizadas corretamente com a energia para produção microbiana ruminal, pode acarretar em maiores excreções do mesmo (CHEN et al., 1990). Conseqüentemente, quando a excreção de ácido úrico é aumentada, indica maiores concentrações de hipoxantina e xantina também, por serem precursoras do ácido úrico (PEREZ et al., 1997). Dietas com baixa PDR, refletem em menor proporção molar do ácido úrico (REYNAL et al., 2005), provavelmente pela saturação da enzima uricase.

De forma geral, a alantoína é o maior metabólito excretado, variando de 27,6 a 37,4 mmol/dia em búfalos (WANAPAT e PIMPA, 1999; GANDRA et al., 2011; KANG et al., 2012; MACHADO, 2014). Estas variações na literatura podem ser esclarecidas pelo tipo de dieta ou o estado fisiológico do animal, sendo que na dieta, o tipo de volumoso é o que mais afeta, onde dietas ricas em silagem oriunda de alimentos proteicos acarretam em maiores excreções de ácido úrico, enquanto a silagem de gramíneas aumenta a proporção molar da excreção de alantoína. Porém, quando avaliado a proporção molar dos DPT, a variação da alantoína é normalmente baixa, mas não necessariamente influenciada pela dieta ou pelo estado fisiológico do animal.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Local, animais, instalações e manejo experimental**

O experimento foi conduzido na Fazenda Experimental da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia (EMEVZ-UFBA), situada em Mercês, distrito da cidade de São Gonçalo dos Campos, no período de março a julho de 2014. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética do Uso de Animais (CEUA) sob o Protocolo n°43/2013 (ANEXO 1).

Foram utilizados quatro búfalos machos, castrados, da raça Murrah, com idade aproximada de 24 meses, peso corporal de 351±15 Kg (média ± desvio padrão) e 2,6 de escore de condição corporal, fistulados no rúmen, providos de cânulas de látex de 4 polegadas de diâmetro. Os animais foram mantidos em regime de confinamento, alojados em baias individuais com piso e cochos de alvenaria providos de bebedouros automáticos.

As unidades experimentais foram distribuídas aleatoriamente em um quadrado latino 4x4, constituído por quatro tratamentos e quatro períodos, sendo 12 dias para adaptação às dietas experimentais e 11 dias destinados à coleta de dados, perfazendo um total de 23 dias por período. O peso corporal (PC em Kg) e o escore de condição corporal (ECC) variando de 1 a 5 (EDMONSON et al., 1989), foram avaliados a cada início de período e após os dias de adaptação aos tratamentos. Durante o período experimental, pela manhã antes do manejo alimentar, os animais foram soltos em curral de descanso para que pudessem se exercitar, e, após uma hora do manejo alimentar, foi aspergida água sobre os animais para bem-estar dos mesmos.

### 3.2 Dietas experimentais e análise dos alimentos

As dietas experimentais foram formuladas segundo Cornell Net Carbohydrate and Protein System (CNCPS 5.0) e distribuídas em quatro tratamentos: 1) Controle (CO), composta por uma dieta basal com concentrado a base de milho moído, farelo de soja, mistura mineral e ureia; 2) Quitosana (CO+QT), composta pela dieta 1 com a inclusão de 150 mg/kg de peso corporal de quitosana<sup>1</sup>; 3) Grão de soja integral (GSI), composta pela substituição total do farelo de soja pelo grão de soja na dieta basal; e 4) Grão de soja + quitosana (GSI+QT), composta pela dieta 3 com a inclusão de 150 mg/kg de peso corporal de quitosana. Foi utilizada a silagem de sorgo como volumoso na proporção de 75:25 (V:C) em todas as dietas (Tabelas 1 e 2).

Ambas as dietas foram pesadas diariamente, sendo o volumoso e concentrado misturados no cocho, compondo a ração total. A dieta total e água foram ofertadas “*ad libitum*”, sendo que a ração total foi dividida em dois ofertados, às 8 H e às 15 H. A concentração de quitosana de cada animal foi pesada no início de cada período experimental de acordo com o peso corporal dos animais e foi incubada via cânula ruminal no momento de ambos ofertados. As sobras de cada ofertado foram coletadas e pesadas diariamente para estimativa do consumo de MS, onde se calculou um percentual de 5 a 10% das sobras do ofertado do dia anterior para que não houvesse limitação do consumo.

---

<sup>1</sup>Polymar® Indústria e Cia-CE/BR: 20g/Kg de matéria mineral, 7-9 de pH, viscosidade <200 cPs e 95% de desacetilação.



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

Item (g/Kg de MS)	Silagem de sorgo	Farelo de soja	Milho moído	Grão de soja
Matéria seca	307,0	949,2	932,1	952,6
Matéria orgânica	946,8	923,8	982,9	940,3
Matéria mineral	53,2	76,2	17,1	59,7
Proteína bruta	82,0	433,5	89,4	351,1
Extrato etéreo	36,4	20,8	41,1	175,3
Carboidratos totais	828,4	469,5	852,4	413,9
Fibra em detergente neutro	642,6	143,3	152,4	240,4
FDN <sub>cp</sub> <sup>1</sup>	585,9	134,6	152,4	240,4
Carboidratos não-fibrosos	185,8	362,2	700,2	173,5
Fibra em detergente ácido	447,2	74,3	26,2	126,4
FDN <sub>i</sub> <sup>2</sup>	183,9	17,2	28,9	16,5
Lignina	97,7	5,2	6,4	18,8
NDT <sup>3</sup>	550,0	804,5	857,3	905,3

<sup>1</sup>fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteínas segundo CQBAL 3.0; <sup>2</sup>fibra em detergente neutro indigestível; <sup>3</sup>nutrientes digestíveis totais (NRC, 2001).

Tabela 2 – Composição químico-bromatológica das dietas experimentais

Ingrediente (% MS)	Dietas experimentais <sup>1</sup>	
	CO	GSI
Silagem de sorgo	750,0	750,0
Milho moído	134,8	98,0
Farelo de soja	60,2	-
Grão de soja	-	100,0
Ureia	9,0	6,0
Sal comum	6,0	6,0
Mineral <sup>2</sup>	40,0	40,0
Composição química (g/Kg de MS)		
Matéria seca	468,4	469,1
Matéria orgânica	898,2	900,4
Matéria mineral	101,8	99,6
Proteína bruta	125,2	122,2
Extrato etéreo	34,1	48,8
Fibra em detergente neutro	543,3	549,9
Carboidratos totais	0,0	0,0
Carboidratos não-fibrosos	320,8	301,6
Nutrientes digestíveis totais	641,2	649,0

<sup>1</sup>CO-dieta controle, GSI-dieta grão de soja; <sup>2</sup>composição mineral por Kg do produto: 128g de cálcio, 44g de fósforo, 178g de sódio, 12g de enxofre, 5g magnésio, 107mg de cobalto, 1,25g de cobre, 50mg de cobre, 50mg de iodo, 750mg de manganês, 12mg de selênio, 3,7g de zinco, 1,4g de ferro e 440mg de flúor.

Amostras dos ingredientes da ração e das sobras foram coletadas após os dias de adaptação de cada período experimental. No fim de cada período, formou-se um *pool* das amostras cotidianas representando assim, uma amostra composta de ingredientes e de sobras, armazenadas e congeladas em *freezer* para posteriormente realização das análises químico-bromatológicas.

As análises químico-bromatológicas foram realizadas no Laboratório de Forragicultura e Pastagem da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), no *Campus* de Itapetinga-BA. As amostras da silagem e das sobras por período, foram pré-secas em estufas de ventilação a ar a 65°C por 72 horas e em seguida moídas em peneiras de crivo de 2 e 1 mm.

A matéria seca (MS) foi determinada de acordo com o procedimento n° 950.05 (AOAC, 2000); a matéria mineral (MM) foi determinada após combustão da matéria orgânica em mufla a 600°C por 4 horas segundo procedimento n° 942.05 (AOAC, 2000); para determinação do teor de matéria orgânica (MO), foi utilizada a equação  $MO (g/Kg) = 100 - MM (g/Kg)$  descrito por Zaklouta et al. (2011); o teor N total (NT) foi realizado através do procedimento n° 990.03 (AOAC, 2000) e multiplicado pelo fator 6,25 para determinar o teor de proteína bruta (PB); o extrato etéreo (EE) foi determinado pelo procedimento n° 920.39 (AOAC, 2000). Os teores de fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente neutro corrigido para cinzas e proteína (FDNcp) fibra em detergente ácido (FDA) e lignina (LIG) foram determinados pela metodologia descrita por Van Soest et al. (1991).

Os carboidratos totais (CT) foram estimados pela fórmula  $CT = 100 - (\%PB + \%EE + \%MM)$  segundo Sniffen et al. (1992) e; os carboidratos não-fibrosos (CNF) foram estimados pela fórmula proposta por Hall (2000):  $CNF = 100 - [(\%PB - \%PB_{ureia} + \%ureia) + \%EE + \%MM + \%FDN]$

Os nutrientes digestíveis totais foram estimados segundo NCR (2001), onde  $NDT = PBd + FDNd + (EEd * 2,25) + CNFd$ . A FDNi foi obtido segundo metodologia de Casali et al. (2008), entretanto, o tempo de incubação das amostras nos búfalos foram de 288 horas (KRIZSAN et al., 2015) após período adaptativo, a fim de obter-se estimativas mais precisas da fração indigestível das amostras.

Nas sobras foram determinados os teores de matéria seca (MS) para estimativa do consumo de matéria seca (CMS) e teores de proteína bruta (PB) para o balanço de compostos nitrogenados.

### **3.3 Coletas das digestas ruminal e reticular**

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

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

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

Após período experimental, todas as amostras das digestas ruminal e reticular foram descongeladas no laboratório da Fazenda Experimental do EMEVZ-UFBA. As oito sub-amostras de cada digesta foram homogeneizadas formando uma amostra composta por animal, por período, contabilizando 16 amostras compostas representativas (4 digestas/animal  $\times$  4 períodos). Sendo assim, as digestas ruminal e reticular foram pesadas (Kg) e separadas em amostra de fase sólida e amostra de fase líquida por malha de 1 mm de porosidade. Após separação das fases das digestas ruminal e reticular, as amostras das fases foram pesadas (Kg), pré-secas em estufa de ventilação forçada a ar à 65°C, moídas em peneiras de crivo de 2 e 1 mm e então acondicionadas em frascos plásticos para análises de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), matéria mineral (MM), fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente neutro indigestível (FDNi), utilizando-se as mesmas metodologias descritas nas análises dos ingredientes das rações. A fibra em detergente neutro potencialmente

digestível (FDN<sub>pd</sub>) foi obtida pela fórmula:  $FDN_{pd} \text{ (g/Kg)} = FDN \text{ (g/Kg)} - FDN_i \text{ (g/Kg)}$ .

### 3.4 Excreções urinárias

No 17º, 18º e 19º dia de cada período experimental foram realizadas as coletas de urina total e *spot*. A coleta de urina total foi desenvolvida durante três dias consecutivos (72 horas), onde foram acoplados aos animais como dispositivo de coleta, funis interligados à mangueira de polietileno que conduziam a urina até um galão plástico individual (BARBOSA et al., 2006). Assim, a cada micção, a urina era pesada (Kg) e transferida para um tonel com 100 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 20%. A cada 24 horas, a urina foi pesada (Kg), aferido o volume urinário total (L) por dia, homogeneizada e retirada alíquotas de 100 mL de urina onde tiveram o pH ajustado para valores inferiores a 3, a fim de evitar a degradação bacteriana dos derivados de purinas e precipitação do ácido úrico (CHEN e GOMES, 1992), em seguida foram acondicionadas em frascos plásticos e congeladas para posteriores análises laboratoriais.

Concomitantemente aos dias de coleta de urina total, foram realizadas as coletas de urina *spot* quatro horas pós-prandial. Foram coletadas alíquotas de 50 mL de urina pura através de micção espontânea, sendo 40 mL para análise dos compostos nitrogenados totais e creatinina e 10 mL de urina diluída em 40mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 0,036N, para análise dos derivados de purina. Cada amostra foi filtrada, acondicionada em pote plástico e congelada para posteriores análises laboratoriais.

As análises das excreções urinárias foram realizadas no Laboratório de Fisiologia Animal da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), no *Campus* de Itapetinga-BA.

As concentrações de creatinina foram obtidas das amostras de urina total e *spot* através do método de Jaffé modificado, de acordo com o *Kit* K016 da Bioclin. O volume urinário total (VUT, L), estimado a partir das amostras *spot*, foi calculado pela excreção média de creatinina (mg/Kg/PC) encontrada na média dos três dias de coleta de urina total por período do experimento e dividida pela concentração (mg/L) na amostrada urina *spot* após 4 horas pós-prandial (OLIVEIRA et al., 2001).

### 3.4.1 Balanço de compostos nitrogenados

No 18º dia de cada período experimental foi realizada a coleta total de fezes (24 horas) (Barbosa, 2005). A excreção fecal total foi pesada (kg) e uma alíquota de 10% foi tida como amostra. Foram realizadas análises de MS (procedimento nº 950.05) e NT (procedimento nº 990.03) do AOAC (2000). Os valores da excreção fecal de N foram expressos em gramas por dia (g/dia).

Alíquotas da urina total do 18º dia foram tidas como amostras para determinar excreção de nitrogênio urinário, onde se adotou o procedimento nº 990.03 (AOAC, 2000). Estimou-se o teor de nitrogênio pela quantidade N g/100mL de urina encontrado na amostra, multiplicando-se pelo valor urinário total.

O balanço de compostos nitrogenados foi calculado pela diferença entre o nitrogênio ingerido (consumo de N) pelo teor de nitrogênio total em gramas das fezes (g/dia) e urina (g/dia), obtendo-se os valores de N retido (g/dia) e em porcentagem do nitrogênio total consumido.

### 3.4.2 Derivados de purinas e síntese de proteína microbiana

Para quantificar a excreção de derivados de purinas totais (DPT, mmol/dia) nas amostras de urina total e *spot*, foram realizadas análises de: ácido úrico, por teste enzimático colorimétrico através de *Kit* comercial, K139 da Bioclin; xantina e hipoxantina, pelo método enzimático e alantoína pelo método colorimétrico, ambos os métodos descritos por Chen e Gomes (1992).

As purinas microbianas absorvidas (Pabs, X, mmol/dia) foram estimadas a partir da excreção de derivados de purinas totais (DPT, Y, mmol/dia), proposta pela equação de Dipu et al. (2006):

$$Y = 0,74X + (0,117PC^{0,75})$$

Em que: Y é a excreção derivados de purinas totais, dada pela soma das excreções de alantoína, ácido úrico, xantina e hipoxantina na urina (mmol/dia); 0,74 representa a recuperação de purinas absorvidas (mmol/dia); e 0,117 representa a excreção endógena de derivados de purinas em bubalinos.

A síntese de N microbiano (Nmic, g/dia) foi estimada a partir das purinas absorvidas (X, Pabs mmol/dia), proposta pela equação de Chen e Gomes (1992):

$$Nmic \text{ (g/dia)} = 70X / (0,83 \times 0,116 \times 1000) = 0,727X$$

Em que: 70 é o conteúdo de N nas purinas (mg N/mol); 0,83 é a digestibilidade intestinal das purinas microbianas; e 0,116 representa a relação N purina: N total das bactérias. Para a estimativa da síntese de proteína microbiana (SPM), multiplicou-se a quantidade do N<sub>mic</sub> (gN/dia) pelo fator 6,25. A eficiência da P<sub>mic</sub> foi determinada pela SPM (100g) dividida pelo consumo de NDT (Kg).

### 3.5 Análises estatísticas

Para análise estatística das variáveis estudadas, foi utilizado o delineamento experimental em um quadrado latino 4x4, com quatro animais, quatro períodos e quatro tratamentos experimentais, de acordo com o modelo matemático:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + P_j + T_k + e_{ijk}$$

Em que,  $Y_{ijk}$  = variáveis observadas do i-ésimo animal, j-ésimo período e k-ésimo tratamento;  $\mu$  = média geral do experimento para a variável;  $A_i$  = efeito do i-ésimo animal, variando de 1 a 4;  $P_j$  = efeito do j-ésimo período, variando de 1 a 4;  $T_k$  = efeito o k-ésimo período, variando de 1 a 4; e  $e_{ijk}$  = erro aleatório devido ao animal, período e tratamento.

#### 3.5.1 Digestas ruminal e reticular

Os dados obtidos das digestas ruminal e reticular e os dados do sítio de amostragem foram submetidos à análise de variância pelo PROC MIXED (efeito do animal considerado como aleatório). Para testar o efeito dos tratamentos, adotou-se um modelo fatorial 2x2 (dieta com e sem inclusão de gordura protegida; e tratamento com e sem quitosana como aditivo). Foram testados os efeitos da inclusão de gordura protegida, da quitosana e da interação entre ambos. Quando houve efeito entre os tratamentos, foi realizado o teste de médias Tukey, pelo PROC LSMEANS do pacote estatístico SAS 8.0. Adotou-se um nível de significância de 5% para todas as variáveis.

#### 3.5.2 Excreções urinárias

Os dados obtidos das excreções urinárias totais e *spot* foram submetidos à análise de variância pelo PROC MIXED (efeito do animal considerado como aleatório) para testar o efeito das dietas e de ambas as metodologias de coleta. Para testar o efeito dos tratamentos, adotou-se um modelo fatorial 2x2 (dieta com e sem inclusão de gordura protegida; e tratamento com e sem quitosana como aditivo). Foram testados os

efeitos da inclusão de gordura protegida, da quitosana e da interação entre os dois. Quando houve efeito entre os tratamentos, foi realizado o teste de médias Tukey, pelo PROC LSMEANS. Para a correlação do volume urinário obtido e estimado, utilizou-se o PROC REG do pacote estatístico SAS 8.0. Adotou-se um nível de significância de 5% para todas as variáveis.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As dietas experimentais não influenciaram o CMS, o PC e o ECC dos animais (Tabela 3). A média de peso corporal (PC) dos animais no início do experimento foi de  $351 \pm 15$  Kg. Os resultados de PC e ECC permitem a conclusão da escolha dos animais na tentativa de melhor distribuí-los nos tratamentos através de um estado fisiológico semelhante, para reduzir o erro experimental.

Tabela 3 – Efeitos das dietas experimentais sobre o consumo de matéria seca (CMS), peso corporal (PC) e escore de condição corporal (ECC)

Item	Dietas experimentais <sup>1</sup>				EPM <sup>2</sup>	Valor de P <sup>3</sup>		
	CO	CO+QT	GSI	GSI+QT		QT	GSI	GSI*QT
CMS (kg/dia)	9,26	9,36	8,64	8,7	1,13	0,89	0,28	0,97
PC (kg)	390,63	380,13	381,25	391,08	8,37	0,99	0,96	0,56
ECC	3,85	3,75	3,8	3,75	0,18	0,85	0,95	0,95

<sup>1</sup>controle (CO), controle+quitosana (CO+QT), grão de soja integral (GSI), grão de soja integral+quitosana (GSI+QT); <sup>2</sup>erro padrão da média; <sup>3</sup>quitosana (QT), grão de soja integral (GSI) e interação (GSI\*QT) à 5% de significância.

A ausência do efeito das dietas sobre o CMS demonstra que não houve influência do grão de soja e/ou da quitosana sobre a taxa de passagem ou aceitabilidade dos animais, não interferindo dessa forma no CMS. Rodrigues et al. (2001) observaram que Búfalos Jafarabadi (362 Kg) consumiram 9,09 Kg de MS quando foram alimentados com silagem de capim elefante e sorgo (60:40), representando o CMS de 2,51% Kg/PC/dia. No presente experimento, o CMS médio foi de 2,33% Kg/PC/dia com proporção V:C de 75:25. Ablas et al. (2003) observaram o CMS de 7,2 Kg na MS quando ofertaram feno e concentrado (80:20) para búfalos Mediterrâneos e observaram que a melhor taxa de passagem foi a dieta com maior volumoso (80:20), com maior consumo e degradabilidade da MS e FDN. Búfalos possuem maior capacidade de digerir a

FDN quando a forragem é de baixa qualidade, mas quando a forragem é de boa qualidade, esse mesmo efeito não é observado. Dietas com fontes de rápida fermentação (concentrado) além de reduzirem o CMS o aproveitamento da utilização da proteína e energia são pouco viáveis em relação aos bovinos, devido a maior população de microrganismos celulolíticos (MAEDA et al., 2007; CAMPANILE et al., 2010).

Resultados diferentes dos observados pelos autores acima foram verificados por Pereira et al. (2007), que trabalharam com búfalos Murrah (455Kg) e testaram níveis de concentrado (0, 24, 48 e 72%) e proteína (8, 11, 14, 17%) na dieta a base de feno, milho moído e farelo de soja. Os autores observaram que maiores níveis de concentrado e proteína acarretavam em maior CMS. O melhor nível de concentrado e proteína foi respectivamente de 24% e 11%, com CMS de 8,5 Kg, resultados estes, semelhantes ao presente estudo (Tabela 3).

Avaliando os resultados sobre os aditivos alimentares, Costa Junior et al. (2012) trabalharam com doses de própolis em búfalos Murrah x Jafarabadi alimentados com feno *Cynodon spp.* (70:30) e o própolis não influenciou o CMS. Araujo et al. (2015), Mingoti et al. (2016), Paiva et al. (2016) e Vendramini et al. (2016) testaram doses de quitosana variando de 0 a 225 mg/Kg/PC em bovinos (corte e leite) alimentados com 50 a 60% de silagem de milho em como parte volumosa na dieta, e em todos os estudos o CMS não foi afetado pela quitosana independente da sua concentração fornecida.

Em diversos estudos (FREITAS JUNIOR et al., 2013; 2014; NAVES et al., 2013; 2015; RENNÓ et al., 2015; VENTURELLI et al., 2015; ALMEIDA et al., 2016), o GSI foi testado variando de 12 a 27% na MS da dieta de bovinos leiteiros e de corte e obtiveram redução no CMS. Por outro lado, Barletta et al. (2012) utilizaram 16% de GSI na dieta de vacas leiteiras e o CMS não foi influenciado. Gandra et al. (2016b) trabalharam com novilhas Jersey, fornecendo 16% (MS) de GSI na dieta com silagem de milho (50:50) e usaram a quitosana como aditivo (2g/Kg de MS) e observaram que quando a QT foi usada como aditivo, ocorreu menor ingestão de MS, porém houve maior digestibilidade da MS.

De modo geral, o menor consumo de MS resulta em menor taxa de passagem da digesta e maior digestibilidade da MS (VAN SOEST, 1994), entretanto, nos búfalos com menor consumo, isso não ocorreu. Segundo Maeda et al. (2007), em virtude da menor ingestão, búfalos retêm por mais tempo a digesta no rúmen-retículo, porém, o



tempo de retenção no trato digestivo total é menor, como resultado do menor tamanho do intestino, que reduz o tempo de permanência da digesta.

O CMS é determinado por fatores dietéticos, físicos, e inerentes ao animal que é controlado pelo centro da fome e da saciedade (ILLIUS e JESSOP, 1996; ALLEN, 2000), que também pode variar em função da quantidade e da frequência de ingestão da proporção volumoso:concentrado na dieta.

Tabela 4 – Composição químico-bromatológica da digesta ruminal com a separação da fase sólida (FS) e fase líquida (FL) de acordo com as dietas experimentais

Item	Dietas experimentais <sup>1</sup>				EPM <sup>2</sup>	Valor de P <sup>3</sup>		
	CO	CO+QT	GSI	GSI+QT		QT	GSI	GSI*QT
Matéria natural								
Digesta (Kg)	5,88	6,43	6,38	6,32	0,69	0,88	0,90	0,85
FS (Kg)	4,13	4,40	3,39	4,44	0,48	0,88	0,89	0,92
FL (Kg)	1,75	2,03	2,00	1,89	0,24	0,88	0,83	0,72
FS (%)	70,65	68,36	69,31	72,23	1,48	0,92	0,70	0,43
FL (%)	29,36	31,64	30,69	27,80	1,48	0,92	0,70	0,43
Matéria Seca (%MN)								
FS	20,10	20,52	20,34	19,33	0,38	0,72	0,57	0,39
FL	2,18	2,37	2,10	2,09	0,07	0,51	0,20	0,49
Matéria orgânica (%MS)								
FS	94,06	93,81	93,99	93,80	0,14	0,50	0,90	0,92
FL	64,46	65,20	62,26	64,27	1,15	0,59	0,54	0,80
Matéria mineral (%MS)								
FS	5,94	6,19	6,02	6,20	0,14	0,50	0,90	0,92
FL	35,54	34,81	37,75	35,74	1,15	0,59	0,54	0,80
Fibra em detergente neutro (%MS)								
FS	78,52	80,80	79,97	81,36	0,75	0,26	0,53	0,78
FL	7,91	11,02	15,08	11,46	1,28	0,92	0,15	0,20
Fibra em detergente neutro indigestível (%MS)								
FS	33,43	34,72	31,65	34,83	1,16	0,39	0,74	0,71
FL	3,83	4,47	3,75	3,86	0,22	0,44	0,48	0,58
Fibra em detergente neutro potencialmente digestível (%MS)								
FS	45,09	46,08	48,32	46,53	0,89	0,84	0,35	0,47
FL	4,09	6,55	11,33	7,61	1,25	0,79	0,10	0,21

<sup>1</sup>controle (CO), controle+quitosana (CO+QT), grão de soja integral (GSI), grão de soja integral+quitosana (GSI+QT); <sup>2</sup>erro padrão da média; <sup>3</sup>quitosana (QT), grão de soja integral (GSI) e interação (GSI\*QT) à 5% de significância.

A composição químico-bromatológica da digesta ruminal (Tabela 4) não foi influenciada em ambas as fases (sólida e líquida) da digesta. No presente experimento, as dietas foram formuladas para serem isonitrogenadas (12,5% de PB) e isoenergéticas (65% de NDT). O rúmen é o compartimento onde retém as grandes partículas com estruturas que contém elevada proporção de material digestível, principalmente porque a maioria dos microrganismos se encontra neste compartimento (AHVENJÄRVI et al., 2001). Soares et al. (2007) realizaram avaliação *in situ* de diversos tipos de leveduras em búfalos da raça Mediterrâneo alimentados com cana picada (83:17) e observaram maior degradabilidade da MS, PB, FDN e FDA em amostras do líquido ruminal.

Tabela 5 – Composição químico-bromatológica da digesta reticular com a separação da fase sólida (FS) e fase líquida (FL) de acordo com as dietas experimentais

Item	Dietas experimentais <sup>1</sup>				EPM <sup>2</sup>	Valor de P <sup>3</sup>		
	CO	CO+QT	GSI	GSI+QT		QT	GSI	GSI*QT
Matéria natural								
Digesta (Kg)	5,55	5,55	5,59	5,56	0,02	0,76	0,68	0,76
FS (Kg)	0,54	0,69	0,60	0,67	0,04	0,24	0,79	0,65
FL (Kg)	5,01	4,87	4,99	4,89	0,05	0,24	0,76	0,66
FS (%)	9,72	12,35	10,78	12,02	0,76	0,25	0,82	0,67
FL (%)	90,28	87,65	89,22	87,98	0,76	0,25	0,82	0,67
Matéria Seca (%MN)								
FS	18,09	17,11	17,63	17,26	0,35	0,39	0,84	0,70
FL	1,53	1,47	1,46	1,62	0,03	0,37	0,45	0,04
Matéria orgânica (%MS)								
FS	91,81	91,69	92,40	92,02	0,26	0,66	0,43	0,82
FL	56,48	62,00	59,37	56,85	1,66	0,67	0,75	0,27
Matéria mineral (%MS)								
FS	8,19	8,32	7,60	7,99	0,26	0,66	0,43	0,82
FL	43,53	38,00	40,63	43,15	1,66	0,67	0,75	0,27
Fibra em detergente neutro (%MS)								
FS	76,02	78,71	78,51	77,33	0,70	0,61	0,71	0,20
FL	10,72	10,60	9,29	13,37	1,02	0,37	0,76	0,40
Fibra em detergente neutro indigestível (%MS)								
FS	33,58	34,93	31,84	35,47	0,70	0,09	0,66	0,41
FL	3,51	3,94	3,97	3,50	0,28	0,97	0,98	0,49
Fibra em detergente neutro potencialmente digestível (%MS)								
FS	42,44	43,78	46,67	41,85	0,90	0,33	0,51	0,09
FL	7,20	6,66	5,32	9,87	0,92	0,29	0,72	0,19

<sup>1</sup>controle (CO), controle+quitosana (CO+QT), grão de soja integral (GSI), grão de soja integral+quitosana (GSI+QT); <sup>2</sup>erro padrão da média; <sup>3</sup>quitosana (QT), grão de soja integral (GSI) e interação (GSI\*QT) à 5% de significância.

A composição químico-bromatológica da digesta reticular (Tabela 5) apresentou influência da interação GSI\*QT ( $P=0,04$ ) na fase líquida da MS, entretanto não foi significativo para as demais variáveis. Possivelmente, essa influência da interação sobre a fase líquida da digesta reticular, pode ser atribuída pela barreira física que a gordura proporciona na partícula impedindo a ação da digestão da MS (JENKINS, 1993). Entretanto, as pequenas partículas ou fase líquida da digesta ruminal, são facilmente carregadas para o retículo, devido a sua alta taxa de passagem ou após depleção do substrato a ser fermentado (FATEHI et al., 2015). Wencelowa et al. (2014) avaliando a interação da quitosana (100 mg/L) com óleo de canola e óleo de girassol por meio de culturas *in vitro* verificaram a redução da degradabilidade da MS, principalmente em dietas com alto volumoso, no mais, o uso de suplementação lipídica podem reduzir a degradação da MO e FDN.

Verifica-se que em ambas as digestas, ruminal e reticular (Tabela 4 e 5), os teores de MO foram reduzidos e os teores de MM foram aumentados, devido aos mecanismos sucessivos da digestão, havendo aproveitamento dos nutrientes digestíveis, porém mostra-se que não há absorção de minerais no retículo (KRIZSAN et al., 2010).

Altos teores de FDN foram observados em ambas as digestas ruminal e reticular, principalmente na fase líquida. Fatehi et al. (2015) e Krizsan et al. (2015) indicam que para determinação da FDN e FDNi devem ser contabilizadas somente o teor de MO para que não haja superestimação dos carboidratos fibrosos, ou seja, a FDNcp seria representativa nos processos digestivos por contabilizar a MO da FDN, pois é o teor de FDN que vai controlar a taxa de passagem no retículo.

Quando se avaliou o sítio de amostragem rúmen x retículo (Tabela 6), todas as variáveis avaliadas foram significativas, exceto para os teores de FDN, FDNi e FNDpd da fase líquida. Esses efeitos são esperados, já que ocorre a digestão dos nutrientes, conseqüentemente a redução das partículas nos sucessivos mecanismos da digestão.

Os resultados do sítio de amostragem reticular (Tabela 6) foram semelhantes aos encontrados por Silva (2014), que avaliou diferentes fontes de ácidos graxos na dieta de vacas, e observou os valores de 17,5 e 1,8% na MS, 86,2 e 55,9% na MO e 78,9 e 15,7% na FDN, na fase sólida (partículas maiores que 1 mm) e fase líquida, respectivamente.

Para ambas as fases, quando a digesta foi do rúmen para o retículo, os teores de MS e a MO foram reduzidos e o teor de MM aumentado, principalmente na fase líquida, por ter acesso direto ao retículo. A FDN da fase sólida teve o mesmo comportamento que a MS e a MO, indicando que houve redução da partícula e possivelmente essa característica teria sido observada na fase líquida da FDN, caso tivesse sido corrigida para cinzas e proteína no presente experimento. A FDNi é um marcador natural da fase sólida de partículas com pouco efeito sobre a fase líquida e portanto, esperava-se que esta não fosse influenciada nos sítios de amostragem (KRIZSAN et al., 2015).

Tabela 6 - Efeito do sítio de amostragem sobre a composição químico-bromatológica da fase sólida e fase líquida das digestas ruminal e reticular

Item	Sítio de amostragem		EPM <sup>1</sup>	Valor de P <sup>2</sup>
	Rúmen	Retículo		
Matéria natural (% amostra total)				
Fase sólida	70,14	11,22	5,35	<0,0001
Fase líquida	29,86	88,78	5,35	<0,0001
Matéria seca (%MN)				
Fase sólida	20,07	17,52	0,34	<0,0001
Fase líquida	2,19	1,52	0,07	<0,0001
Matéria orgânica (% MS)				
Fase sólida	93,91	91,98	0,23	<0,0001
Fase líquida	64,04	58,67	1,10	0,01
Matéria mineral (% MS)				
Fase sólida	6,09	8,02	0,23	<0,0001
Fase líquida	35,96	41,33	1,10	0,01
Fibra em detergente neutro (% MS)				
Fase sólida	80,16	77,64	0,55	0,02
Fase líquida	11,37	10,99	0,80	0,82
Fibra em detergente neutro indigestível (% MS)				
Fase sólida	33,66	33,95	0,67	0,83
Fase líquida	3,98	3,73	0,18	0,50
Fibra em detergente neutro potencialmente digestível (% MS)				
Fase sólida	46,50	43,69	0,67	0,03
Fase líquida	7,39	7,26	0,76	0,93

<sup>1</sup>erro padrão da média; <sup>2</sup>Teste F a 5% de significância.

Não houve efeito ( $P>0,05$ ) das dietas sobre os teores de nitrogênio consumido, nitrogênio excretado (fecal e urinário) e nitrogênio retido em g/dia, assim como em

porcentagem do nitrogênio consumido (Tabela 7). O balanço de nitrogênio foi positivo para todos os tratamentos, indicando que houve retenção de proteína no organismo animal, proporcionando condições para que não ocorresse perda de peso nos animais experimentais. Pereira et al. (2007) trabalhando com búfalos Murrah (455Kg), testaram níveis de concentrado (0, 24, 48 e 72%) e proteína (8, 11, 14, 17%) na dieta a base de feno, milho moído e farelo de soja, observaram que maiores níveis de concentrado e proteína proporcionaram maior consumo de PB, o que acarretou em maior excreção de N na urina, entretanto, o BN foi positivo em todas as dietas.

Tabela 7 – Balanço de nitrogênio (N) de acordo com as dietas experimentais

Item	Dietas experimentais <sup>1</sup>				EPM <sup>2</sup>	Valor de P <sup>3</sup>		
	CO	CO+QT	GSI	GSI+QT		QT	GSI	GSI*QT
N consumido, g/dia	182,65	184,55	166,75	171,52	5,7	0,79	0,25	0,91
Excreção fecal								
N ( g/dia)	42,26	51,25	37,67	45,72	3,58	0,28	0,51	0,95
N (%)	23,14	27,77	22,59	26,66	1,62	0,23	0,82	0,79
Excreção urinária								
N (g/dia)	43,66	29,8	29,27	27,91	3,25	0,25	0,22	0,34
N (%)	23,9	16,15	17,55	16,27	2,04	0,33	0,64	0,43
Balanço de N								
N retido (g/dia)	96,74	103,49	99,81	97,89	4,65	0,82	0,9	0,68
N retido (%)	52,96	56,07	59,86	57,07	1,56	0,99	0,41	0,46

<sup>1</sup>controle (CO), controle+quitosana (CO+QT), grão de soja integral (GSI), grão de soja integral+quitosana (GSI+QT); <sup>2</sup>erro padrão da média; <sup>3</sup>quitosana (QT), grão de soja integral (GSI) e interação (GSI\*QT) à 5% de significância.

Wanapat et al. (2014) testaram 100 g/cabeça/dia da casca em pó do mangostão (*Garcinia mangostana*), um aditivo natural substituto aos antibióticos ionóforos, em búfalos do pântano (350 Kg) alimentados com palha de arroz e concentrado (75:25) e observaram que o BN foi positivo para ambos os tratamentos (com e sem aditivo), porém o mangostão não influenciou o BN, sendo as excreções por perdas em 40,4% de N nas fezes e 48,3% de N na urina, proporcionando um balanço de 11,3% de N retido em porcentagem do N consumido. Gandra et al. (2011) trabalharam com búfalos mediterrâneos (515 Kg) alimentados com silagem de milho (75:25) e observaram balanço positivo de N com retenção de 40,94%, sendo as perdas por fezes representando 28,64% e as perdas urinárias por 30,41%. Búfalos excretam mais N na urina devido a alta concentração de N-amoniaco no rúmen e pela alta concentração de ureia

plasmática, logo a forma de excreção é dada através da urina quando em excesso (SULTAN et al., 2009).

Freitas Junior et al. (2013), Venturelli et al. (2015) e Almeida et al. (2016) avaliaram o uso do GSI variando de 12 a 27% na MS da dieta de vacas leiteiras, e verificaram que o GSI não exerceu influência sobre o BN, porém foi positivo em todos os trabalhos.

Mingoti et al. (2016) e Vendramini et al. (2016) observaram que a excreção fecal de N foi reduzida quando se utilizaram 150 mg/Kg/PC de QT em vacas leiteiras. A excreção de N na urina não foi influenciada pela QT, mas houve BN positivo em ambos os experimentos.

Gandra et al. (2016b) avaliando o BN quando utilizaram suplementação de GSI (16%MS) e quitosana (2g/Kg de MS) em novilhas Jersey, observaram que a quitosana promoveu menores perdas de N nas fezes (22,7% do N consumido) e o GSI menores perdas de N na urina (21,3% do N consumido), resultado esse semelhante pela interação significativa da QT+GSI (18,9% do N consumido). A QT, o GSI e a interação QT+GSI mostraram-se significativos para o N retido, onde a dieta QT promoveu menor retenção de N (15,4% do N consumido); e maiores para GSI e QT+GSI, 54,2% e 57,4% do N consumido, respectivamente.

O BN está relacionado principalmente com o CMS, conseqüentemente o consumo de PB e a forma como o N se destina no metabolismo animal. Embora o perfil aminoacídico da dieta CO fosse diferente da dieta GSI (alto PDR), mostra-se que no presente experimento, houve uma boa fermentação e utilização do N em todas as dietas, acarretando em BN positivo com retenção de N superior a 50%. A quitosana nos diversos experimentos citados promoveu menor excreção de N fecal devido a melhor digestibilidade da PB. Campanile et al. (2010), em revisão sobre o balanço de nitrogênio de búfalas leiteiras, compilaram os dados de estudos com diferentes níveis de energia e um nível fixo de proteína e concluíram que mesmo para a dieta com baixa energia, embora o nitrogênio retido fosse menor, ainda assim o de balanço de nitrogênio foi positivo, indicando que búfalas são mais eficientes em reter nitrogênio que outros animais. Os mesmos autores também observaram que quando se aumenta os níveis de concentrado na dieta, mesmo em baixa proporção de concentrado (80:20), a eficiência

do metabolismo do nitrogênio proporciona melhores resultados no balanço de nitrogênio.

Tabela 8 – Excreção e absorção de derivados de purinas totais (DPT) e estimativa de síntese de proteína microbiana (SPM) das amostras da coleta de urina total de acordo com as dietas experimentais

Item	Dietas experimentais <sup>1</sup>				EPM <sup>2</sup>	Valor de P <sup>3</sup>		
	CO	CO+QT	GSI	GSI+QT		QT	GSI	GSI*QT
	mmol/dia							
Alantoína	40,54	31,35	37,4	45,77	2,72	0,88	0,38	0,13
Acido Úrico	10,62	8,85	10,98	13,32	0,65	0,99	0,08	0,17
Xt+Hx <sup>4</sup>	3,95	3,44	3,40	4,39	0,18	0,51	0,60	0,04
DPT	55,12	43,66	51,8	63,46	3,18	0,93	0,25	0,08
Pabs <sup>5</sup>	41,24	30,05	38,17	49,57	3,20	0,93	0,26	0,09
ALA:DPT <sup>6</sup> (%)	69,44	71,75	69,8	72,12	1,45	0,36	0,99	0,96
AcU:DPT <sup>7</sup> (%)	22,26	20,38	22,68	20,68	1,67	0,34	0,83	0,94
Xt+Hx:DPT <sup>8</sup> (%)	8,31	7,87	7,51	7,20	0,48	0,66	0,61	0,97
VUT <sup>9</sup> (L/dia)	11,59	10,29	10,13	13,08	0,82	0,64	0,70	0,24
Nmic <sup>10</sup> (gN/dia)	29,98	21,84	27,75	36,04	2,33	0,93	0,26	0,09
SPM (g/dia)	187,38	136,53	173,46	225,26	14,56	0,93	0,26	0,09
Efic. Pmic <sup>11</sup>	37,12	25,57	37,71	45,39	4,86	0,85	0,33	0,36

<sup>1</sup>controle (CO), controle+quitosana (CO+QT), grão de soja integral (GSI), grão de soja integral+quitosana (GSI+QT); <sup>2</sup>erro padrão da média; <sup>3</sup>quitosana (QT), grão de soja integral (GSI) e interação (GSI\*QT) à 5% de significância; <sup>4</sup>xantina+hipoxantina; <sup>5</sup>purinas absorvidas; <sup>6,7,8</sup>alantoína, ácido úrico e xantina+hipoxantina em percentagem do DPT, respectivamente; <sup>9</sup>volume urinário total; <sup>10</sup>nitrogênio microbiano; <sup>11</sup>Eficiência da síntese de proteína microbiana (100 g Pmic/Kg de NDT consumido).

Para os derivados de purinas totais (DPT) e síntese de proteína microbiana (SPM), as dietas não influenciaram essas excreções (Tabela 8) na urina, exceto para a concentração de xantina e hipoxantina mmol/dia (P=0,04). Gandra et al. (2011) trabalharam com búfalos mediterrâneos (515 Kg) alimentados com silagem de milho (75:25) e observaram presença de xantina e hipoxantina na urina e sugeriram contabiliza-las no DPT. As excreções em mmol/dia foram de 30,17 para alantoína, 1,85 para ácido úrico e 1,66 para xantina+hipoxantina, sendo a proporção de 89,57%, 5,49% e 4,92% de alantoína, ácido úrico e xantina+hipoxantina, respectivamente, em proporção do DPT. A comparação da síntese de Pmic se tornou inviável, uma vez que a equação utilizada foi a de bovinos, superestimando os valores de Pmic quando comparados com o presente experimento. Costa Junior et al., (2012) trabalharam com doses de própolis em búfalos Murrah x Jafarabadi alimentados com feno *Cynodon spp.*

(70:30), porém não foi considerada a excreção de Xt+Hx. A própolis não alterou a excreção de derivados de purina urina e SPM.

Wanapat et al. (2014) em estudo com a casca em pó do mangostão testaram em búfalos do pântano (350 Kg) 100g/cabeça/dia e foram alimentados com palha de arroz (75:25), observaram que o aditivo aumentou a SPM e promoveu maior eficiência microbiana. A equação para estimativa da SPM utilizada por estes autores, foi proposta por Liang et al (1994), ao qual comparada com a equação utilizada no presente experimento (DIPU et al., 2006), forneceriam dados superestimados.

Paiva et al. (2016) e Vendramini et al (2016) testaram níveis de quitosana (variando de 0 a 225 mg/Kg/PC) em vacas leiteiras e não observaram influência no fluxo de Nmic e SPM quando utilizaram a QT como aditivo.

Quando Freitas Junior et al. (2013), Venturelli et al. (2015) e Almeida et al. (2016) avaliaram o uso do GSI variando de 12 a 27% na MS na dieta, verificaram que o GSI não influenciou a SPM em vacas leiteiras.

Gandra et al. (2016b) avaliando o DP e SPM quando utilizou suplementação de GSI (16%MS) e quitosana (2g/KG.MS) em novilhas Jersey, observaram que a QT reduziu a excreção de DPT, conseqüentemente, redução nas Pabs. Não houve influência do GSI na excreção de DP, entretanto foi observada a interação QT+GSI na excreção de ácido úrico (mmol/L) conferindo maiores excreções desse metabólito na urina. Em relação ao fluxo de Nmic e SPM, houve menor estimativa para a QT em detrimento das menores excreções de DP.

Alves et al. (2009) trabalharam com búfalos Mediterrâneo (328 Kg) e avaliaram o melhor sincronismo proteína:energia com quatro níveis de proteína e energia na dieta. Observaram que a melhor relação PB:CNF variou de 0,27 a 0,39, indicando que nestes valores houve melhor sincronismo PB:Energia, criando um ambiente ótimo para a SPM. No presente experimento, o sincronismo variou entre 0,31 e 0,35 entre as dietas (SILVA et al., 2015), indicando que houve eficiência na fermentação para a produção de Pmic (Tabela 8), enquanto que valores próximos de 1, indicam déficit energético. Quando a proteína é prontamente disponível no rúmen, a amônia é acumulada e absorvida pela parede ruminal, indo para o fígado e convertida a ureia, sendo excretado via urina, indicando perdas (TATSAPONG et al., 2010).



Apesar de a QT e GSI não influenciarem as excreções de alantoína e ácido úrico, em mmol/dia, a interação QT+GSI proporcionou aumento da excreção de Xt+Hx (mmol/dia) na urina. Esse resultado sugere que a GSI por conter maiores concentrações de PDR na dieta (DELGADO et al., 2011), possivelmente sofreu maior hidrólise e que quando foi combinado com a QT, foi influenciado pelo efeito antimicrobiano das bactérias gram-positivas, favorecendo as bactérias fibrolíticas, maiores utilizadoras da amônia ruminal para a sua síntese, pois Araújo et al. (2015), Mingoti et al. (2016), Paiva et al. (2016) e Vendramini et al. (2016) observaram maior digestibilidade da PB devido à inclusão da QT como aditivo. Vale salientar que a concentração da xantina oxidase nos tecidos (intestino, fígado e plasma) pode influir sobre os teores de xantina e hipoxantina, pois do mesmo modo que a saturação da enzima uricase promove maiores excreções de ácido úrico na urina (PEREZ et al., 1997), a saturação da xantina oxidase poderia também acarretar em maiores excreções de xantina e hipoxantina na urina.

Wanapat e Pimpa (1999) testaram em búfalos a infusão ruminal de carbonato de amônio em búfalos durante cinco dias e a amônia não mostrou correlação com a excreção de DP na urina, apenas tendência para a excreção de alantoína. As proporções de excreções foram 82% e 18% de alantoína e ácido úrico, respectivamente.

Tabela 9 – Excreção de derivados de purinas totais em mmol/dia e em porcentagem (%DPT) de acordo com o número de dias de coleta de urina total

Item	N° de dias de coleta			Média	EPM <sup>2</sup>	Valor de P <sup>2</sup>
	Dia 1	Dia 2	Dia 3			
Alantoína (mmol/dia)	40,7	40,3	33,4	38,13	2,75	0,48
Acido Úrico (mmol/dia)	12,4	10,7	9,5	10,87	0,65	0,19
Xantina+Hipoxantina (mmol/dia)	3,8	4,0	3,6	3,8	0,18	0,70
DPT (mmol/d)	56,9	55	46,5	53,5	3,18	0,37
Alantoína (%DPT)	70,7	70,4	68,9	70,8	1,45	0,87
Ac. Urico (%DPT)	22,3	21,4	22	21,5	1,68	0,95
Xantina+Hipoxantina (%DPT)	7,00	8,20	9,10	8,10	0,49	0,23

<sup>1</sup>erro padrão da média; <sup>2</sup>Teste F a 5% de significância.

As excreções dos derivados de purinas totais (DPT) não foram influenciadas nos três dias de coleta de urina total (Tabela 9). As porcentagens para excreção média na urina de alantoína, ácido úrico e xantina+hipoxantina foram 70,8%, 21,5%, 8,1%, respectivamente.

Embora os valores de ácido úrico fossem considerados como superestimados de acordo com a literatura, a proporção de DPT é confirmada por Liang et al. (1994), onde a proporção de excreção para alantoína varia de 60 a 75% e de ácido úrico de 25 a 40% em búfalos, sendo a xantina+hipoxantina contabilizadas como ácido úrico excretada na urina. Essas variações são observadas quando há restrição alimentar, pois a excreção de ácido úrico é aumentada e a alantoína diminuída (LIANG et al., 1994).

Os valores para excreção de DP encontrados na literatura para búfalos foram semelhantes ao presente estudos (Tabela 9). Wanapat e Pimpa (1999) observaram valores de 27,6 a 37,4 mmol/dia de alantoína; Wanapat et al. (2012) obtiveram excreções de DPT variando de 4,1 a 6,5 mmol/L, no presente estudo, a média de excreção do experimento foi de 4,7 mmol/L. Kang et al. (2012) obtiveram valores médios de 33,2 mmol/dia de alantoína e Machado (2014) observaram valores médios de 34,73 e 0,64 mmol/dia para alantoína e ácido úrico, respectivamente. Costa Junior et al., (2012) trabalharam com búfalos Murrah x Jafarabadi (519±19 Kg) e observaram excreção de 3,3 mmol/L de alantoína, corroborando com o presente estudo, a excreção de alantoína foi 3,5 mmol/L, porém sendo a proporção de DPT encontrada por Costa Junior et al. (2012) foi de 99,1% e 0,9% para alantoína e ácido úrico, respectivamente.

Tabela 10 – Médias das excreções urinárias de alantoína, derivados de purinas totais (DPT), purinas absorvidas (Pabs) e da produção de nitrogênio microbiano (Nmic) estimadas com três dias de coleta de urina *spot* 4 horas pós-prandial

Item	Nº de dias de coleta			Média	EPM <sup>1</sup>	Valor de P <sup>2</sup>
	Dia 1	Dia 2	Dia 3			
Alantoína (mmol/dia)	29,4	34,5	30,1	31,3	2,85	0,66
DPT (mmol/dia)	45,2	51,5	44,9	47,2	3,2	0,38
Pabs (mmol/dia)	31,4	37,9	31,1	33,5	3,2	0,38
Nmic (gN/dia)	22,9	27,5	22,5	24,3	2,33	0,38

<sup>1</sup>erro padrão da média; <sup>2</sup>Teste F a 5% de significância.

Não houve diferença para as excreções de alantoína e DPT, nem das estimativas das Pabs e Nmic (Tabela 10) entre os três dias de coleta de urina *spot* 4 H pós-prandial. Os valores apresentados ficaram bem próximos das excreções diárias de alantoína e DPT (Tabela 9) e as estimativas de Pabs e Nmic ficaram próximas dos valores obtidos com a coleta total (Tabela 8).

Tabela 11 – Médias das excreções urinárias de alantoína (Ala), ácido úrico (AcU), xantina e hipoxantina (Xt+Ht), derivados de purinas totais (DPT) em mmol/dia e da produção de nitrogênio microbiano (Nmic) em gN/dia, expressas por dia e por método de coleta (total *x spot*)

Itens	Dia 1		Dia 2		Dia 3		Total <i>x spot</i>		CV% <sup>1</sup>	Valor de P <sup>2</sup>
	Obt	Est	Obt	Est	Obt	Est	Obt	Est		
Ala	40,7a	29,4b	40,3a	34,5a	33,4a	30,1a	38,13a	31,3a	49,61	0,05
AcU	12,4	11,7	10,7	13,0	9,5	10,6	10,87	11,72	36,90	0,68
Xt+Ht	3,8	4,0	4,0	4,0	3,6	4,1	3,80	4,00	37,3	0,60
DPT	56,9	42,2	55,0	51,5	46,5	44,9	53,50	47,20	42,64	0,19
Nmic	31,6	22,9	30,0	27,5	23,8	22,5	28,39	24,34	59,13	0,20

Letras minúsculas iguais seguidas na linha não diferem entre si por dia e por método de coleta pelo teste Tukey a 5% de significância. <sup>1</sup>CV% dos métodos de coleta; <sup>2</sup>Teste F dos métodos de coleta a 5% de significância.

Não foram apresentadas diferenças entre os dias de coleta total e *spot* para ácido úrico, xantina e hipoxantina, derivados de purina e nitrogênio microbiano (Tabela 11). Entretanto, as concentrações de alantoína foram diferentes para o observado e estimado no primeiro dia (P=0,04), embora não significativo para os demais dias. Não houve diferenças entre as médias por método de coleta de urina total e *spot* (Tabela 11) para todas as variáveis.

Valadares et al. (1999) e Oliveira et al. (2001) em experimento sobre metodologias de coleta de urina total (24 H) e *spot* 4 horas pós-prandial, afirmaram que ambas as metodologias foram suficientes para estimar as excreções de DP e estimar a Pmic em vacas leiteiras. Chizzotti et al. (2007) trabalharam com vacas de baixa, média e alta produção e testaram as metodologias de urina total 24 H e coleta *spot* 4 H pós-prandial, e observaram diferenças numéricas entre as duas metodologias, porém não significativas, mostrando que a coleta de urina *spot* pode ser utilizada para estimativa de Pmic em vacas leiteiras.

Leal et al. (2007) testaram seis dias de coleta total em vacas leiteiras e concluíram que maior número de dias de coletas acarretam em maiores perdas urinárias e validou que um dia (24 H) de coleta total é suficiente para estimar a produção de Pmic em vacas leiteiras. Barbosa et al. (2006) testaram seis dias de coleta total em Nelores utilizando funis coletores e observaram redução do volume urinário em períodos mais longos de coleta e atribuiu essa perda ao erro experimental, pois funis coletores causam desconforto quando utilizado muitos dias, reduzindo o volume urinário total. Estes

autores validaram que 24 H é suficiente para avaliar as concentrações de alantoína, DPT, Pabs e Nmic e que a coleta de urina *spot* pode ser utilizada para estimar estas variáveis, pois não houve diferença entre as duas metodologias.

Tabelas 12 – Médias e coeficiente de variação (CV%) obtido e estimado do volume urinário total (VUT) de acordo com o número de dias e por método de coleta (total x *spot*)

Itens	VUT (L)		CV%	Valor de P <sup>1</sup>
	Obtido	Estimado		
Dia 1	10,82	13,48	40,14	0,15
Dia 2	11,44	13,50	36,51	0,20
Dia 3	10,53a	13,27a	29,48	0,05
Média	10,93	13,42	-	-
CV%	29,48	34,01	-	-
Valore de P	0,93	0,99	-	-

Letras minúsculas iguais seguidas na linha não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de significância.

<sup>2</sup>Teste F a 5% de significância.

Observando as excreções do volume urinário total (VUT) obtido e estimado (Tabela 12, Gráfico 1), o VUT obtido não difere nos três dias de coleta, onde obteve média de 10,9 L para a coleta total. O VUT estimado também não diferiu entre os três dias de coleta de urina *spot* 4 horas pós-prandial, sendo o VUT estimado com a média de 13,4 L. Não houve efeito dos dias entre o VUT obtido e o estimado nos três dias de coleta. As regressões para os dias 1, 2 3 são respectivamente:  $Y=5,3424 + 0,4061x$ ,  $Y=7,7482 + 0,2735x$ , e  $Y=9,6974 + 0,0625x$ ; onde para X de VUT estimado, encontra-se Y de VUT obtido. Observa-se que no gráfico c dia 3 (Gráfico 1), o R<sup>2</sup> foi baixo, mesmo indicando que não houve diferença entre o VUT obtido e estimado, e CV de 29,48% (Tabela 12). Possivelmente o R<sup>2</sup> baixo pode ser atribuído ao erro experimental, pois foram obtidos menores volumes urinários da coleta total no último período experimental, como relatado por Valadares et al. (1997a) e Leal et al. (2007) que maior número de dias de coleta de urina total (96 horas) resultam em menores excreções de creatinina, possivelmente em razão do vazamento de urina do funil coletor, do desconforto animal, que são problemas relacionados ao emprego dessa técnica por longos períodos.

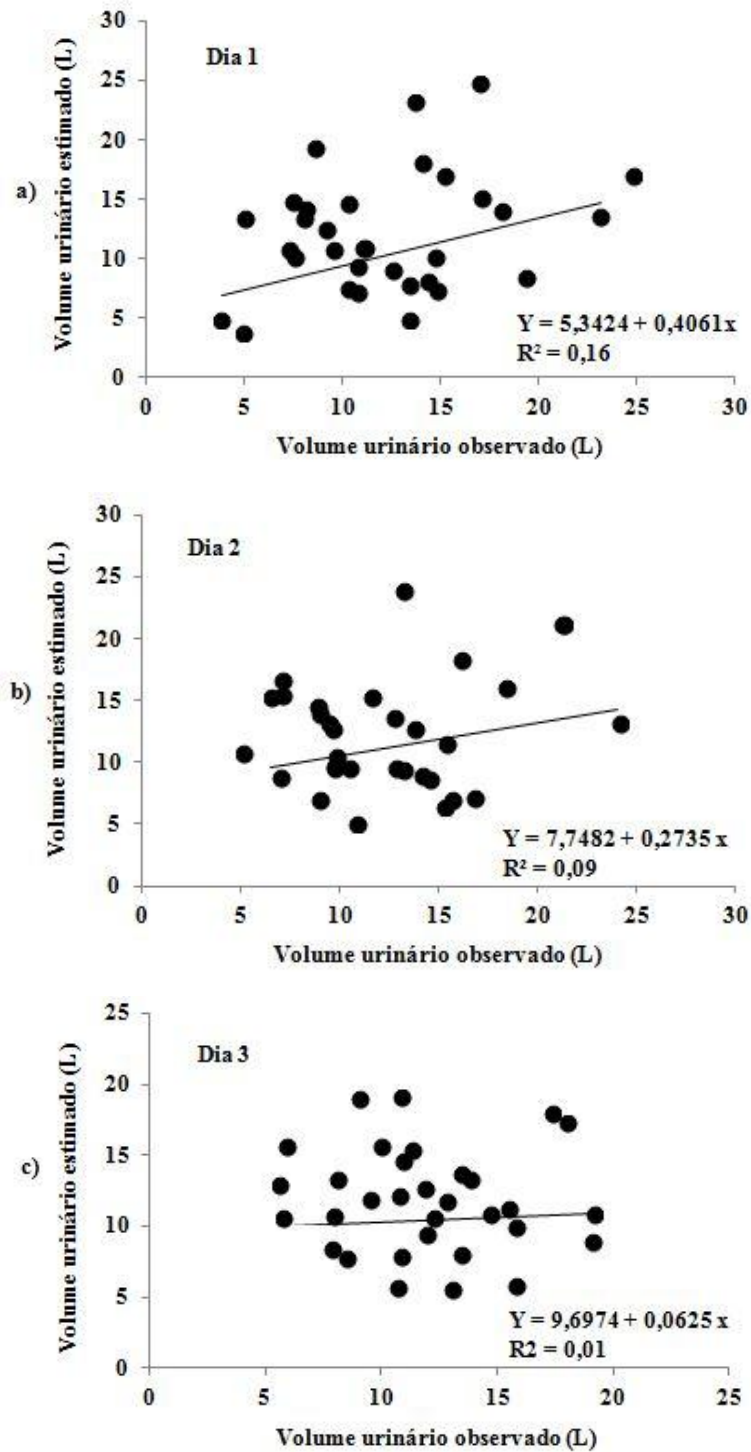


Gráfico 1 – Relação entre o volume urinário observado e o volume urinário estimado no dia 1 (a), dia 2 (b) e dia 3 (c) de coleta em búfalos Murrah

Tabela 13 – Médias das excreções urinárias de creatinina obtida com três dias de coleta de urina total

Item	N° de dias de coleta			Média	EPM <sup>1</sup>	Valor de P <sup>2</sup>
	Dia 1	Dia 2	Dia 3			
Creatinina (mg/Kg/PC)	18,12	18,56	17,52	18,07	0,95	0,65
Creatinina (mg/Kg <sup>0,75</sup> )	80,28	82,12	77,39	79,93	4,22	0,64
Creatinina (mmol/Kg <sup>0,75</sup> )	0,71	0,73	0,69	0,71	0,04	0,64

<sup>1</sup>erro padrão da média; <sup>2</sup>Teste F a 5% de significância.

A excreção de creatinina não foi influenciada entre os três dias de coleta de urina total (Tabela 13). A creatinina, como indicador de excreção urinária é utilizada para estimar o VUT em experimentos que utilizam a coleta de urina *spot* e as demais excreções urinárias a partir de uma amostra pontual de urina. O valor médio de creatinina encontrado no presente experimento foi de 18,07 mg/Kg/PC, 79,93 mg/Kg<sup>0,75</sup> ou 0,71 mmol/Kg<sup>0,75</sup>, e esse valor foi utilizado na estimativa da coleta de urina *spot*, indicando que não houve diferença entre ambas as metodologias (Tabelas 12 e 13, Gráfico 1).

Chen et al. (1996), avaliaram a concentração de creatinina durante um experimento com jejum alimentar e alimentação *ad libitum* em búfalas Murrah (222 a 262 Kg) e encontraram valores de creatinina de 0,33 a 0,44 mmol/Kg<sup>0,75</sup>. Dipu et al. (2006) também avaliaram a concentração de creatinina em restrição alimentar e *ad libitum* em búfalos Murrah e obtiveram excreções de creatinina de 0,66 a 0,73 mmol/Kg<sup>0,75</sup>.

Os valores de creatinina (0,73 mmol/Kg<sup>0,75</sup>) encontrados por Dipu et al. (2006) quando os búfalos Murrah tiveram livre acesso ao alimento, foram similares ao presente estudo de 0,71 mmol/Kg<sup>0,75</sup> (Tabela 13). É interessante afirmar, que caso a concentração de creatinina citada por Chen et al. (1996), viesse a ser utilizada no presente estudo, o VUT médio estimado do experimento total seria de 8,8 L subestimando o VUT observado (10,93 L), sendo que o VUT estimado pela concentração de creatinina no experimento foi de 13,42 L (Tabela 12).

Em experimentos brasileiros com búfalos, Pereira et al. (2007) e Machado (2014) utilizaram a metodologia da coleta de urina *spot* 4 H pós-prandial e utilizaram a concentração de creatinina 0,44 mmol/Kg<sup>0,75</sup> de Chen et al. (1996) para estimar o VUT. Pereira et al. (2007) encontraram 24,16 L (quando utilizou 24% de concentrado na

dieta) para búfalos Murrah e Machado (2014) observou o VUT de 2,64 L para búfalas Murrah x Jafarabadi.

Kozloski et al. (2005) avaliaram a excreção de creatinina e demais compostos urinários de ovinos entre experimentos e dentro experimentos e observaram que dentro experimentos não há evidências da alteração da creatinina, já que está não é afetada pela dieta. Mas que entre experimentos, as excreções médias se diferiram, mesmo quando foram utilizados animais da mesma raça com peso corporal semelhante. Estes autores concluíram que para validar a metodologia de coleta de urina *spot* para ovinos, seria necessário ao menos um dia de coleta de urina total 24 H, de um animal representativo do trabalho experimental a fim de diminuir essas alterações.

Santana Junior et al. (2015), em revisão aborda que muitos experimentos já foram realizados no Brasil com bovinos, sendo que já está consolidado o valor médio de excreção de creatinina em 27,4 mg/Kg/PC. Apesar da excreção de creatinina ser constante (pouco ou não variável pela dieta), em função do peso corporal do animal, o melhor horário para amostra da urina é 4 H pós-prandial, período onde a concentração plasmática e urinária de metabólitos já tenha alcançado o platô e sendo melhor estimado.

## 5. CONCLUSÕES

A quitosana e o grão de soja integral não interferem nas fases das digestas do rúmen e do retículo; entretanto a interação da quitosana com o grão de soja integral promoveu maior concentração de MS na fase líquida do retículo.

A quitosana e o grão de soja integral proporcionaram balanço positivo de compostos nitrogenados. Com relação aos derivados de purinas, a quitosana com interação do grão de soja integral proporcionam maiores excreções de hipoxantina e xantina, porém não alteraram a DPT e Nmic.

Metodologias de coleta de urina total e *spot* não diferem entre si quando foram avaliadas nos três dias de coleta as excreções de DPT e Nmic.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E IMPLICAÇÕES

Para melhor estimativa dos teores de FDN, considerar a FDN<sub>cp</sub> para avaliar composição das digestas nos compartimentos, possibilitando melhor acurácia no fluxo de nutrientes.

O valor médio de creatinina encontrado no presente experimento foi de 18,07 mg/Kg/PC, 79,93 mg/Kg<sup>0,75</sup> ou 0,71 mmol/Kg<sup>0,75</sup>. Podendo ser realizada uma coleta de urina total em 24 horas. Entretanto, sugere-se que em ensaios com bubalinos Murrah, quando se realizar a coleta de urina *spot* unicamente como metodologia para estimar os VUT, DPT e N<sub>mic</sub>, realizar ao menos um dia de coleta total (24 H) com um animal representativo do experimento para quantificação da creatinina.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULLAH, N.; HO, Y.W.; MAHYUDDIN; JALALUDIN, S. Studies in fibre digestion and passage rate of liquid and solid in cattle and buffaloes. **Asian-Aust. J. Anim. Sci.**, v.4, n.2, p.137-141, 1991.

ABLAS, D.S.A.; FRANZOLIN NETO, R.A.; NOGUEIRA FILHO, J.C.M.A. *In situ* degradability of dry matter and neutral detergent fiber from coast cross hay and dry matter from corn in buffaloes receiving two roughage:concentrated rates. **Revista Portuguesa de Zootecnia**, Ano X, n.1, p.27-36, 2003.

AHVENJÄRVI, S.; SKIBA, B.; HUHTANEN, P. Effect of heterogeneous digesta chemical composition on the accuracy of measurements of fiber flow in dairy cows. **Journal of Animal Science**, v.79, p.1611-1620, 2001.

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

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

ALMEIDA, G.F.; DEL VALLE, T.A.; PAIVA, P.G. et al. Effects of whole raw soybean or whole cottonseed on milk yield and composition, digestibility, ruminal fermentation and blood metabolites of lactating dairy cows. **Animal Production Science (Print)**, v.56, p.A-G, 2016.

ALVES, T.C.; FRANZOLIN, R.; RODRIGUES, P.H.M.; ALVES, A.C. Efeito de dietas com níveis crescentes de milho no metabolismo ruminal de energia e proteína em bubalinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.10, p.2001-2006, 2009.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY - AOAC. **Official methods of analysis**. 17th ed. Arlington, VA: AOAC, 2000.

ARAÚJO, A.P.C.; VENTURELLI, B.C.; SANTOS, M.;C.B. et al. Chitosan effects total nutrient digestion and ruminal fermentation in Nelore steers. **Animal Feed Science and Technology**, v.206, p.114-118, 2015.

BARBOSA, A.M. **Período de coleta de urina e de fezes para avaliação da excreção de creatinina, produção microbiana e digestibilidade aparente dos nutrientes em Nelore**. 2005. 50p. Tese de mestrado (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa- UFV, Viçosa, 2005.

BARBOSA, A.M.; VALADARES, R.F.D.; VALADARES FILHO, S.C. et al. Efeito do período de coleta de urina, dos níveis de concentrado e de fontes proteicas sobre a excreção de creatinina, de ureia e de derivados de purina e a produção microbiana em bovinos Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.3, p.870-877, 2006.

BARLETTA, R.V. **Grão de soja cru e integral na alimentação de vacas leiteiras.** 2010. 96p. Dissertação de mestrado (Mestrado em Nutrição e Produção Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP, Pirassununga, 2010.

BARLETTA, R.V.; RENNO, F.P.; GANDRA, J.R.; FREITAS JUNIOR, J.E. et al. Desempenho e parâmetros sanguíneos de vacas leiteiras alimentadas com grão de soja. **Arch. Zootec.**, v.61, n.236, p.483-492, 2012.

BEAUCHEMIN, K.A.; McALLISTER, T.A.; DONG, Y.; FARR, B.I.; CHENG, K.J. Effects of mastication on digestion of whole cereal grains by cattle. **Journal of Animal Science**, v.72, p.236-246, 1994.

BEZERRA, L.R.; GONZAGA NETO, S.; OLIVEIRA, J.S.; SANTOS, E.M.; SILVA, A.M.A. Estimativa da produção de proteína microbiana pelos derivados de purina. **Agropecuária Científica no Semi-Árido**, revisão de literatura, v.6, n.3, p.7-14, 2010.

BRODY, S. **Bioenergetics and Growth.** Reinhold, New York, 1945.

CAMPANILE, G.; NEGLIA, G.; VECCHIO, D.; DI PALO, R.; GASPARRINI, B.; ZICARELLI, L. Protein nutrition and nitrogen balance in buffalo cows. **Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, CAB reviews, v.5, n7, p.1-8, 2010.

CASALI, A.O.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C.; PEREIRA, J.C. Influência do tempo de incubação e do tamanho de partículas sobre os teores de compostos indigestíveis em alimentos e fezes bovinas obtidos por procedimentos in situ. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.2, p.335-342, 2008.

CHEN, X.B.; MATHIESON, J.; HOVELL, F.D.B.; Reeds, P.J. Measurement of purine derivatives in urine of ruminants using automated methods. **J. Sci. Food Agric.**, v.53, p.23-33, 1990.

CHEN, X.B.; GOMES, M.J. **Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives** - an overview technical details. International Feed Research Unit, Bucksburnd, Aberdeen: Rowett Research Institute, 1992. 21p.

CHEN, X.B.; SAMARAWEEERA, L.; KYLE, D.J.; ORSKOV, R.; ABEYGUNAWARDENE, H. Urinary excretion of purine derivatives and tissue xanthine oxidase (EC 1.2.3.2) activity in buffaloes (*Bubalus bubalis*) with special reference to differences between buffaloes and *Bos taurus* cattle. **British Journal of Nutrition**, v.75, p.397-407, 1996.

CHILLIARD, Y.; GLASSER, F.; FERLAY, A. et al. Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.109, p.828-855, 2007.

CHIZZOTTI, M.L.; VALADARES FILHO, S.C.; VALADARES, R.F.D. et al. Consumo, digestibilidade e excreção de ureia e derivados de purinas em vacas de diferentes níveis de produção de leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.1, p.138-146, 2007.

CHIZZOTTI, M.L.; VALADARES FILHO, S.C.; VALADARES, R.F.D. et al. Determination of creatinine excretion and evaluation of spot urine sampling in Holstein cattle. **Livestock Science**, v.113, p-218-255, 2008

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. **Acomp. Safra bras. Grãos**, v.3 - Safra 2015/2016. 2015. 166p.

CÔNSOLO, N.R.B.; GARDINAL, R.; GANDRA, J.R.; FREITAS JUNIOR, J.E. et al. High levels of whole raw soybean in diets for Nellore bulls in feedlot: effect on growth performance, carcass traits and meat quality. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v.99, n.2, p.201-209, 2015.

COSTA JUNIOR, J.B.G.; ZEOULA, L.M.; FRANCO, S.L. et al. Effect of propolis product on digestibility and ruminal parameters in buffaloes consuming a forage-based diet. **Italian Journal of Animal Science**, v.11, n.78, p.441-448, 2012.

DELGADO, D.C.; FRANZOLIN NETO, R.; ABDALLA GOMIDE, C. Efecto del nivel de proteína no degradable em rumen em la degradación ruminal *in situ* del heno de bermuda cruzada (*Cynodon dactylon* (L.) Pers) cv. *Coast cross* em búfalos. **Revista Cubana de Ciencia Agrícola**, v.45, n.2, p.135-139, 2011,

DIJKSTRA, J.; FORBES, J.M.; FRANCE, J. **Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism**. 2ed., Washington, DC, USA, Library of Congress, 2005.

DIPU, M.T.; GEORGE, S.K.; SINGH, P.; VERMA, A.K.; MEHRA, U.R. Measurement of microbial protein supply in Murrah buffaloes (*Bubalus bubalis*) using urinary purine derivatives excretion and PDC index. **Asian-Aust. J. Anim. Sci.**, v.19, n.3, p.347-355, 2006.

DUTTA, P.K.; TRIPATHI, S.; MEHROTRA, G.K.; DUTTA, J. Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. **Food Chemistry**, v.114, p.1173-1182, 2009.

EDMONSON, A.J.; LEAN, I.J.; WEAVER, L.D.; FARVER, T.; WEBSTER, G. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.71, n.1, p.68-78, 1989.

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

FATEHI, F.; KRIZSAN, S.J.; GIDLUND, H.; HUHTANEN, P. A comparison of ruminal or reticular digesta sampling as an alternative to sampling from the omasum of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.98, p.3274-3283, 2015.

FERNANDES, M.F. **Qualidade do leite de cabras mestiças mochoató suplementadas com diferentes fontes e níveis de óleos vegetais**. 2007. 67p. Dissertação de mestrado (Mestrado em Zootecnia) - Centro de Ciências Agrárias - Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2007.

FRANZOLIN, R. Feed efficiency: A comparison between cattle and buffalo. **Buffalo Journal**, Supplement 2, p.39-50, 1994.

FRANZOLIN, M.H.T.; SILVEIRA, A.C.; FRANZOLIN, R. Efeitos de dietas com diferentes níveis de fibra em detergente neutro e tamanho de poros de sacos de náilon incubados no rúmen sobre a fauna ruminal em bubalinos e bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.2, p.716-723, 2002.

FREITAS JUNIOR, J.E.; RENNÓ, F.P.; GANDRA, J.R. RENNÓ, L.N. et al. Nutrients balances and milk fatty acid profile of mid lactation dairy cows supplemented with unsaturated fatty acid. **Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.**, v.14, n.2, p.322-335, 2013.

FREITAS JUNIOR, J.E.; RENNÓ, F.P.; GANDRA, J.R. et al. Addition of unsaturated fatty acids improves digestion mid lactating dairy cows. **Arch. Zootec.**, v.63, p.563-573, 2014.

GABARRA, P.R. **Digestibilidade de nutrientes e parâmetros ruminais e sanguíneos de novilhos Nelore alimentados com fontes proteicas e energéticas com diferentes degradabilidades ruminais**. 2001. 94p. Dissertação de mestrado (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - USP, Piracicaba, 2001.

GANDRA, J.R.; FREITAS JUNIOR, J.E.; BARLETA, R.V. et al. Productive performance, nutrient digestion and metabolism of Holstein (*Bos taurus*) and Nelore (*Bos taurus indicus*) cattle and Mediterranean buffaloes (*Bubalus bubalis*) fed with corn-silage based diets. **Livestock Science**, v.40, p.283-291, 2011.

GANDRA, J.R.; MINGOTI, R.D.; BARLETTA, R.V. et al. Effects of flaxseed, raw soybeans and calcium salts of fatty acids on apparent total tract digestibility, energy balance and milk fatty acid profile of transition cows. **Animal** (Cambridge. Print), v.10, p.1-8, 2016a.

GANDRA, J.R.; TAKIYA, C.S.; OLIVEIRA, E.R. et al. Nutrient digestion, microbial protein synthesis and blood metabolites of Jersey heifers fed chitosan and whole raw soybeans. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.45, n.3, p.130-137, 2016b.

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

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

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

GONÇALVES, W.C. **Efeito do período de adaptação e de colheita sobre os resultados em ensaios de metabolismo com ovinos**. 2015. 57p. Dissertação de mestrado (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, Itapetinga, 2015.

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

HARPER, H.A.; RODWELL, V.W.; MAYES, P.A. **Manual de Química Fisiológica**. 5ed. São Paulo: Atheneu. 1982. 736p.

HAVERTINE, K.J.; ALLEN, M.S. Effects of fatty acid supplements on milk yield and energy balance of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.89, p.1081-1091, 2006.

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

IBGE-INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção Pecuária Municipal**, Rio de Janeiro, v.39, p.1-63, 2011.

ILLIUS, A.W.; JESSOP, N.S. Metabolic constraints on voluntary intake in ruminants. **Journal of Animal Science**, v. 75, p.3052-3062, 1996.

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

JENKINS, T.C.; WALLACE, R.J.; MOATE, P.J.; MOSLEY, E.E. Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within rumen microbial ecosystem. **Journal of Animal Science**, v.86, p.397-412, 2007.

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

KONG, M.; CHEN, X.G.; XING, K.; PARK, H.J. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. **International Journal of Food Microbiology**, v.144, p.51-63, 2010.

KOZLOSKI, G.V.; FIORENTINI, G.; HÄRTER, C.J.; SANCHEZ, L.M.B. Uso da creatinina como indicador da excreção urinária em ovinos. **Ciência Rural**, v.35, n.1, p.98-102, 2005.

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

KRIZSAN, S.J.; RINNE, M.; NYHOLM, L.; HUHTANEN, P. New recommendations for the ruminal *in situ* determination on indigestible neutral detergent fibre. **Animal Feed Science and Technology**, v.205, p.31-41, 2015.

LEAL, T.L. **Efeito do período de coletas de urina sobre a excreção de creatinina e a produção microbiana em bovinos**. 2005. 50p. Tese de mestrado (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa- UFV, Viçosa, 2005

LEAL, T.L.; VALADARES, R.F.D.; VALADARES FILHO, S.C. et al. Variações diárias nas excreções de creatinina e derivados de purinas em novilhos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.4, p.896-904, 2007.

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

LIANG, J.B.; MATSUMOTO, M.; YOUNG, B.A. Purine derivative excretion and ruminal microbial yield in Malaysian cattle and swamp buffalo. **Animal Feed Science and Technology**, v.47, p.189-199, 1994.

MACHADO, E. **Metabolismo de nitrogênio, parâmetros digestivos e exigência de proteína para manutenção de búfalas em crescimento**. 2014. 48p. Dissertação de mestrado (Mestrado em Zootecnia) - Centro de Ciências Agrárias - UEM, Maringá, 2014.

MAEDA, E.M.; ZEOULA, L.M.; GERON, L.V. et al. Digestibilidade e características ruminais de dietas com diferentes níveis de concentrado para bubalinos e bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.3, p.716-726, 2007.

MANILC, G.; MARCONDES, M. **Fisiologia Renal**. 3ed. São Paulo: EPU. 1986. 409p.

MARTÍNEZ-CAMACHO, A.P.; CORTEZ-ROCHA, M.O.; EZQUERRA-BRAUER, J.M. et al. Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties. **Carbohydrate Polymers**, v.82, p.305-315, 2010.

McDONALD, P.M.; EDWARDS, R.A.; GREENHALGH, J.F.D.; MORGAN, C.A. **Animal Nutrition**. Harlow, UK: Pearson. 2002. 693p.

MINGOTI, R.D.; FREITAS JUNIOR, J.E.; GANDRA, J.R. et al. Dose response of chitosan on nutrient digestibility, blood metabolites and lactation performance in Holstein dairy cows. **Livestock Science**, v.187, p.35-39, 2016.

NAVES, A.B.; BARLETTA, R.V.; GANDRA, J.R.; FREITAS JUNIOR, J.E. et al. Desempenho e perfil plasmático de vacas leiteiras alimentadas com grão de soja integral ou moído. **Arch. Zootec.**, v.62, n.240, p.579-588, 2013.

NAVES, A.B.; FREITAS JUNIOR, J.E.; BARLETTA, R.V. et al. Effect of raw soyabean particle size on productive performance and digestion of dairy cows. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v.99, p.1-11, 2015.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7ed. Washington, D.C.: National Academic Press. 2001. 381p.

OLIVEIRA, A.S.; VALADARES, R.F.D.; VALADARES FILHO, S.C. et al. Produção de proteína microbiana e estimativas das excreções de derivados de purinas e de uréia em vacas lactantes alimentadas com rações contendo diferentes níveis de compostos nitrogenados não-protéicos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.5, p.1621-1629, 2001.

ORELLANA BOERO, P.; BALCELLS, J.; MARTÍN-ORÚE, S.M.; LIANG, J.B.; GUADA, J.A. Excretion of purine derivatives in cows: endogenous contribution and recovery of exogenous purine bases. **Livestock Production Science**, v.68, p.243-250, 2001.

PAIVA, P.G.; JESUS, E.F.; DEL VALLE, T.A. et al. Effects of chitosan on ruminal fermentation, nutrient digestibility na milk yield and composition of dairy cows. **Animal Feed Science and Technology** (Print), v.212, p.136-142, 2016.

PALMQUIST, D.L. The feeding value of fats. In: Orskov, E.R. **Feed Science**, Ed. Elsevier Science, Amsterdam, 1991, p.293-311.

PALMQUIST, D.L.; MATTOS, W.R.S. Metabolismo de Lipídeos. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. **Nutrição de Ruminantes**, Jaboticabal: Funep, 2006, cap.10, p.287-310.

PEREIRA, K.P.; VÉRAS, A.S.C.; FERREIRA, M.A. et al. Balanço de nitrogênio e perdas endógenas em bovinos e bubalinos alimentados com níveis crescentes de concentrado. **Acta Sci. Anim. Sci.**, v.29, n.4, p.433-440, 2007.

PEREZ, J.F.; BALCELLS, J.; GUADA, J.A.; CASTRILLO, C. Rumen microbial production estimated either from urinary purine derivative excretion or from direct measurements of N-15 and purine bases as microbial markers: effect of protein source and rumen bacteria isolates. **Journal of Animal Science**, v.65, p.225-236, 1997.

PIMPA, O.; LIANG, J.B.; BALCELLS, J.; JELAN, Z.A.; ABDULLAH, N. Urinary purine derivatives excretion in swamp buffaloes after duodenal purine base infusion. **Animal Feed Science and Technology**, v.104, p.191-199, 2003.

PIMPA, O.; LIANG, J.B.; BALCELLS, J. Renal and Salivary excretions of plasma purine derivatives in swamp buffaloes and Zebu cattle. **Asian-Aust. Anim. Sci.**, v.20, n.8, p.1201-1207, 2007.

RENNÓ, L.N.; VALADARES, R.F.D.; VALADARES FILHO, S.C. et al. Concentração Plasmática de ureia e excreções de ureia e creatinina em novilhos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n.4, p.1235-1243, 2000.

RENNÓ, L.N.; VALADARES, FILHO, S.C.; VALADARES, R.F.D. et al. Níveis de ureia na ração a novilho de quatro grupos genéticos estimativa da produção de proteína microbiana por meio dos derivados de purina utilizando duas metodologias de coleta. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.3, p.-546-555, 2008.

RENNÓ, F.P.; CÔNSOLO, N.R.B.; BARLETTA, R.V. et al. Grão de soja cru e inteiro na alimentação de bovinos: Excreção de grão de soja nas fezes. **Arch. Zootec.**, v.64, n.248, p.331-338, 2015.

REYNAL, S.M.; BRODERICK, G.A.; BEARZI, C. Comparison of four markers for quantifying microbial protein flow from the rumen of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.88, p.4065-4082, 2005.

RODRIGUES, V.C.; ANDRADE, I.F.; SOUSA, J.C. et al. Avaliação do consumo e da capacidade digestiva de búfalos e bovinos. **Ciê. Agrotec.**, v.25, n.6, p.1406-1402, 2001.

SANTANA JUNIOR, H.A.; SANTANA, E.O.C.; FERREIRA, A.H.C. et al. Metodologias de coleta de urina para aplicação em ensaios metabólicos com bovinos confinados e em pastejo. **Revista Eletrônica Nutrime**, v.12, n.1, p.3828-3836, 2015.

SANTOS, F.A.P. Metabolismo de proteínas In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. **Nutrição de Ruminantes**, Jaboticabal: Funep, 2006, cap.9, p.255-286.

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

SERRANO, R.D.C.; SIERRA, L.M.P. Quantification techniques of the protein microbial synthesis in rumen: a review. **Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia**, v.6, n.1, p.46-53, 2011.

SIGNINI, R.; CAMPANA FILHO, S. Características e propriedades de quitosanas purificadas nas formas neutra, acetato e cloridrato. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.11, n.2, p.58-64, 2001.



SILVA, R.M.N.; VALADARES, R.F.D.; VALADARES FILHO, S.C. et al. Ureia para vacas em lactação: 2. Estimativas do volume urinário, da produção microbiana e da excreção de ureia. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.6, p.1948-1957, 2001.

SILVA, D.S.; BEZERRA, L.S.; CARVALHO, G.G.P. et al. Uso da quitosana associada ao grão de soja cru e integral sobre o consumo de matérias seca e nutrientes de búfalos Murrah. In: XXV Congresso Brasileiro de Zootecnia - Zootec, 2015, Fortaleza - CE. **Anais...** Fortaleza, 2015.

SILVA, D.S. **Composição química das fases das digestas reticular, omasal e abomasal de vacas holandesas submetidas a dietas com diferentes fontes de ácidos graxos**. 2014. 37p. Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Zootecnia) - Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia - UFBA, Salvador, 2014.

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

SOARES, W.V.B.; FRANZOLIN, R; SOUZA, N.H. Effect of addition of different strains of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) on liquid phase outflow rate, ruminal volume and in site degradability in buffaloes fed on the sugar cane basis. **Ital. J. Anim. Sci.**, v.6, p.536-539, 2007.

SULTAN, J.I.; JAVAID, A.; NADEEM, M. Effect of varying ruminally degradable to ruminally undegradable protein ratio on nutrient intake, digestibility and N metabolism in Nili Ravi buffalo calves (*Bubalus bubalis*). **Livestock Science**, v.122, p.130-133, 2009.

TAS, B.M.; SUSENBETH, A. Urinary purine derivatives excretion as an indicator of *in vivo* microbial N flow in cattle: A review. **Livestock Science**, v.111., p.181-192, 2007.

TATSAPONG, P.; PAENKOU, P.; PIMPA, O.; HARE, M.D. Effects of dietary on nitrogen metabolism and protein requirements for maintenance of growing Thai swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) calves. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v.9, n.6, p.1019-1025, 2010.

THANH, V.T.K.; ØRSKOV, E.R. Causes of differences in urinary excretion of purine derivatives in buffaloes and cattle. **Animal Science**, v.82, p.355-358, 2006.

VALADARES, R.F.D.; GONÇALVES, L.C.; RODRIGUEZ, N.M; SAMPAIO, I.B.; VALADARES FILHO, S.C. Metodologia de coleta de urina em vacas utilizando sondas de Folley. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.26, n.6, p.1279-1282, 1997a.

VALADARES, R.F.D.; GONÇALVES, L.C.; SAMPAIO, I.B. et al. Níveis de proteína em dietas de bovinos. 3-pH, amônia e eficiência microbiana. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.26, n.6, p.1264-1269, 1997b.

VALADARES, R.D.; BRODERICK, G.A.; VALADARES FILHO, S.C.; CLAYTON, M.K. Effect of replacing alfafa silage with high moisture corn on ruminal protein synthesis and excretion of total purine derivatives. **Journal of Animal Science**, v.82, p.2686-2696, 1999.

VALADARES FILHO, S.C.; ROTTA, P.P.; COSTA e SILVA, L.F. Técnicas de coleta duodenal, abomasal, omasal e reticular na avaliação do fluxo ruminal. In: RENNÓ, F.P.; PRADA e SILVA, L.F. **III Simpósio Internacional Avanços em técnicas de pesquisa em nutrição de ruminantes**, Pirassununga, São Paulo. 2011, p.14-45.

VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B.; LEWIS, B.A.; Methods for dietary fiber neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Sciences**, v.74, n.10, p.3583-3597, 1991.

VAN SOEST, P.J. **Nutrition Ecology of Ruminants**. Ithaca. Cornell University Press. 1994. 476p.

VENDRAMINI, T.H.A.; TAKIYA, C.S.; SILVA, T.H. et al. Effects of a blend of essential oils, chitosan or monensin on nutrient intake and digestibility of lactating dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, v.214, p.12-21, 2016.

VENTURELLI, B.C.; FREITAS JUNIOR, J.E.; TAKIYA, C.S. et al. Total tract nutrient digestion and milk fatty acid profile of dairy cows fed diets containing different levels of whole raw soyabens. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v.99, p.1149-1160, 2015.

WANAPAT, M.; PIMPA, O. Effect of Ruminal NH<sub>3</sub>-N levels on ruminal fermentation, purine derivatives, digestibility and rice straw intake in swamp buffaloes. **Asian-Aust. J. Anim. Sci.**, v.12, n.6, p.904-907, 1999.

WANAPAT, M.; CHERDTHONG, A. Use of real-time PCR technique in studying rumen cellulolytic bacteria population as affected by level of roughage in swamp buffalo. **Curr. Microbiol.**, v.58, p.294-299, 2009.

WANAPAT, M.; PILAJUN, R.; KANG, S.; SETYANINGSIH, K.; SETYAWAN, A.R. Effect of ground corn cob replacement for cassava chip on feed intake, rumen fermentation and urinary derivatives in swamp buffaloes. **Asian-Aust. J. Anim. Sci.**, v.25, n.8, p.1124-1131, 2012.

WANAPAT, M.; CHANTHAKHOUN, V.; PHESATCHA, K.; KANG, S. Influence of mangosteen peel powder as a source of plant secondary compounds on rumen microorganisms, volatile fatty acids, methane and microbial protein synthesis in swamp buffaloes. **Livestock Science**, v.162, p.126-133, 2014.

WENCELOVÁ, M.; VÁRADYOVÁ, Z.; MIHALIKOVÁ, K. et al. Evaluating the effects of chitosan, plant oils and different diets on rumen metabolism and protozoan population in sheep. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v.38, p.26-33, 2014.

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

ZEOULA, L.M.; BELEZE, J.R.F.; MAEDA, E.M. et al. Levedura ou monensina na dieta de bovinos e bubalinos sobre a fermentação ruminal e eficiência microbiana. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v.33, n.4, p.379-386, 2011.

**ANEXOS**