



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
CAMPUS JATAÍ  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA  
RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR  
OBRIGATÓRIO



**TIAGO RONIMAR FERREIRA LIMA**

## **TÉCNICAS DE AVALIAÇÃO DA QUITOSANA EM VACAS LEITEIRAS**

**JATAÍ - GOIÁS  
2013**

**TIAGO RONIMAR FERREIRA LIMA**

**MANEJO NUTRICIONAL E PRODUÇÃO DE RUMINANTES**

Orientadora: Profa. Dra. Marcia Dias

Relatório de Estágio Curricular Obrigatório  
apresentado à Universidade Federal de  
Goiás – UFG, Campus Jataí, como parte  
das exigências para a obtenção do título  
de Zootecnista.

**JATAÍ - GOIÁS**  
**2013**

**TIAGO RONIMAR FERREIRA LIMA**

Relatório de Estágio Curricular Obrigatório para Conclusão do curso de Graduação em Zootecnia, defendido e aprovado em 16 de agosto de 2013, pela seguinte banca examinadora:

---

Profa. Dra. Marcia Dias UFG - Jataí  
Presidente da Banca

---

Profa. Dra. Ana Luisa Aguiar de Castro UFG – Jataí  
Membro da Banca

---

Profa. Dra. Vera Lúcia Banyas UFG – Jataí  
Membro da Banca

*Dedico este trabalho a todos os profissionais das Ciências Agrárias, pela luta constante para garantir alimentação de qualidade e em quantidade para toda população.*

## AGRADECIMENTOS

Acima de tudo à Deus, por todas as bênçãos concedidas e pelas dificuldades enviadas para manter o meu espírito forte.

À minha família pelo apoio e compreensão neste momento decisivo da minha formação profissional.

À Universidade Federal de Goiás pela possibilidade de realizar um curso superior de qualidade de forma gratuita.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP), situada em Pirassununga - SP, pela oportunidade de realizar o meu estágio curricular obrigatório.

Ao professor Dr. Francisco Palma Rennó, por ter aceitado o meu pedido de supervisão de estágio obrigatório.

Aos orientados de mestrado e doutorado do Departamento de Nutrição e Produção Animal (VNP), por todo conhecimento repassado durante este período.

Aos meus amigos de convivência Pablo Gomes de Paiva, Tiago Del Valle, Gustavo Ferreira, Rafael Barletta e Elmeson Ferreira pela hospitalidade e momentos de descontração durante a minha estadia na república.

Ao Vitor Bettero por ter possibilitado o contato inicial para a realização do estágio e o grande suporte fornecido durante o mesmo.

A toda equipe de funcionários e estagiários do Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite (LPBL).

A minha orientadora de estágio professora Dra. Marcia Dias, pela luta incessante para proporcionar melhor formação acadêmica possível para mim, pela ótima orientação e por todo ensinamento durante a minha graduação.

A professora Dra. Ana Luisa Aguiar de Castro pelos ensinamentos iniciais e motivação que me ajudaram a seguir a carreira de pesquisador.

A professora Dra. Vera Lúcia Banys pela importante contribuição na formação acadêmica.

As minhas amigas Janaina Verônica, Aline Oliveira, Aryane Carvalho, Layane Carvalho e Jéssica Bueno pelas horas de alegria e de apoio nessa jornada.

À Evaci Silva (Branca) pelo apoio decisivo no ingresso na universidade.

À minha grande amiga Marli pelos conselhos e pela amizade sincera durante o nosso convívio.

À toda equipe do Laboratório de Nutrição Animal (LNA) pelos ótimos momentos vividos.

A todos os meus amigos e colegas de faculdade pela contribuição na minha formação.

Por último, mas de importância imensurável, aos meus “irmãos” Darlan Marques, Thiago Moraes, Thiago Quirino, Wesley Fernandes, Jean Costa e Deibity Cordeiro pelas horas de amizade, descontração, companheirismo, apoio incondicional nas horas difíceis e nos momentos felizes vividos ao longo desses cinco anos de graduação.

**SUMÁRIO**

1. IDENTIFICAÇÃO	1
2. LOCAL DE ESTÁGIO	1
3. DESCRIÇÃO DA ROTINA E DO CAMPO DE ESTÁGIO	1
4. RESUMO QUANTIFICADO DAS ATIVIDADES REALIZADAS	2
5. DESCRIÇÃO E DISCUSSÃO DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS	4
5.1. INTRODUÇÃO	4
5.2. ARRAÇOAMENTO DOS ANIMAIS	5
5.3. PESAGEM DA QUITOSANA	7
5.4. PREPARO E PESAGEM DAS RAÇÕES EXPERIMENTAIS	9
5.5. PESAGEM DO INDICADOR E COLETA DE FEZES	12
5.6. COLETA DE URINA	14
5.7. COLETA DE SANGUE	16
5.8. COLETAS DE LEITE	17
5.9. COLETAS DE LÍQUIDO RUMINAL	18
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	20
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20

## **1. IDENTIFICAÇÃO**

Tiago Ronimar Ferreira Lima, filho de Lídia Ferreira Gomes e Sebastião Gomes de Lima, natural de Jataí – Goiás. cursou o 1º grau na Escola Municipal Professor Luziano Dias de Freitas e o 2º grau no Colégio Estadual João Roberto Moreira. Ingressou no Curso de Zootecnia pela Universidade Federal de Goiás/Campus Jataí em 2008.

## **2. LOCAL DE ESTÁGIO**

O estágio foi realizado na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP) no *Campus* Pirassununga, localizada na Avenida Duque de Caxias, nº 225, setor Norte, na cidade de Pirassununga – SP, no período de 03 de junho a 02 de agosto de 2013.

Devido à infraestrutura de ponta, presença de profissionais qualificados e diversos estudos realizados no campo de nutrição animal com técnicas e metodologias diversificadas, optou-se por esta instituição para complementação da base teórica obtida ao longo do Curso de Zootecnia.

## **3. DESCRIÇÃO DA ROTINA E DO CAMPO DE ESTÁGIO**

O Departamento de Nutrição e Produção Animal (VNP) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP), conta com diversos setores e laboratórios destinados a formação qualificada de seus acadêmicos, sejam eles graduandos ou pós-graduandos; desenvolvimento de pesquisas na área da nutrição e produção; prestação de serviços de extensão universitária relacionadas a esse campo de estudo e colaboração científica com órgãos públicos e privados, sejam eles nacionais ou internacionais, no ensino, pesquisa e extensão.

O VNP abrange os ramos de pesquisa de não ruminantes (Laboratórios de Pesquisa em Suínos e em Aves) e de ruminantes (Laboratório de Nutrição de Ruminantes, Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite – LPBL); além de setores destinados ao bem estar animal (Laboratório de Bioclimatologia) e a preparação da alimentação de cada setor de produção (Laboratório de Preparo de



Rações Experimentais). Também conta com laboratórios destinados ao estudo do processamento dos produtos de origem animal (Laboratório de Tecnologia de Produtos de Origem Animal) e de fisiologia animal (Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Animal – LBFA), entre outros.

O Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite (LPBL) foi criado devido à demanda no Setor de Bovinocultura Leiteira pelos docentes do Departamento de Nutrição e Produção Animal. Esta demanda gerou a necessidade do VNP ter, em suas dependências, uma unidade experimental em bovinos leiteiros que promovesse infraestrutura adequada para o desenvolvimento de pesquisas em nutrição e produção animal.

O Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite, sob a coordenação do professor Dr. Francisco Palma Rennó, possui três funcionários (auxiliares agropecuários), além de uma equipe terceirizada para atividades afins (limpeza das baias, concerto de cercas, retirada da silagem no silo, entre outras). Este laboratório está inserido em uma área de aproximadamente 13,5 hectares, sendo composto por pastagens e construções que perfazem cerca de 480 m<sup>2</sup>. As construções estão divididas em quatro estábulos para vacas tipo *Free-Stall*, áreas cobertas anexas e um módulo contendo escritório, laboratório, sala de leite, banheiro e sala de ordenha. Os estábulos têm capacidade para 82 vacas adultas, secas ou em lactação confinada, e áreas cobertas anexas com capacidade para cerca de 30 animais sob regime de pastejo e/ou semiconfinamento (bezerras, novilhas e vacas secas). O módulo anexo ao estábulo possui ordenhadeira mecânica 2x1, em sistema canalizado Modelo ALPRO<sup>®</sup>, sala de leite com tanque de resfriamento com capacidade para 1100 litros, laboratório para preparação e armazenamento de amostras, contendo, ainda, escritório e banheiro.

É possível participar das atividades desenvolvidas pelos zootecnistas e médicos veterinários, o que possibilita ao aluno o aprimoramento de técnicas destinadas à avaliação de alimentos, bem como o acompanhamento nutricional do rebanho leiteiro do Setor de Bovinocultura Leiteira e a rotina de alimentação dos animais.

#### **4. RESUMO QUANTIFICADO DAS ATIVIDADES REALIZADAS**

Durante o período de estágio, várias foram as atividades realizadas, sendo algumas de rotina diária, como a alimentação das vacas alocadas no sistema *free - stall* (controle da ingestão de volumoso e concentrado), destinadas à experimentação ou não; aleitamento dos bezerros e manejo de ordenha dos animais do setor (acompanhamento dos animais até o local e a sua entrada na linha de ordenha, teste da caneca de fundo preto, técnicas de manejo pré e pós *dipping*), pesagem da quitosana (biopolímero natural derivado da quitina, sendo utilizado em experimento, será discutido com detalhes posteriormente), e outras atividades realizadas periodicamente e/ou esporadicamente como a aplicação de Somatotropina recombinante bovina (rBST); preparo de ração (pesagem dos minerais e núcleos), determinação de matéria seca (MS) e matéria mineral (MM); preparação de amostras para determinação de fibra em detergente ácido indigestível (FDAi), determinação de nitrogênio (N; pesagem, digestão, destilação e titulação), coletas de experimentação (coletas de fezes, urina, sangue, leite e fermentação) e preparo de amostras (Tabela 1).

Tabela 1. Atividades realizadas no Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite (FMVZ/USP) no período de 03/06/2013 à 02/08/2013

Atividades desenvolvidas		
Item	Número	Frequência (%)
Alimentação Animais	60	18,07
Aleitamento Bezerros	50	15,06
Manejo de Ordenha	20	6,02
Aplicação rBST <sup>1</sup>	4	1,20
Preparo de Rações	7	2,11
Pesagem Quitosana	60	18,07
Pesagem Cromo	30	9,04
Coleta de sobras	15	4,52
Coleta de fezes	18	5,42
Coleta de urina	6	1,81
Coleta de leite	9	2,71
Coleta líquido ruminal	2	0,60
Processamento Amostras	5	1,51
Determinação MS <sup>2</sup>	10	3,01
Determinação MM <sup>3</sup>	10	3,01
Pesagem FDAi <sup>4</sup>	14	4,22
Determinação de N <sup>5</sup>	12	3,61
<b>Total</b>	<b>323</b>	<b>100,00</b>

<sup>1</sup> Somatotropina recombinante bovina, <sup>2</sup> Matéria Seca, <sup>3</sup> Matéria Mineral, <sup>4</sup> Fibra em Detergente Ácido indigestível, <sup>5</sup> Nitrogênio.

## 5. DESCRIÇÃO E DISCUSSÃO DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

### 5.1. INTRODUÇÃO

O setor agropecuário brasileiro busca, a cada dia, potencializar os índices zootécnicos dos rebanhos no intuito de manter e/ou elevar a produtividade animal no mercado externo. Para obtenção de tais resultados, se faz necessário o uso de novas técnicas voltadas à melhoria nutricional, otimizando as características qualitativas e quantitativas dos produtos de origem animal, sejam eles leite ou carne. Para isso, iniciou-se a utilização de aditivos na alimentação animal, visando melhoria de fatores específicos no alimento ou no animal como observado por Eifert (2005), ao avaliar o efeito da monensina e do óleo de soja na dieta sobre o desempenho de vacas leiteiras.

Dentre os vários tipos e meios de ação dos aditivos, os ionóforos, classificados como antibióticos por atuarem em uma gama específica de micro-organismos do rúmen, despertam interesse devido seu modo de ação, uma vez que diminui o crescimento de bactérias proteolíticas e a degradação de proteína hidrolisada e dietética (Russel & Martin, 1984). Os ionóforos atuam selecionando os micro-organismos gram-negativos e desestruturando a atividade celular dos gram-positivos, reduzindo sua população. Com esta população reduzida, e sendo ela a responsável pela produção de acetato, butirato e metano, estes compostos terão concentração alterada, principalmente o metano que é nocivo ao ambiente, com redução da perda de energia por eliminação de gases e, por consequência, aumentando a retenção da mesma.

Apesar de seus benefícios, os ionóforos apresentam elevado custo, impossibilitando seu uso na pecuária de forma mais expressiva. Aliado a isso, a União Européia impôs restrições à importação de carne brasileira produzida com o uso de tais aditivos. Diante de tais barreiras, os pesquisadores começaram a buscar novos meios de manter o desempenho obtido com os ionóforos, mas de forma a reduzir a rejeição da carne a ser exportada.

Em meio aos estudos desenvolvidos, percebeu-se o potencial de uso da quitosana (polímero N-acetil-D-glicosamina), produto derivado da deacetilação da quitina (Goiri et al., 2009a), componente presente no exoesqueleto de crustáceos

e insetos, bem como na parede celular de alguns micro-organismos, possuindo atividade antimicrobiana, homeostática e imuno-estimulante (Senel et al., 2004). Ao ser utilizado inicialmente na nutrição de monogástricos, objetivava-se melhorar a retenção de nitrogênio, crescimento e eficiência alimentar de leitões desmamados (Huang et al., 2005). Com o enfoque na nutrição de ruminantes, a utilização deste composto ainda é pequena.

Deste modo, objetiva-se relatar as atividades desenvolvidas durante a avaliação de diferentes níveis de quitosana em bovinos leiteiros e seus efeitos nos parâmetros fisiológicos.

## 5.2. ARRAÇOAMENTO DOS ANIMAIS

O manejo de arraçamento dos animais foi realizado as 06h00 e 13h00 diariamente. Iniciava-se com o recolhimento das sobras de alimento do dia anterior, realizando-se pesagem para controle do consumo de cada animal. Após pesadas, as sobras eram descartadas em sacos de linhaça. Para a regulação de consumo, procedia-se com o cálculo da porcentagem da sobra do dia anterior.

O consumo de MS ingerido por cada animal era regulado de acordo com as sobras coletadas no dia anterior. Abaixo segue o exemplo dos cálculos realizados (Tabela 2).

Tabela 2. Exemplo do cálculo para a regulação de consumo

	<b>Exemplo 1<sup>1</sup></b>	<b>Exemplo 2<sup>1</sup></b>
Manhã	30,5	24
Tarde	30,5	24
<b>Total</b>	61	48
Sobras	7,98	1,45

<sup>1</sup>Valores fornecidos em kg.

### **Exemplo 1**

Matéria natural (MN) fornecida no dia anterior: 65 kg

Sobras: 8,5 kg

$$8,5/65 = 0,1308$$

$$0,1308 * 100 = \mathbf{13,08\% \text{ de sobras}}$$

### **Exemplo 2:**

MN fornecida no dia anterior: 48 kg

Sobras: 1,45 kg

$$1,45 / 48 = 0,0302$$
$$0,0302 * 100 = \mathbf{3,02\% \text{ de sobras}}$$

No Exemplo 1, a quantidade de sobras foi superior a 10%, sendo necessário reduzir a quantidade de MS a ser fornecida no próximo dia para reduzir a porcentagem de sobras. Neste caso, fez-se uma redução de 1 kg de MS total (volumoso + concentrado).

No exemplo 2, o animal ingeriu quantidade maior de ração, reduzindo, por consequência, a quantidade de sobras encontrada no cocho. Para evitar a restrição do consumo aumentou-se em 1 kg o fornecimento de MS total. Se os valores de sobra observados estiverem muito abaixo ou acima dos valores limites (5 e 10%), realizava-se adição de 2 ou mais quilos de MS na dieta. Nos dois casos, procedia-se com a conversão da MS em matéria natural por meio de tabela levada ao campo.

Depois de ajustado o consumo de cada animal, pesava-se o concentrado e o volumoso para os períodos da manhã e da tarde (Figura 1).



Figura 1. Volumoso e concentrado fornecido aos animais.

A dieta da manhã, após pesada, era despejada diretamente no cocho e o pesado para ser ofertado de tarde era colocado na frente de cada baia para ser fornecido no as 13h00. Finalizada a pesagem do volumoso, dava-se início a pesagem do concentrado, formulado com base em farelo de soja e milho, mantendo a proporção de volumoso:concentrado de 60:40 na MS. Repetia-se o procedimento utilizado para o volumoso, colocando um recipiente no cocho e outro em frente à baia. Para finalizar a atividade de arraçoamento, misturava-se o

concentrado com o volumoso para obter uma mistura homogênea, evitando a seleção de ingredientes por parte do animal e a ocorrência de problemas metabólicos oriundos da elevada ingestão de concentrado. Os animais fora de experimentação recebiam o mesmo tratamento, porém, o ingrediente protéico do concentrado foi o grão de soja.

Sob pedido da coordenação do LPBL, a ração utilizada para animais não experimentais era formulada com grãos de soja como ingrediente protéico. Seu uso era justificado pela redução do preço total da dieta e como descrito por Barlleta (2012), a utilização deste alimento não afeta os parâmetros fisiológicos e produtivos de modo deletério, como produção de leite corrigido, teor e produção de gordura e lactose, teor de proteína, ureia e nitrogênio uréico no leite.

Pode-se verificar que os procedimentos realizados estão corretos, pois o controle da quantidade fornecida de alimentos e do aditivo permite melhor conhecimento do comportamento ingestivo do animal e a sua implicação na resposta fisiológica. Uma vez que conhecendo a qualidade da dieta fornecida, pode-se determinar se o animal está ingerindo os alimentos até atingir a saciedade ou se a distensão do rúmen está influenciando na quantidade de alimentos ingeridos.

### **5.3. PESAGEM DA QUITOSANA**

A quitosana, como descrito anteriormente, é um biopolímero natural derivado da deacetilação da quitina, composto encontrado em abundância na carapaça dos crustáceos (Goiri et al., 2009a). Devido as características antimicrobianas com ação contra bactérias, fungos e leveduras (Fang et al., 1994) e por ser atóxico e biodegradável, o composto recebeu atenção dos pesquisadores, uma vez que a União Européia proibiu o uso de antibióticos como promotores de crescimento (Regulamentação 1831/2003/EC; União Européia, 2003).



Figura 3. Quitosana embalagem de armazenamento (a) e no pote (b) durante a pesagem para o fornecimento aos animais.

Previamente utilizado em não ruminantes por preconizar melhor digestibilidade e desempenho (Huang et al., 2005), a quitosana passou a ser testada em ruminantes, com objetivo de fornecer proteína (El Seed, 2003). Devido sua taxa de degradação lenta, aliada com um tempo de colonização elevado (18 h) e à incapacidade de ser degradada no rúmen, mostrou-se ineficaz. Goiri et al. (2009b) ao testarem diferentes tipos de quitosanas em bovinos observaram que houve influência na fermentação, ocasionando alteração da relação acetato:propionato, favorecendo a relação com o aumento do propionato. Além disso, a quantidade de metano foi reduzida, indicando modificações nas propriedades fermentativas para rotas energeticamente mais eficientes. Araújo (2010), ao avaliar dose/efeito de quitosana sobre novilhos Nelore, constatou que houve melhora na digestibilidade total aparente da matéria seca e dos nutrientes em comparação do tratamento controle (Q0) com o tratamento de maior dosagem de quitosana (Q150), atingindo os valores para coeficiente de digestibilidade para matéria seca (Q0=64,66% vs Q150=69,01%), matéria orgânica (Q0=66,66% vs Q150=70,72%), proteína bruta (Q0=63,12% vs Q150=67,51%), carboidratos totais (Q0=66,64% vs 70,70%), fibra em detergente neutro (Q0=56,62% vs Q150=60,59%) e nutrientes digestíveis totais (Q0=68,07% vs Q150=72,10%) além de manter os parâmetros energéticos positivos, comprovando a ação da quitosana de desviar o metabolismo fermentativo para rotas mais eficientes.

O experimento acompanhado durante o estágio foi realizada objetivando determinar a dose de quitosana mais adequada para alterar os parâmetros

produtivos e fisiológicos de vacas leiteiras. Foi utilizado quatro doses de quitosana (0, 75, 150 e 225 mg/kg de peso corporal) em um duplo quadrado latino 4 x 4, com oito animais por quatro períodos de 20 dias cada, sendo 15 dias de adaptação e 5 dias de coletas. Ao se multiplicar a dose de quitosana pelo peso corporal (PC) do animal, obteve-se a quantidade diária a ser fornecida por animal, que foi dividida por dois para determinar a dose a ser fornecida nos períodos da manhã e da tarde. De modo a assegurar a ingestão completa da dose fornecida, a quitosana era pesada em sacos de papel e colocada diretamente no rúmen. Para assegurar que a dose fosse mais próxima do PC real do animal, realizava-se a pesagem dos animais nos dias 1, 7 e 14 do período experimental e então adequava-se corrigia a dose utilizada(Tabela 2).

Tabela 2. Dosagem de Quitosana por tratamento

Animais	PC <sup>1</sup>	TTO <sup>2</sup>	Qntd. de quitosana <sup>2</sup>	Manhã <sup>2</sup>	Tarde <sup>2</sup>
1	689	225	155,0	77,5	77,5
2	698	0	0	0	0
3	690	75	51,8	25,9	25,9
4	692	150	103,8	51,9	51,9
5	593	225	133,4	66,7	66,7
6	638	150	95,7	47,9	47,9
7	735	0	0	0	0
8	606	75	45,5	22,7	22,7

<sup>1</sup>PC: peso corporal em kg, <sup>2</sup>TTO: tratamento (T0; T75; T150 e T225 mg/kg de PC) , em g.

O controle do peso corporal dos animais é necessário, pois, como a ação da quitosana é similar à monensina sódica, a utilização de quantidades elevadas pode influenciar negativamente nas análises a serem realizadas. Como o objetivo é avaliar a dose de quitosana e seus efeitos nos parâmetros fisiológicos e produtivos do animal, a sub ou superdosagem deste composto influenciaria nos resultados obtidos neste experimento justificando, portanto, a realização das diversas pesagens ao longo do período experimental.

#### 5.4. PREPARO E PESAGEM DAS RAÇÕES EXPERIMENTAIS



As rações utilizadas no LPBL eram formuladas de acordo com a necessidade de cada experimento e de acordo com a idade dos animais, separados em lotes para facilitar o manejo.

O Campus da USP de Pirassununga dispõe de fábrica de ração (Figura 5), responsável pela preparação de todas as rações utilizadas nos setores da Universidade. Para obter o melhor controle das pessoas que têm acesso à fábrica, cada setor preparava as rações semanais em dia fixo da semana.



Figura 5. Fábrica de ração da USP – Campus Pirassununga.

Os encarregados deste preparo realizavam a pesagem dos micro-ingredientes e núcleos a serem utilizados (Figura 6). Os macroingredientes eram pesados automaticamente na sala de comando e adicionados no misturador. Os microingredientes eram adicionados manualmente no misturador, com capacidade máxima total de 250 kg.



Figura 6. Separação dos ingredientes (a) e misturas prontas para preparo (b).

A alimentação dos animais era realizada por equipes, sendo cada uma responsável por um *free-stall*. Para os outros animais do setor, a alimentação era fornecida pelos funcionários, mas pesadas por estagiário, designado como responsável técnico, encarregado de pesar o concentrado e verificar a quantidade deste a ser solicitada para preparo. As categorias eram separadas em lotes (Figura 7) de acordo com faixa etária, facilitando o arraçãoamento. Cada categoria (novilhas, vacas secas e bezerras) era alimentada com concentrado específico, e era realizada constante observação do lote para evitar desperdício ou falta de alimento para os animais. Esta quantidade era adicionada em sacos e numerada de acordo com a numeração do lote. O volumoso era fornecido manualmente com a ajuda da carreta acoplada ao trator.

Como a necessidade de nutrientes é diferente em cada estágio de desenvolvimento animal, a utilização de várias formulações fornece controle mais preciso do aporte de nutrientes a cada categoria. Como no lote de bezerros, o animal está em um período de transição de não ruminante para ruminante (Church,1988) o correto fornecimento de alimentos com qualidade e na quantidade adequada permite o desenvolvimento corporal adequado em menor tempo.

Para as novilhas deve-se fornecer uma ração que atenda as necessidades de manutenção e de reprodução, de modo que está se inicie no menor tempo possível, reduzindo o tempo para início de gestação e conseqüente produção de leite, que é o objetivo do setor de bovinocultura.



Figura 7. a) Lotes bezerros, b) lotes novilhas, c) lotes vacas secas e d) lotes alojados no free-stall.

### 5.5. PESAGEM DO INDICADOR E COLETA DE FEZES

Para o indicador estar presente na coleta de fezes, era adicionado diariamente do 10° ao 19° dias do período experimental. Eram pesados 15 g de óxido de cromo, acondicionado em sacos de papel e adicionados diretamente no rúmen (via fistula), juntamente com a quitosana (Figura 8).





Figura 8. a) Óxido de cromo e quitosana pesados b) adição via intraruminal

A coleta de fezes com óxido de cromo é realizada para a obtenção de amostras que, após processadas, indiquem a quantidade de nutrientes eliminados pelo animal e permitindo a estimativa total de fezes.

A coleta de fezes foi realizada nos dias 17, 18 e 19 do período experimental, duas vezes ao dia, às 8h00 e às 14h00. Coletavam-se as amostras de fezes diretamente do reto, com o auxílio de sacos plásticos até obter quantidade aproximada de 100 g sendo estas, posteriormente, identificadas e acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas em freezer em temperatura de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o dia do processamento (Figura 9).



Figura 9. Coleta de fezes

Para o cálculo de digestibilidade, optou-se indicadores externos sendo que estas substâncias externas são consideradas eficientes nas mensurações de fluxo fecal e omasal e na estimativa da ingestão de matéria seca (Maeda, 2011).

Este método indireto de mensuração possui variações nas técnicas utilizadas. O protocolo mais usual preconiza a adição de determinada quantidade de indicador duas vezes ao dia, durante dez a quinze dias do período experimental, e coleta das fezes nos últimos três a cinco dias do fornecimento do indicador, também duas vezes ao dia. Entretanto o uso de duas aplicações não garante a precisão na avaliação de consumo de MS. Soares et al. (2004) ao testarem as metodologias com o óxido cromo e o método direto nas estimativas de digestibilidade, produção fecal e consumo de MS de vacas em lactação, constataram superestimação de 9,25% do consumo de MS ao ser utilizada a técnica do óxido crômico, mesmo com este sendo adicionado duas vezes ao dia.

Em função do estresse, principalmente em bovinos de corte nos momentos de coleta, a realização do procedimento como descrito é dificultada. Por isso, utiliza-se somente uma dose de indicador diária nesses animais. Aliado a isso, Kozloski et al. (2006) constataram que a produção fecal em pastejo pode ser estimada com a ajuda do cromo, sendo este utilizado somente uma vez ao dia no período da tarde, com a realização de duas amostragens no dia, corroborando com a utilização de uma única dose diária de óxido de cromo.

A realização de coletas no mesmo horário nos três dias de coletas não considera o efeito de horário, influenciando assim na composição da amostra. O adequado seria utilizar diferentes horários no período de coleta, para se obter uma melhor representatividade da composição da amostra coletada, como, por exemplo, dia 1 (8h00 e 14h00) dia 2 (10h00 e 16h00) e dia 3 (12h00 e 18h00).

## **5.6. COLETA DE URINA**

Ao se avaliar o balanço de nitrogênio (N), é necessário além de realizar a coleta de fezes, a coleta de urina, já que também é perdido N por essa via de excreção.

Nos dias 16 e 17 do período experimental, procedeu-se com a coleta de amostras de urina, uma vez por dia às 12h00, coletando-se amostra representativa da urina do animal (aproximadamente 100 mL) para as análises

posteriores. A urina foi colocada em pote plástico previamente limpo e identificado com a numeração do animal, que era estimulado externamente (massagem do clitóris) até a liberação da urina. Depois de atingida a quantidade desejada, a mesma era levada até o laboratório para preparação das subamostras destinadas a cada análise específica, como alantoína e creatinina.

No laboratório, a amostra inicial era filtrada para limpar qualquer impureza remanescente que possa interferir a análise. Preparavam-se dois potes para cada animal: o primeiro recebia a urina sem diluição, mas tinha adição de 1mL de  $H_2SO_4$  para cada 50 mL de urina, para a realização da análise de N total (Figura 11 A), e o segundo pote para análise posterior de ácido úrico, sendo diluída 10 mL de urina em 40 mL de  $H_2SO_4$  a 0,036 N.

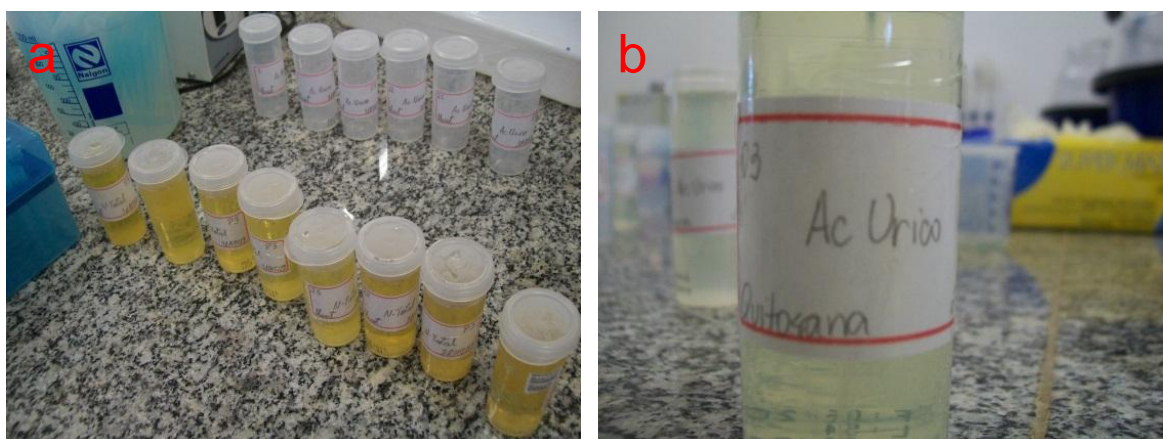


Figura 10. a) Potes para análise de N total e b) Ácido úrico.

Chen & Gomes (1992) demonstraram o método de excreção de derivados de purina, considerando que o fluxo duodenal de ácidos nucleicos é, predominantemente, de origem microbiana e, após digestão intestinal dos nucleotídeos de purinas, as bases nitrogenadas adenina e guanina são catabolizadas e excretadas na urina, sendo a principal alantoína, mas também xantina, hipoxantina e ácido úrico.

A alantoína e o ácido úrico constituem 98% dos derivados de purinas excretados na urina, uma vez que, a xantina e a hipoxantina são convertidas a ácido úrico por ação da xantina oxidase (Rennó et al., 2000).

A creatinina é derivada da creatina, sendo formada pela remoção da água da creatina-fosfato, originada do tecido muscular (Harper et al., 1982). A creatinina, por não ser necessária ao corpo, é excretada em elevadas quantidades pelos rins. Como sua excreção é proporcional ao peso do animal e com concentração constante ao longo do dia, pode ser utilizada para estimar o volume diário de urina excretada de um animal com peso conhecido.

Desta forma, a análise da urina para identificação de creatinina e posteriormente alantoína e ácido úrico é justificada, sendo realizada de forma adequada para obtenção da excreção diária total de urina e derivados de purinas.

### 5.7. COLETA DE SANGUE

A coleta de sangue foi realizada no 16º dia do período experimental. Coletaram-se as amostras de sangue de cada animal antes do fornecimento do alimento do período matutino (6h00), por punção da artéria coccígea utilizando tubos vacuolizados (vacutainer) de 10 mL para a dosagem dos parâmetros sanguíneos glicose, colesterol HDL, proteínas totais, albumina, uréia e nitrogênio uréico.

Os tubos foram imediatamente refrigerados e centrifugados a 3000 rotações por minuto, por 10 minutos para separação do soro do plasma (Figura 11). O centrifugado resultante foi transferido para tubetes plásticos previamente identificados, e então refrigerados a -20°C para posteriores análises.

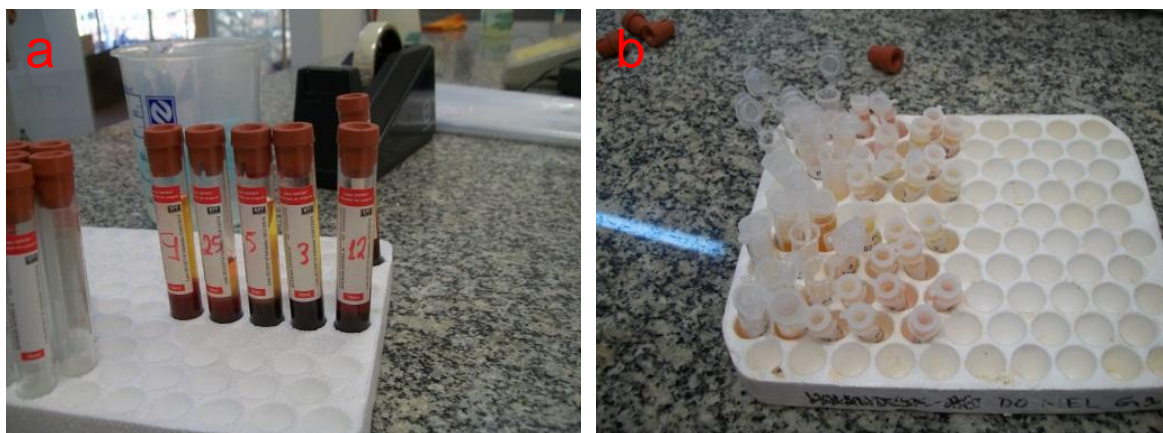


Figura 11. a) Amostras de sangue no vacutainer e b) tubetes para refrigeração.

Ao utilizar novo alimento ou aditivo, é necessário conhecer o efeito nos parâmetros ruminais e também a resposta destes compostos no metabolismo animal. Para este conhecimento, a análise do perfil sanguíneo se torna importante ferramenta, pois permite avaliar a toxicidade dos aditivos alimentares (Langston et al., 1985).

A ureia é sintetizada no fígado em quantidades proporcionais à concentração da amônia ruminal e sua concentração no sangue está relacionada aos níveis na ração e relação energia/proteína da dieta (Wittwer et al., 1993). Ao avaliar o efeito da monensina no metabolismo energético de vacas no início de lactação, Duffield et al. (1998) constataram que houve aumento na concentração de glicose circulante no sangue, bem como da ureia podendo ser indicativo de redução na eficiência de utilização da proteína da dieta.

Como parte da proteína que chega ao rúmen se transforma em amônia para ser utilizada pela microbiota ruminal na formação de proteína microbiana, se houver excesso de proteína ou falta de carboidratos não ocorrerá a sincronização da amônia com a síntese microbiana. O excesso de amônia será absorvido pela parede ruminal, entrando na circulação sanguínea e sendo levado ao fígado, onde é transformado em ureia que, também, ficará na corrente sanguínea, sendo parte reciclada pelo rúmen e parte eliminada via urina.

O propionato, ao ter sua concentração aumentada no rúmen, resultará no aumento da glicose presente no sangue, por ser seu precursor (Maas et al., 2001). Como a quitosana e os ionóforos reduzem a quantidade de acetato e eleva a quantidade de propionato, a quantidade de glicose encontrada no sangue atua como indicador dos processos fermentativos.

## **5.8. COLETAS DE LEITE**

Foram coletadas amostras de leite entre o 16 e 18º dias do período experimental, por meio de amostrador acoplado na ordenhadeira automática, sendo realizadas nas ordenhas da manhã e da tarde e misturadas até obtenção de 100 mL de leite, acondicionados em potes plásticos previamente identificados (Figura 12<sup>a</sup> e b).



Depois de realizada a coleta do dia, as amostras eram levadas ao laboratório para análise no aparelho Lactoscan<sup>®</sup> (Figura 12c), que fornecia os resultados de gordura, densidade, lactose, sólidos, proteína total e água.



Figura 12. a) Amostras de leite e b) pote identificado e c) aparelho Lactoscan<sup>®</sup>.

Silva (2006) ao avaliar o efeito do processamento de grãos de linhaça adicionados ou não de monensina sobre os parâmetros quali e quantitativos do leite, constatou que os tratamentos sem a adição de monensina apresentaram maior produção de leite corrigido para 3,5% de gordura. Como a gordura do leite tem como precursor o acetato e a monensina atua diminuindo a relação acetato: propionato, o teor de gordura presente no leite sofre redução, juntamente com a porcentagem de sólidos totais. Tais observações também foram encontradas por Eifert et al. (2005), que verificaram, além da redução do teor de gordura, aumento na quantidade de proteína no leite.

A amostragem do leite durante o experimento como uma variável resposta foi importante e um procedimento correto, pois ao realizar a adição de um novo alimento ou aditivo na dieta de vacas leiteiras, se faz necessário conhecer o seu efeito na composição do leite, uma vez que este é o produto principal almejado pelos produtores de leite, portanto, devem apresentar qualidade.

A amostragem do leite como variável resposta foi importante e procedida corretamente, pois as alterações que podem ocorrer nas características qualitativas no leite podem influenciar sua comercialização, podendo inviabilizar a utilização deste aditivo.

## 5.9. COLETAS DE LÍQUIDO RUMINAL

As coletas de líquido ruminal foram realizadas no 20º dia do período experimental, em cinco pontos no rúmen, sendo três superiores (cranial, medial e

caudal) e dois inferiores (cranial e caudal), realizadas às 0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas após a alimentação matinal. As amostras coletadas foram homogeneizadas para a extração do líquido ruminal, no qual era imediatamente mensurado o pH. Nos horários 4 e 8 h, coletava-se a parte sólida do conteúdo ruminal juntamente com duas partes da fração líquida para extração de RNA (Figura 13).



Figura 13. a) Separação das frações sólidas e líquidas e b) leitura de pH.

Dependendo da composição do alimento, há alteração na produção dos ácidos graxos voláteis acetato, propionato e butirato. Em uma dieta com maior teor de carboidratos fermentáveis, como o amido, por exemplo, haveria maior quantidade de ácido propiônico. Se a alimentação possuir maior quantidade de fibras, como na alimentação baseada em forragem, a relação ácido propiônico: acético sofrerá alteração em favor do acético. Entretanto, a quantidade de metano produzida também se eleva e como este composto pode representar entre 6 e 18% da energia bruta da dieta que será perdida fermentação (Pedreira & Primavesi, 2006).

Ao avaliar o efeito da quitosana e da monensina na fermentação *in vitro* pela técnica de simulação de rúmen (Rusitec®) usando dieta com relação volumoso:concentrado de 50:50, Goiri et al. (2009c) observaram aumento na quantidade molar de propionato para ambos aditivos (22,4 mmol/d para o tratamento controle, 31mmol/d para a monensina e 38,3mmol/d para baixa dose de quitosana) mas a quitosana elevou as concentrações de propionato em 21%

em relação à monensina. Os mesmos autores em 2010 realizaram ensaios com ovelhas fistuladas e constataram efeito da quitosana na modificação do ambiente ruminal, pela redução da população de bactérias celulolíticas e, conseqüentemente, da quantidade de acetato e butirato.

Como a quitosana tem efeito similar à monensina sódica, alterando a fermentação e por consequência, o perfil de ácidos graxos volatéis (AGV) produzidos no rúmen, uma análise para mensurar a quantidade destes compostos e os tipos de micro-organismos presentes no rúmen torna-se variável importante a ser observada. De acordo com a característica a ser melhorada, o acréscimo ou decréscimo destas quantidades vai ser de fundamental importância, justificando assim a realização desta coleta.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A oportunidade de estágio na USP foi de grande valia para a complementação da minha formação acadêmica. Tal oportunidade trouxe nova visão da área de nutrição animal, aumentando ainda mais a vontade de obter novos conhecimentos.

Poder acompanhar e, por diversas vezes, estar à frente deste projeto de importância significativa para o campo nutricional, contribuiu de diversas formas para a minha formação como nutricionista, seja nos procedimentos adotados em laboratório ou na preparação para coletas a campo.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, A.P.C de. **Efeito de diferentes concentrações de quitosana na dieta de novilhos Nelore**. 2001. 90f. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Produção Animal) – Universidade de São Paulo, Pirassununga.

BARLLETA, R.V.; RENNÓ, F.P.; GANDRA, J.R. et al. Desempenho e parâmetros sanguíneos de vacas leiteiras alimentadas com grão de soja. **Archivos de Zootecnia**, v.61, n. 236, p.484-492, 2012.

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

DUFFIELD, T.F.; SANDALS, D.; LESLIE, K.E. Effect of prepartum administration of monensina in a controlled-release capsule on postpartum energy indicators in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.81, p.2345-2354, 1998.

EIFERT, E.C.; LANA, R.P.; LANNA, D.P.D. et al. Efeitos do fornecimento de monensina e óleo de soja na dieta sobre o desempenho de vacas leiteiras na fase inicial da lactação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.6, p.2123-2132, 2005.

EL-SEED, A.N.M. A.F.; KAMEL, H.E.M.; SEKINE et al. Chitin and chitosan as possible novel nitrogen sources for ruminants. **Canadian Journal of Animal Science**, v.83, p.161-163, 2003.

FANG, S.W.; LI, C. F.; SHIH, D.Y.C. Antifungal activity of chitosan and its preservative effect on low-sugar Candied kumquat. **Journal of Food Protection**, v.57, p.136-140, 1994.

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

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

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

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

HUANG, R.; YIN, Y.L.; WU, G.Y. Effect of dietary oligochitosan supplementation on ileal digestibility of nutrients and performance in broilers. **Poultry Science**, v.84, p.1383-1388, 2005.

KOZLOSKI, G.V.; NETTO, D.P.; OLIVEIRA, L. et al. Uso de óxido de cromo como indicador da excreção fecal de bovinos em pastejo: variação das estimativas em função do horário de amostragem. **Ciência Rural**, v.36, n.2, p.599-603, 2006.

LANGSTON, V.C.; GALEY, F.; LOVELL, R. et al. Toxicity and therapeutics of monensina: A review. **Veterinary Medicine**, v.80, p.75, 1985.

MAEDA, E.M.; ZEOULA, L.M.; GOMES, H.C.C et al. Avaliação de indicadores usados nos estudos de ingestão e digestibilidade em bovinos e bubalinos. **Archivos de Zootecnia**, v.60 n.229, p.123-131, 2011.

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

PEDREIRA, S.M.; PRIMAVESI, O. O impacto da produção animal sobre o ambiente. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. (Eds.) **Nutrição de ruminantes**. 1 ed. Jaboticabal: Funep, 2006. p.497-511.

RENNÓ, L.N.; VALADARES, R.F.D.; LEÃO, M.I. et al. Estimativa da produção de proteína microbiana pelos derivados de purinas na urina em novilhos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, p.1223-1234, 2000.

RUSSELL, J.B.; MARTIN, S.A. Effects of various methane inhibitors on the fermentation of amino acids by mixed rumen microorganisms *in vitro*. **Journal of Animal Science**, v.59, n. 5, p.1329-1338, 1984.

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

SILVA, D.C. Produção e qualidade do leite e da manteiga de vacas alimentadas com grãos de linhaça e monensina sódica. 2006. 74f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

SOARES, P.G.S.; BERCHIELLI, T.T.; AROEIRA, L.J.M. et al. Estimativas de consumo do capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum), fornecido picado para vacas lactantes utilizando a técnica do óxido crômico. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.3, p.811-820, 2004.

WITTEWER, F.G., GALLARDO, J.; REYES, J. et al. Bulk milk urea concentrations and their relationship with cow fertility in grazing dairy herds in Southern Chile. **Preventive Veterinary Medicine**, v.38, p.159-166, 1993.