

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA INCLUSÃO DO LÍQUIDO DA
CASCA DA CASTANHA DE CAJU EM DIETAS PARA
RUMINANTES

Autora: Tatiana García Díaz
Orientador: Prof. Dr. Antonio Ferriani Branco
Co-orientador: Prof. Dr. Luís Carlos Vinhas Ítavo

MARINGÁ
Estado do Paraná
Abril - 2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA INCLUSÃO DO LÍQUIDO DA
CASCA DA CASTANHA DE CAJU EM DIETAS PARA
RUMINANTES

Autora: Tatiana García Díaz

Orientador: Prof. Dr. Antonio Ferriani Branco

Co-orientador: Prof. Dr. Luís Carlos Vinhas Ítavo

“Dissertação apresentada, como parte das exigências para a obtenção do título de MESTRE EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá – Área de concentração: Produção Animal.”

MARINGÁ
Estado do Paraná
Abril - 2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

García Díaz, Tatiana
G216a Avaliação in vitro da inclusão do líquido da casca da castanha de caju em dietas para ruminantes / Tatiana García Díaz. -- Maringá, 2013.
xiii, 43 f. : il. (algumas color.), figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Ferriani Branco.
Coorientador: Prof. Dr. Luís Carlos Vinhas Ítavo.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, 2013.

1. Líquido da casca da castanha de caju (LCC) - Ácido anacárdico. 2. Líquido da casca da castanha de caju (LCC) - Cardanol. 3. Líquido da casca da castanha de caju (LCC) - Cardol. 4. Ruminantes - Nutrição - Digestibilidade - Amônia. 5. Ruminantes - Nutrição - Digestibilidade - Produção de gás. 6. Ruminantes - Dieta - Concentrado. 7. Ruminantes - Nutrição - Aditivos. I. Branco, Antonio Ferriani, orient. II. Ítavo, Luís Carlos Vinhas, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. IV. Título.

CDD 21.ed. 636.0852

AMMA-00935



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA INCLUSÃO DO
LÍQUIDO DA CASCA DE CASTANHA DE
CAJU EM DIETAS PARA RUMINANTES**

Autora: Tatiana Garcia Diaz
Orientador: Prof. Dr. Antonio Ferriani Branco

TITULAÇÃO: Mestre em Zootecnia - Área de Concentração Produção
Animal

APROVADA em 01 de abril de 2013.

Prof. Dr. Geraldo Tadeu
dos Santos

Prof. Dr. Rafael Henrique de
Tonissi e Buschinelli de Goes

Prof. Dr. Antonio Ferriani Branco
(Orientador)

“A autêntica riqueza da experiência humana perderia parte de sua alegria se não existissem limitações a superar. O cume da colina não teria nem a metade de sua maravilha se não houvesse vales obscuros para atravessar”.

Halina Boulez.

À minha Avó,

Laura Rosa Paez (*in memoriam*)

Apesar de não estar presente hoje, sinto um enorme amor e gratidão por todos os ensinamentos e cuidados de tantos anos.

Ao meu pai,

Carlos Julio García,

Pelo apoio incondicional e por suas palavras de ânimo e carinho.

À minha mãe,

Jabeth Díaz,

Porque com seu amor e confiança, me deu a força para chegar até aqui.

À minha irmã,

Lorena García Díaz,

Por estar sempre junto a mim, pela compreensão e amizade.

Com muito carinho

DEDICO!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, pela vida e coisas maravilhosas que me foram concedidas. Pela saúde e amparo em todos os momentos e, principalmente por colocar em meu caminho pessoas maravilhosas e especiais;

Aos meus pais e irmã, porque sempre me ofereceram o melhor através dos ensinamentos e formação. Porque, mesmo distantes, mantiveram-se do meu lado com amor, incentivando-me para continuar a cada dia apesar dos obstáculos.

Ao meu colega, amigo e namorado Ivan Camilo, por todo o amor, apoio, companheirismo, e incentivo, além de muita paciência e compreensão.

Ao Prof. Dr. Antonio Ferriani Branco, pela orientação e sua valiosa influência na minha formação, pela dedicação e confiança depositadas em mim;

Ao Professor Luís Carlos Vinhas, pela co-orientação, ensinamentos e ajuda na realização do meu trabalho;

Ao Programa de Pós- graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá pelo acolhimento e oportunidade de realizar meus estudos de mestrado;

Aos professores do Programa de Pós- graduação em Zootecnia, por contribuir com minha formação acadêmica. Em especial, ao Professor Dr. Elias Nunes Martins, pela disposição e apoio nas análises estatísticas.

À minha amiga Silvana Teixeira, pelo carinho e amizade sincera, pelos conselhos e dedicação, nunca medindo esforços para me ajudar. Foi essencial para meu crescimento pessoal e profissional.

À minha amiga Ana Lucia Teodoro, pela ajuda na realização do meu experimento, compreensão e companheirismo;

Ao meu amigo Roman David Castañeda, por contribuir com a realização do meu sonho, pela ajuda e pela confiança;

Aos meus colegas de trabalho, Milene Osmari, Ana Lucia Teodoro, Laiz Fiorilli, Beryk Salab, Diogo Antignani Coutinho, pelo convívio nas jornadas realizadas.

Ao Denílson dos Santos Vicentin, secretário do Programa de Pós-graduação em Zootecnia, pela ajuda, paciência e amizade.

Aos funcionários do LANA (Laboratório de Análises de Alimentos - UEM), Cleusa Volpato, Creuza Souza Azevedo, Hermógenes Augusto de Carmago Neto e Roberto Carlos, pela grande ajuda na condução do meu experimento.

Ao funcionário da FEI (Fazenda Experimental de Iguatemi - UEM), Sr. Wilson Marsola, pela disposição em colaborar sempre que precisei;

Aos amigos, Julio Cezar Barreto, Francisco Wilson Oliveira, Sandra Galbeiro e Fernanda Granzotto pela amizade, apoio e carinho;

Aos meus amigos Colombianos, Duvan Ocampo, Viviana Ramirez, Nery Huertas e Sandra Cifuentes, pelo convívio de tantos anos, porque apesar da distância nossa amizade se fortalece a cada dia. Obrigada por fazerem parte da minha vida.

A todos os que, de uma ou outra maneira, contribuíram com a elaboração deste trabalho.

OBRIGADA!

BIOGRAFIA

TATIANA GARCÍA DÍAZ, filha de Carlos Julio García Rodríguez e Jabeth Emilia Díaz Páez, nasceu na cidade de Ibagué - Tolima, Colômbia, no dia 20 de Fevereiro de 1987.

Cursou os estudos de ensino médio no Colégio Exalumnas de la Presentación - Ibagué - Tolima, concluindo no ano de 2003.

Em fevereiro de 2005, iniciou o curso de graduação em Medicina Veterinária e Zootecnia na Universidad del Tolima, concluindo em Janeiro de 2011.

Em março de 2011, iniciou no Programa de Pós- graduação em Zootecnia, em nível de Mestrado, área de concentração: Produção Animal, na Universidade Estadual de Maringá, realizando estudos na área de Nutrição de Ruminantes.

No dia 1 de Abril de 2013, submeteu-se à banca para defesa da Dissertação.

ÍNDICE

| | Página |
|--|--------|
| LISTA DE TABELAS..... | viii |
| LISTA DE FIGURAS..... | ix |
| RESUMO..... | x |
| ABSTRACT..... | xii |
| I – INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1.1.Caju..... | 3 |
| 1.2.Composição do líquido da casca da castanha de caju..... | 5 |
| 1.3.Métodos para a obtenção do líquido da casca da castanha de caju..... | 6 |
| 1.4.Atividade antimicrobiana do líquido da casca da castanha de caju..... | 7 |
| 1.5.Efeitos do líquido da casca da castanha de caju sobre a fermentação ruminal..... | 8 |
| 1.6.Referências bibliográficas..... | 11 |
| II - OBJETIVOS GERIAS..... | 14 |
| III- Digestibilidade, cinética e parâmetros de fermentação ruminal <i>in vitro</i> de dietas para ruminantes com inclusão de líquido da casca da castanha de caju..... | 15 |
| RESUMO..... | 15 |
| ABSTRACT..... | 16 |
| Introdução..... | 17 |
| Material e Métodos..... | 18 |
| Resultados e Discussão..... | 25 |
| Conclusões..... | 38 |
| Referências bibliográficas..... | 39 |
| VI. CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 43 |

LISTA DE TABELAS

| | Página |
|--|--------|
| III- Digestibilidade, cinética e parâmetros de fermentação ruminal <i>in vitro</i> de dietas para ruminantes contendo líquido da casca da castanha de caju..... | 14 |
| Tabela 1. Composição bromatológica dos alimentos utilizados nas dietas experimentais (g/kg de matéria seca)..... | 18 |
| Tabela 2. Composição das dietas experimentais (g/kg de MS)..... | 19 |
| Tabela 3. Coeficientes de digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca (g/g) de dietas para ruminantes com níveis crescentes de concentrado e líquido da casca da castanha de caju..... | 26 |
| Tabela 4. Parâmetros cinéticos da fermentação ruminal de dietas com níveis crescentes de concentrado e líquido da casca da castanha de caju..... | 29 |
| Tabela 5. Desdobramento da interação entre os níveis de líquido da casca da castanha de caju e concentrado sobre a fração A e C, e a produção total de gás (fração A+D)..... | 33 |
| Tabela 6. Valores médios da concentração <i>in vitro</i> de amônia (mg/dL) de dietas com níveis de concentrado e líquido da casca da castanha de caju (LCC)..... | 35 |
| Tabela 7. Valores médios da concentração <i>in vitro</i> de pH de dietas com níveis crescentes de concentrado e de líquido da casca da castanha de caju..... | 37 |

LISTA DE FIGURAS

| | Página |
|--|--------|
| I- INTRODUÇÃO | 1 |
| Figura 1. Principais constituintes do líquido da casca da castanha de caju..... | 5 |
| Figura 2. Principais métodos de extração do líquido da casca da castanha de caju..... | 6 |
| Figura 3. Processo de decarboxilação do ácido anacárdico..... | 7 |
| III- Digestibilidade, cinética e parâmetros de fermentação ruminal <i>in vitro</i> de dietas para ruminantes contendo líquido da casca da castanha de caju | 15 |
| Figura 1. Metodologia <i>in vitro</i> para determinação de amônia e pH do líquido ruminal..... | 24 |
| Figura 2. Curvas de produção cumulativa de gás em mL de gás/ 100 mg de MS incubada das dietas com níveis de concentrado e líquido da casca da castanha de caju. LCC..... | 31 |
| Figura 3. Correlação entre a produção de gás e substrato degradado (mg) das dietas experimentais..... | 32 |
| Figura 4. Variação na concentração <i>in vitro</i> de N-amoniaco (N-NH ₃) no líquido ruminal durante um período de 8 horas de incubação..... | 36 |

RESUMO

Os extratos de plantas, principalmente os óleos funcionais são considerados aditivos alternativos que podem melhorar o metabolismo microbiano, as características da fermentação ruminal e, a digestibilidade total da dieta em animais ruminantes. O líquido extraído da casca da castanha de caju (LCC) é um óleo funcional, caracterizado por ser fonte natural de compostos de cadeia fenólica longa e insaturada. Por suas características químicas, o LCC pode ser capaz de influenciar positivamente a digestibilidade da dieta e, induzir mudanças sobre os produtos finais da fermentação ruminal. Embora alguns dos efeitos do LCC já tenham sido demonstrados, os estudos disponíveis sobre o óleo ainda são limitados, evidenciada a necessidade de pesquisas que estudem os benefícios do LCC na nutrição de ruminantes. Objetivou-se com este trabalho, avaliar o efeito do LCC em dietas para ruminantes com níveis crescentes de concentrado, sobre os parâmetros da digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS), a cinética da produção cumulativa de gases, e parâmetros da fermentação ruminal, concentração de N- amoniacal (N-NH₃) e pH *in vitro*. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 5x4+1, com cinco níveis de concentrado (200, 400, 600, 800 e 1000 g/kg) e quatro níveis de LCC (0; 0,3; 0,6 e 1,2 g/kg) e uma dieta controle composta apenas por volumoso, totalizando 21 tratamentos. Utilizou-se silagem de milho como volumoso e, milho moído, farelo de soja, uréia e suplemento mineral, como ingredientes concentrados. Foi observada interação ($P \leq 0,01$) entre os níveis de concentrado e de LCC sobre a DIVMS, a fração de rápida degradação (fração A), o *lag time* e a produção total de gás. A inclusão de concentrado aumentou linearmente ($P \leq 0,05$) a DIVMS, enquanto que os níveis de LCC resultaram em efeito quadrático ($P \leq 0,001$) sobre esta variável, sendo estimado o ponto de máxima DIVMS com inclusão de 0,5 g LCC/kg MS. A produção total de gás, a fração de lenta degradação (fração D) e sua respectiva taxa de degradação (fração E) aumentaram

linearmente ($P \leq 0,01$) conforme aumentaram os níveis de concentrado na dieta. Não foi encontrado efeito ($P > 0,05$) dos níveis de LCC sobre os parâmetros de produção de gás, quando analisado simultaneamente em todas as dietas. Os níveis de concentrado resultaram em aumento linear ($P < 0,001$) das concentrações de N-NH₃ e reduziram ($P < 0,001$) o pH no líquido ruminal. Os níveis de LCC diminuíram ($P < 0,001$) a concentração de N-NH₃ e aumentaram ($P < 0,001$) o pH do líquido ruminal. Houve alta correlação entre a produção total de gás e o desaparecimento do substrato ($r = 0,94$), indicando que a produção de gás é uma técnica precisa para estimar a curva de digestão da MS. A inclusão de 0,5 g LCC/kg MS de dietas para ruminantes melhora a DIVMS, sem afetar os parâmetros cinéticos da fermentação ruminal. A adição de LCC em dietas para ruminantes reduz a produção de amônia, e evita reduções drásticas do pH ruminal, consequente da inclusão de ingredientes concentrados, resultados que favorecem o melhor aproveitamento dos nutrientes da dieta.

Palavras chaves: ácido anacárdico, amônia, cardanol, cardol, concentrado, produção de gás

ABSTRACT

Plant extracts, mainly functional oils, are considered alternative additives that can improve the microbial metabolism, ruminal fermentation characteristics and diet's digestibility in ruminants. The liquid extracted from the cashew nutshell (CNSL) is a functional oil characterized for being a natural source of unsaturated long-chain phenolic compounds. The CNSL may be able to positively influence the digestibility of the diet and induce changes on the end-products of fermentation in the rumen. Although some of the effects of CNSL have already been demonstrated, the available studies on the oil are still limited, so future research to examine the benefits of CNSL in the nutrition of ruminants are required. The objective of this study was to evaluate the effect of cashew nutshell liquid (CNSL) in ruminants diets containing increasing levels of concentrate on *in vitro* dry matter digestibility (IVDMD), and also on *in vitro* cumulative gas production kinetic, parameters of rumen fermentation, ammonia-N (NH₃-N) and ruminal pH. The experimental design was completely randomized in a factorial arrangement 5x4+ 1, with five levels of concentrate (200, 400, 600, 800 and 1000 g/kg) and four levels of CNSL (0, 0.3, 0.6 and 1.2 g/kg) and a control diet composed only by roughage, totalizing 21 treatments. Corn silage was used as forage and ground corn, soybean meal, urea and mineral supplement as concentrated ingredients. An interaction was observed ($P \leq 0.01$) between the levels of CNSL and the concentrate on the IVDMD, rapid degradation fraction (fraction A), *lag time* and total gas production. The inclusion of concentrate increased the ($P \leq 0.05$) IVDMD linearly, while levels of CNSL resulted in a quadratic effect ($P \leq 0.001$) on this variable, being estimated the point of maximum IVDMD at the inclusion of 5 g of CNSL /kg of concentrate. The total gas production, the fraction of slow degradation (fraction D) and accompanying degradation rate (fraction E) increased linearly ($P \leq 0.01$) when levels of

concentrate increased. Levels of CNSL did not influence ($P>0.05$) the parameters of gas production when analyzed simultaneously in all diets with the inclusion of concentrate. The levels of concentrate resulted in a linear increase ($P<0.001$) of $\text{NH}_3\text{-N}$ concentrations and a reduction ($P<0.001$) in ruminal pH. CNSL levels decreased ($P<0.001$) the concentration of $\text{NH}_3\text{-N}$ and increased ($P<0.001$) ruminal pH. There was a high correlation between the total gas production and disappearance of the substrate ($r = 0.94$), indicating that the production of gas may be a precise technique for estimating the curve of digestibility of foods. The inclusion of 0.5 g of CNSL /kg of concentrate in high concentrate diets improves IVDMD, reduces the production of ammonia, and avoids drastic reductions in ruminal pH resulting from the addition of concentrated ingredients. These results improve the utilization of nutrients.

Key-words: Anacardic acid, ammonia, cardanol, cardol, concentrate, gas production.

I- INTRODUÇÃO

O processo de digestão em animais ruminantes é o resultado da atividade física e microbiológica do rúmen-retículo, considerado como um processo dinâmico e muito complexo. A participação dos microrganismos anaeróbios na fermentação ruminal converte os componentes dietéticos em ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), vitaminas do complexo B, vitamina K, metano, dióxido de carbono, lactato e amônia (Owens & Goetsch, 1993).

Os AGCC produzidos durante o processo fermentativo são absorvidos através da parede ruminal e utilizados como principal fonte de energia para o ruminante. Os microrganismos envolvidos no processo fermentativo constituem a maior fonte de proteína, podendo representar até 80% dos aminoácidos que chegam ao intestino delgado dos ruminantes (Church, 1988; Kozloski, 2011).

Por outro lado, a fermentação ruminal também pode gerar metano, o que resulta em perdas de até 12% da energia contida nos alimentos (Morais et al., 2011), situação que limita o desempenho produtivo dos ruminantes e contribui com a liberação de poluentes ao meio ambiente (Benchaar & Greathead, 2011). Somado a isso, as perdas de nitrogênio são elevadas, devido à menor eficiência do ruminante em comparação a outras espécies na utilização da proteína dietética (Broderick et al., 1991).

A eficiência da digestão ruminal depende principalmente dos nutrientes que compõem a dieta, sendo este, o fator mais importante que influencia o número e a distribuição da população microbiana no rúmen (Valadares Filho & Santos Pina, 2011). Deste modo, o correto balanço dos nutrientes é necessário para que o crescimento microbiano não seja limitado, evitando assim, que a produtividade dos ruminantes seja comprometida.

O fornecimento de alimentos concentrados eleva a quantidade de carboidratos não estruturais e, conseqüentemente, o teor energético da ração, sendo uma alternativa frequentemente utilizada no setor para maximizar o desempenho produtivo dos bovinos. No entanto, dietas ricas em concentrado alteram a fermentação ruminal, ao reduzir o pH do rúmen, situação que pode comprometer a digestibilidade da fibra e, aumentar o risco de acidose ruminal, distúrbio que desencadeia transtornos metabólicos graves (Vasconcelos et al., 1998).

Por tal motivo, o uso de aditivos alimentares surgiu como uma alternativa para potencializar o desempenho animal sem prejudicar a fermentação ruminal, aditivos que podem melhorar os padrões de fermentação e, reduzir as perdas energéticas resultantes do excesso da formação de metano (Berndt et al., 2007).

Os principais aditivos utilizados no Brasil ainda são os ionóforos, sua ação se resume em alterar a população microbiana do rúmen (Morais, 2011), selecionando as bactérias Gram-negativas e inibindo o crescimento das Gram-positivas, situação que favorece o aumento da produção de propionato e reduzem as concentrações de ácido acético, ácido láctico e metano (Shinkai et al., 2012). Embora a adição dos ionóforos na dieta de bovinos resulte em mudanças no ambiente ruminal que tornam o sistema produtivo mais eficiente, os problemas com toxicidade e resistência bacteriana impedem a utilização destes produtos, como aditivos alimentares para os ruminantes em muitos países (Barton, 2000).

Nesse contexto, os extratos de plantas, principalmente os óleos funcionais podem ser utilizados como aditivos alternativos, os quais podem melhorar o metabolismo microbiano, aumentar as concentrações de propionato no rúmen e, a digestibilidade total da dieta (Maia et al., 2006, Hess et al., 2008).

Os óleos funcionais são produtos naturais extraídos principalmente de plantas oleaginosas, são constituídos por triglicérides, com uma alta quantidade de ácidos graxos insaturados. Esta composição característica destes compostos permite-lhes ser rapidamente absorvidos pelos microrganismos, sendo incorporados facilmente aos lipídios da membrana bacteriana, causando sua respectiva ruptura e lise celular (Paula et al., 2012, Shinkai e tal., 2012). Esta ação antimicrobiana dos óleos funcionais inibe principalmente o crescimento das bactérias Gram-positivas, metanogênicas e dos protozoários no rúmen (Watanabe et al., 2010), o que pode resultar na alteração do processo fermentativo e, conseqüentemente, dos produtos finais da fermentação.

Estudos prévios demonstraram que os óleos funcionais reduzem expressivamente a produção de amônia (NH₃) e aumentam as concentrações de propionato no rúmen (Watanabe et al., 2010; Wanapat et al., 2011; Paula et al., 2012; Shinkai et al., 2012;), situação que resulta em aumento na eficiência do metabolismo energético, aumento na eficiência de síntese microbiana e, conseqüentemente, com menor poluição ambiental.

Dentre os óleos funcionais, atenção especial tem sido dada ao líquido da casca da castanha de caju (LCC), óleo obtido a partir do processamento da castanha de caju (*Anacardium occidentale L*), considerado uma fonte natural de lipídios fenólicos, como o ácido anacárdico, o cardol e o cardanol, os quais apresentam comprovadas atividades antimicrobianas e antioxidantes (Kubo et al., 1993), o que tem incentivado os nutricionistas estudar o LCC como possível aditivo na dieta de ruminantes.

1.1. Caju

O cajueiro (*Anacardium occidentale L.*) pertence à família *Anacardiaceae*, e é uma árvore encontrada em extensa região da América Tropical, sendo seu cultivo originário no Brasil, encontrando-se bem estabelecido no litoral nordestino, destacando-se os estados de Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte, onde a cajucultura é uma atividade importante no contexto econômico e social (Leite et al., 2005; Guanziroli et al., 2009). O Cajueiro também está disseminado em diversos países de clima tropical como Índia, Moçambique, Tanzânia, e mais recentemente, Vietnã, Indonésia e Tailândia (Watanabe et al., 2010).

O Brasil é reconhecido mundialmente como um dos maiores produtores de castanha de caju, junto com países como Vietnã, Índia e Nigéria. Na safra do ano 2012, o Brasil produz 306.330 mil toneladas de castanha de caju, em uma área plantada de 770.691 mil hectares, destacando-se o Estado do Ceará como o principal produtor, cuja safra no mesmo período foi de 167.461 mil toneladas de caju, seguido pelo estado do Piauí, com produção de 66.133 mil toneladas, e Rio Grande do Norte, produzindo 54.808 mil toneladas (Conab, 2012).

O caju está formado por um pedúnculo floral hipertrofiado ou pseudofruto, geralmente confundido com o fruto por sua aparência exótica e forma piriforme. O pseudofruto apresenta grande valor nutricional, com altos teores de vitamina C, niacina

e ferro, sendo utilizados para a fabricação de sucos, vinhos, doces e compotas (Rodrigues et al., 2011).

O fruto propriamente dito é a castanha de caju formada por um epicarpo fina que corresponde com a camada externa macia de cor marrom escuro. No interior do epicarpo encontra-se o mesocarpo, uma estrutura esponjosa de forma alveolar, que contém um alto teor de um óleo viscoso, cáustico, de cor marrom escuro, considerado fonte natural de lipídeos fenólicos, conhecido como líquido da casca da castanha de caju (LCC) (Paiva et al., 2000, Mazzetto et al., 2009).

No interior da castanha, encontra-se a amêndoa, de formato rinóide (formato de rim), protegida por uma fina membrana (película) avermelhada, composta de dois cotilédones brancos e oleosos. A amêndoa é caracterizada por seu alto valor nutritivo, apresentando 250 g/kg de proteínas e carboidratos, 460 g/kg de lipídios, além de conter de nove a dez aminoácidos essenciais (arginina, lisina, triptofano, entre outros), bem como, 81 g/kg de fósforo e 42 g/kg cálcio (Andrade Neto, 2006, Pimentel et al., 2012). A castanha e o LCC correspondem cerca de 70% do peso total do fruto.

A amêndoa é extraída durante o beneficiamento da castanha e o LCC é obtido como subproduto deste processo. Tanto a amêndoa como o LCC assumem elevada importância econômica para o Brasil (Vieira et al., 2009). A amêndoa da castanha de caju constitui um importante produto de exportação, sendo 90% da produção destinada ao mercado internacional. Países como Estados Unidos, Holanda e Canadá importam 51, 14 e 8% da produção total de castanha de caju produzida no Brasil, sendo considerados os principais importadores deste produto (Andrade et al., 2011). Em 2012, foram exportados em total US\$ FOB 221.954.399, dos quais US\$ FOB 185.691.071 correspondem à exportação da amêndoa de caju, fresca, seca ou sem casca (Conab, 2012).

Já, o LCC apresenta alto teor de lipídios totais e a maior parte destes (82,1%) é constituída de ácidos graxos insaturados, sendo 98,6% dos ácidos graxos insaturados presentes, o ácido oléico e linoléico, ácidos graxos essenciais, que aportam alto valor nutricional (Lima & Gonçalves, 1998). As principais aplicações do LCC têm sido na fabricação de tintas, inseticidas, fungicidas, antioxidantes, cosméticos e fármacos (Andrade et al., 2011). Desde o ponto de vista médico, o interesse é centrado na vasta gama de atividades biológicas do LCC, devido aos componentes químicos que apresenta (ácido anacárdico, cardol e cardanol), podendo atuar como agente antimicrobiano (Kubo et al., 1993) antioxidante, (Kubo et al., 2006) e antitumoral

(Tocco et al., 2009). Em 2012, foram exportados em total US\$ FOB 34.263.565 do LCC produzido no Brasil (Conab, 2012).

1.2. Composição do líquido da casca de castanha de caju

Os principais constituintes do LCC são lipídeos fenólicos naturais, não-isoprênicos por terem acetato como precursor biossintético, o ácido anacárdico, cardol e cardanol (Figura 1). Estes compostos apresentam em sua estrutura grupos aromáticos e alifáticos e, portanto, exibem ambos os comportamentos, hidrofílico e lipofílico. Este comportamento anfipático confere aos componentes do LCC atravessar membranas plasmáticas, o que potencializa suas funções biológicas (Correia et al., 2006), por outro lado, os constituintes do LCC apresentam uma cadeia lateral acíclica, contendo até três insaturações a partir de C-8. Quanto maior o número de insaturações na cadeia lateral destes compostos, maior será a atividade antifúngica e antibacteriana (Himejima & Kubo, 1991). O comprimento de cadeia lateral com um número ímpar de átomos de carbono varia de C₁₅-C₂₉ (Correia et al., 2006).

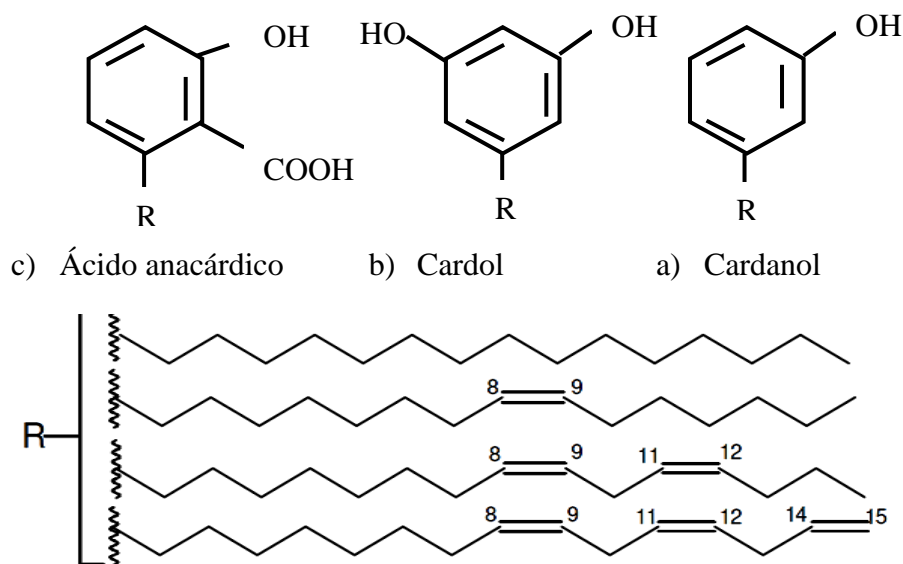


Figura 1. Principais constituintes do líquido da casca da castanha de caju. Adaptado de Oliveira et al. (2011).

A atividade antibacteriana do LCC contra bactérias Gram-positivas não é devida apenas a um componente, mas sim a ação de vários destes. A adição de uma hidroxila

(OH-) à molécula do cardanol transforma este componente em cardol, aumentando assim sua atividade antibacteriana. Por outro lado, a adição de um grupo carboxílico (COOH) ao cardanol produz o ácido anacárdico, representando ainda um aumento mais expressivo da atividade antimicrobiana (Himejia & Kubo, 1991).

Estes produtos naturais podem servir como fonte alternativa de compostos fenólicos da indústria petroquímica, principalmente na fabricação de lona de freio de automóveis, produção de calor, tintas, vernizes e esmaltes de isolamento para a indústria elétrica, entre outros.

1.3 Métodos para a obtenção do líquido da casca da castanha de caju

Diferentes processos podem ser empregados para a obtenção do LCC. Os mais importantes são a extração a frio (prensas), a extração por solvente e o processo térmico-mecânico, sendo os dois últimos, os processos mais empregados pela indústria (Mazzetto et al., 2009). Os principais componentes do LCC da extração a frio são o ácido anacárdico (60-65%), cardol (15-20%), cardanol (10%), e traços de metilcardol, sendo que o LCC obtido durante este processamento é chamado de LCC natural (Figura 2) (Kumar et al., 2002).

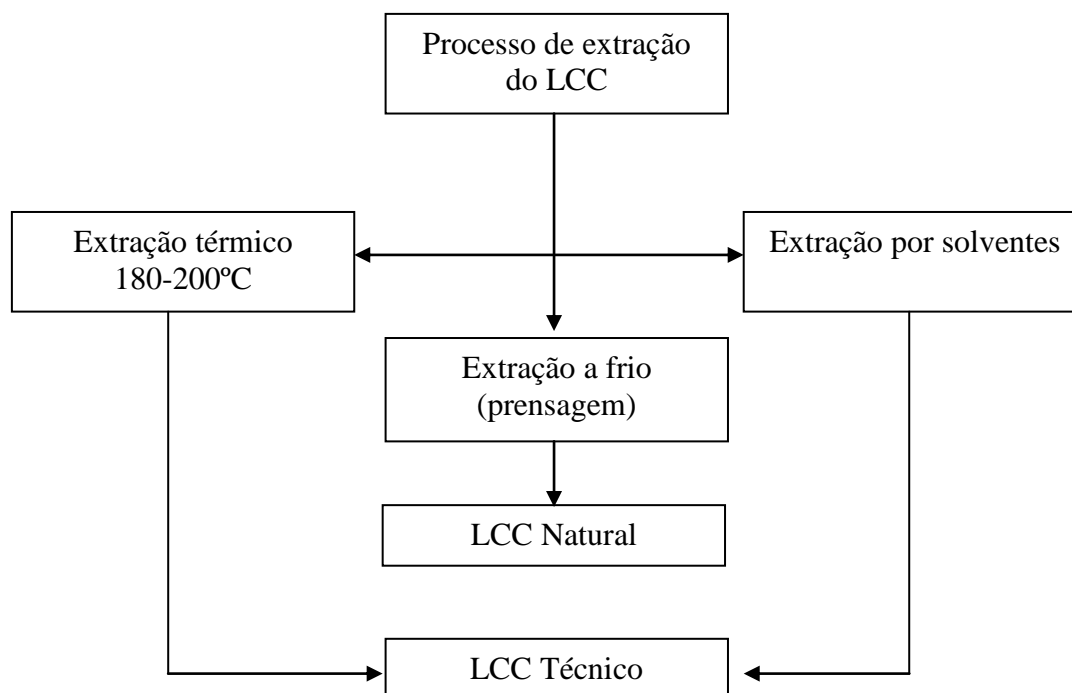


Figura 2. Principais métodos de extração do líquido da casca da castanha de caju. Adaptado de et al. (Sornprom, 2007).

Durante o processamento térmico-mecânico, a temperatura é elevada entre 180-200°C, e, nesta temperatura a casca externa se rompe e libera o LCC contido no mesocarpo, removendo a casca interna, permitindo a recuperação das amêndoas. Este procedimento apresenta rendimento de praticamente 100% (Mazzetto et al., 2009).

O aumento da temperatura durante o processamento térmico- mecânico altera as características químicas do LCC, uma vez que o grupo carboxila do ácido anacárdico é perdido totalmente, convertendo o ácido a cardanol, sendo este último 32 vezes menos ativo que o ácido anacárdico (Himejima & Kubo, 1991; Watanabe et al., 2010).

Desta forma, quando o ácido anacárdico é submetido a altas temperaturas, sofre descarboxilação, resultando em cardanol (Figura 3), produzindo o denominado LCC técnico (Mazzetto et al., 2009), o qual apresenta menor atividade antimicrobiana que o LCC natural, uma vez que o LCC técnico contém principalmente cardanol (60-65%) e cardol (15-20%), componentes menos potentes que o ácido anacárdico.

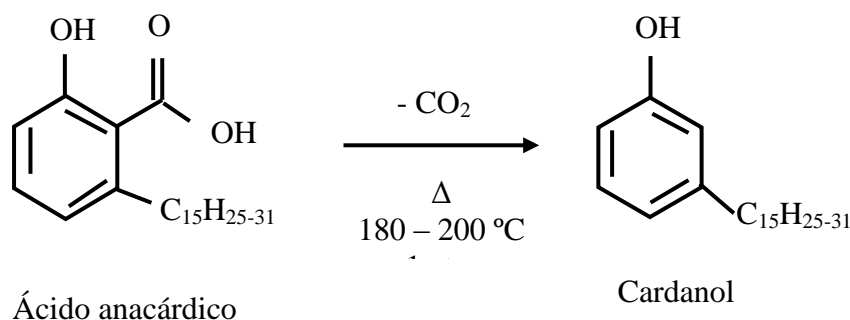


Figura 3. Processo de descarboxilação do ácido anacárdico.
Adaptado de Mazzetto et al. (2009).

1.4. Atividade antimicrobiana do líquido da casca da castanha de caju

O mecanismo bactericida do LCC ainda não foi totalmente esclarecido. No entanto, a ação antibacteriana parece estar relacionada ao caráter anfipático dos lipídios fenólicos. A interação dos grupos hidroxílicos do anel aromático com fosfolipídios por meio de ligações de hidrogênio é o fator responsável da alta afinidade do LCC às bicamadas lipídicas presentes nas membranas bacterianas (Kozubek, 1999). As cadeias alquílicas exercem influência significativa na atividade biológica que pode estar relacionada com o aumento da solubilidade das porções fenólicas nas regiões lipídicas. Uma vez incorporados às membranas celulares, os lipídios fenólicos danificam as proteínas da membrana, provocando aumento da permeabilidade da mesma e, a fuga

dos componentes citoplasmáticos, com consequente lise celular (Kubo et al., 1991; Lima et al., 2000; Burt et al., 2004).

Por outro lado, os compostos fenólicos podem inibir a síntese de piruvato nas células bacterianas ao inibir a enzima glicerol-3-fosfato-desidrogenase (Parasa et al., 2011), enzima que catalisa a oxidação do glicerol-3-fosfato em 1,3-bifosfoglicerato na via glicolítica para a formação do piruvato, o qual é necessário para a síntese de energia para o crescimento e manutenção das bactérias ruminais. O piruvato é o principal metabólito intermediário, resultante da metabolização de todos os carboidratos, em um processo que culmina com a formação dos produtos finais da fermentação ruminal (AGCC, CO₂ e metano) (Hobson & Sterwat, 1997).

Outra das atividades comprovadas do LCC encontra-se sua habilidade para quelar o ferro (Fe²⁺) e o cobre (Cu²⁺), reduzindo a biodisponibilidade destes minerais para as bactérias. Nas bactérias, o Fe²⁺ participa na formação de várias moléculas implicadas na respiração celular (citocromos), enquanto que Cu²⁺ participa do metabolismo energético e, atua como cofator de várias enzimas (citocromo, oxidase e a superóxido dismutase) (Tsujimoto et al., 2007).

1.5 Efeitos do líquido da casca da castanha de caju sobre a fermentação ruminal

Devido à presença de lipídios fenólicos com atividade antimicrobianos na composição do LCC, ácido anacárdico, cardanol e o cardol, podem provocar mudanças no ecossistema ruminal, característica que o torna um eficiente modificador da fermentação ruminal (Correia et al., 2006; Watanabe et al., 2010).

Himejima & Kubo (1991) e, mais recentemente Parasa et al. (2011), após avaliar a atividade antibacteriana do LCC *in vitro*, encontraram que as bactérias Gram-positivas (*Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* e *Propionibacterium acnes*) são bastantes suscetíveis aos componentes do LCC, enquanto que as Gram-negativas são resistentes. Da mesma maneira, Kubo et al.(1993) e Watanabe et al.(2010) encontraram que o LCC atua principalmente contra bactérias Gram-positivas presentes no rúmen como por exemplo, *Streptococcus bovis*, *Eubacterium ruminantium*, *Lactobacillus ruminis*.

A diminuição do número de bactérias Gram-positivas induzidas pelo LCC, pode indiretamente promover o crescimento de bactérias Gram-negativas (resistentes ao LCC), tais como *Succinivibrio dextrinosolvens*, *Selenomonas ruminantium* e *Megasphaera elsdenii*, envolvidas na produção de propionato (Watanabe et al., 2010), portanto, o LCC ao induzir mudanças nas espécies bacterianas do rúmen melhora a eficiência da fermentação ruminal, o que significa na prática, aumentar a produção de propionato e deprimir a metanogênese (Watanabe et al., 2010).

Nesse sentido, McGinn et al. (2004) encontraram redução de 22% nas emissões de metano em novilhas que receberam óleos funcionais, enquanto que animais que receberam monensina não minimizaram estas emissões. Watanabe et al. (2010) obtiveram redução de 70% na metanogênese ao adicionarem 200 µg/ml do LCC em experimento realizado *in vitro*, enquanto que Shinkai et al. (2012) encontraram redução de 38% na produção de metano em vacas alimentadas com feno e concentrado em razão 60:40 utilizando 4 g de LCC /100 kg de peso corporal como aditivo.

Animais alimentados com LCC reduzem as concentrações de metano ruminal, não só pelo fato do LCC inibir o crescimento das bactérias metanogênicas, mas também por favorecer o aumento na concentração de propionato. Este AGCC concorre com o metano pelo uso do hidrogênio no rúmen (Moss et al., 2000), portanto, uma maior síntese de propionato reduziria a disponibilidade do hidrogênio para a síntese de metano.

Anteriormente, a redução da produção de metano era atribuída apenas aos ionóforos, ao serem utilizados como aditivo alimentar (Odongo et al., 2007). Contudo, Shinkai et al. (2012) afirmaram que o LCC é excelente aditivo que pode reduzir a metanogênese na mesma magnitude ou em quantidades superiores aos ionóforos.

Por outro lado, a manutenção de concentração adequada de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) no rúmen é indispensável para garantir o crescimento bacteriano, sendo que de 40 a 100% do nitrogênio exigido pelos microrganismos pode ser derivado do N-NH₃ (Stern & Hoover, 1979). No entanto, o aumento da concentração ruminal de N-NH₃ é indicativo de perdas protéicas e econômicas para o produtor.

A redução na síntese de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) foi observada em ruminantes alimentados com LCC (Kobayashi, 2010; Watanabe et al., 2010). Este efeito pode ser devido a que os componentes ativos do LCC podem inibir o crescimento de bactérias proteolíticas, bem como, reduzir a capacidade de adesão e colonização destas bactérias aos seus substratos (Watanabe et al., 2010).

A proliferação seletiva, de bactérias tais como bactérias de *S. dextrinosolvens*, *A. lipolytica*, e *M. elsdenii*, caracterizadas por utilizar amônia como fontes energéticas favorecem a redução significativa do N-NH₃ com a suplementação de LCC. Esta redução sugere que o N-NN₃ foi utilizado como substrato para a síntese de proteína microbiana, diminuindo a excreção de nitrogênio e o gasto energético para síntese e excreção de uréia (Sniffen et al., 1992). No entanto, este efeito precisa ser avaliado experimentalmente mensurando a concentração de amônia ruminal.

A atividade microbiana ruminal e suas funções no processo digestivo podem ser modificadas pelo pH ruminal. O pH é um fator químico que influencia o crescimento microbiano e pode ser afetado pelas características da dieta e fatores, como o consumo diário, a concentração energética da dieta e o manejo alimentar (Tibo et al., 2000).

Dietas ricas em carboidratos solúveis estão associadas à maior produção de AGCC e, conseqüentemente, valores baixos de pH. A redução do pH exerce uma ação seletiva sobre as bactérias, principalmente as bactérias celulolíticas, microorganismos que são inibidos em ambiente ruminal ácido, comprometendo-se assim, a digestibilidade do FDN (Cabral et al., 2008). O uso de aditivos alimentares é uma alternativa utilizada no setor para manter condições ruminais ótimas, situação que melhora a digestibilidade dos nutrientes (Valadares Filho & Santos Pina, 2011; Kozloski, 2011). Tem-sido comprovado que a atividade antimicrobiana do LCC contra as bactérias Gram-positivas pode promover o crescimento de microrganismos Gram-negativos, tais como *Selenomonas ruminantium* e *Megasphaera elsdenii* (Watanabe et al., 2010), principais bactérias utilizadoras do lactato como substrato energético (Kozloski, 2011), o que pode contribuir com a regulação do pH ruminal.

Embora alguns efeitos benéficos do LCC sobre o metabolismo ruminal têm sido estudados, os resultados ainda são contraditórios e não existem trabalhos suficientes para confirmar esses efeitos. Por tal motivo, existe a necessidade de estudar a utilização do LCC como aditivo alimentar em dietas para ruminantes, assim poderia ser adotado na pecuária como opção que melhore a produtividade e cause menores riscos à saúde humana e menor poluição ambiental.

1.6. Referências bibliográficas

- ANDRADE NETO, J.C. **Competitividade na pequena produção agroindustrial: Estudo da agroindústria castanha de caju**. 2006, 78p. Dissertação (Mestrado em Engenharia da produção). Universidade do rio Grande do Norte, Natal.
- ANDRADE, T.J.A.; ARAUJO, B. Q.; CITÓ, A.M.G.L. et al. Antioxidant properties and chemical composition of technical Cashew Nut Shell Liquid (tCNSL). **Food Chemistry**, v.126, p.1044–1048, 2011.
- BARTON, M.D. Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. **Nutrition Research Reviews**, v. 13, p. 279-299, 2000.
- BENCHAAR, C.; GREATHEAD, H. Essential oils and opportunities to mitigate enteric methane emissions from ruminants. **Animal Feed Science and Technology**, v.166-167, p.338-355, 2011.
- BERNDT, A.; VALINOTE A.C. TAKAHASHI, F.H. et al. Aditivos e óleos vegetais para melhorar o desempenho e as características das carcaças de bovinos de corte. **Pesquisa & Tecnologia, apta regional**, v.4, 2007.
- BRODERICK, G.A.; WALLACE, R.J.; ORSKOV, E.R. Control of rate and extent of protein degradation. In: TSUDA, T.; SASAKE, Y.; KAWASHIMA. (Eds.) **Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants**. San Diego: Academic Press, 1991. 541p.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, p.223–253, 2004.
- CABRAL, L.S.; VALADARES FILHO, S.C.; DETMANN, E.J. et al. Eficiência microbiana e parâmetros ruminais em bovinos alimentados com dietas à base de volumosos tropicais. **Revista Brasileira da Zootecnia**, v.37, p.919-925, 2008.
- CONAB. [2012]. **Castanha de caju, período de 1-31 de Julho de 2012**. Available at:http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_08_10_14_52_23_castanha_de_caju_julho_2012.pdf.
- CORREIA, S. J.; DAVID, J. P.; DAVID, J M. Metabólitos secundários de espécies de anacardiaceae. **Química Nova**, v.29, p.1287-1300, 2006.
- CHURCH, H. **Fisiología digestiva y nutrición de los rumiantes**. Fisiología digestiva. Zaragoza: Acribia, 1988, v.1, 379p.
- GUANZIROLI, C.E.; SOUZA, H.M.; VALENTE JÚNIOR, A. et al. Entraves ao desenvolvimento da cajucultura no nordeste: margens de comercialização ou aumentos de produtividade e de escala. **Revista Extensão Rural**, v.18, p.96-122, 2009.
- HESS, B.W.; MOSS, G.E.; HULE, D.C. A decade of developments in the area of fat supplementation research with beef cattle and sheep. **Journal of Animal Science**, v.86, p.188-204, 2008.
- HIMEJIMA, M.; KUBO I. Antibacterial Agents from the Cashew *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae) Nut Shell Oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.39, p.418-421, 1991.
- HOBSON, P.N.; STEWART, C.S. **The rumen microbial ecosystem**. 2.ed. London: Blackie Academic & Professional. 1997, 719p.
- KOBAYASHI, Y., NAGASHIMA, K.; MOCHIZUKI, M. **Rumen fermentation improving agent**, 2010.
- KOZLOSKI, G.V. **Bioquímica dos ruminantes**. 3 ed. Santa María: UFSM. 2011. 212p.
- KUBO, I.; HIMEJIMA, M. Anethole, a synergist of polygodial against filamentous microorganisms. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v.39, p.2290-2292, 1991.

- KUBO, I.; MUROI, H.; HIMEJIMA M. Structure-antibacterial activity relationships of anacardic acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.41, p.1016-1019, 1993.
- KUBO I.; MASUOKA N.; JOUNG HA T. et al. Antioxidant activity of anacardic acids. **Food Chemistry**, v.99, p.555–562, 2006.
- KUMAR, P.P.; PARAMASHIVAPPA, R.; VITHAYATHIL, P.J. et al. Process for Isolation of cardanol from technical cashew (*Anacardium occidentale L.*) nut shell liquid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.4705–4708, 2002.
- KOZUBEK, A. Resorcinolic lipids, the natural non-isoprenoid phenolic amphiphiles and their biological activity. **Chemical Reviews**, v.99, p.1-25, 1999.
- LEITE, E. R.; BARROS, N. B.; BOMFIM, M. et al. Terminação de ovinos alimentados com farelo do pedúnculo do caju e feno de leucena. Sobral: Embrapa Caprinos, 2005. 4f. (Embrapa Caprinos. Comunicado Técnico, 61). Available at: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPC/20237/1/cot61.pdf> Biblioteca(s): Embrapa Caprinos e Ovinos.
- LIMA, C.A.A.; PASTORE, G.M.; LIMA, E. D. P. Estudo da atividade antimicrobiana dos ácidos anacárdicos do óleo da casca da castanha de caju (CNSL) dos clones de cajueiro-anão-precoce ccp-76 e ccp-09 em cinco estágios de maturação sobre microrganismos da cavidade bucal. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.20, p.358-362, 2000.
- LIMA, J.R.; GONÇALVES, L.A.G. Caracterização da fração lipídica de amêndoas de castanha de caju fritas e salgadas. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v.16, p.131-138, 1998.
- MAIA, F.J.; BRANCO, A.F.; MOURO, G. F. et al. Inclusão de fontes de óleo na dieta de cabras em lactação: digestibilidade dos nutrientes e parâmetros ruminais e sanguíneos. **Revista Brasileira da Zootecnia**, v.35, p. 1496-1503, 2006.
- MAZZETTO, S. E.; LOMONACO, D.; MELE, G. Óleo da castanha de caju: oportunidades e desafios no contexto do desenvolvimento e sustentabilidade industrial. **Química Nova**, v. 32, p. 732-741, 2009.
- McGINN, S.N.; BEAUCHEMIN, K.A.; COATES, T. et al. Methane emissions from beef cattle: effects of monensin, sunflower oil, enzymes, yeast, and fumaric acid. **Journal of Animal Science**, v.82, p.3346-3356, 2004.
- MORAIS, J.A.D.S.; BERCHIELLI, T.T.; REIS, R.A. Aditivos In: **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal. 2.ed. Jaboticabal: Funep, 2011, 565-591p.
- MOSS, A.R. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. **Annales De Zootechnie**, v.49, p.231–253, 2000.
- ODONGO, N.E.; BAGG, R.; VESSIE, G. Long-term effects of feeding monensin on methane production in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.90, p.1781-1788, 2007.
- OLIVEIRA, M. S. C.; MORAIS, S. M.; MAGALHÃES, D. V. Antioxidant, larvicidal and antiacetylcholinesterase activities of cashew nut shell liquid constituents. **Acta Tropica**, v.117, p.165–170, 2011.
- OWENS, F.N.; GOETSCH, Fermentación Ruminal. In: Church, D.C. **El rumiante: fisiología digestiva y nutrición**. 1993. p.159-190.
- PAIVA, F.F.A.; GARRUTTI, D.S.; SILVA NETO, R.M. **Aproveitamento Industrial do Caju**. EMBRAPA/SEBRAE-CE, p.83, 2000.
- PARASA, L.S.; SUNITA T.; RAO K B.; et al. Acetone extract of Cashew (*Anacardium occidentale, L.*) nuts shelliquid against Methicillin resistant Staphylococcus aureus(MRSA) by minimum inhibitory concentration (MIC). **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v.3, p.736-742, 2011.

- PAULA, E.F.E.; MAIA, F. P.; CHEN, R.F.F. Óleos vegetais na nutrição de ruminantes. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.9, p.2075–2103, 2012.
- PIMENTEL, P.G.; REIS R.B.; LEITE, L.A. et al. Parâmetros da fermentação ruminal e concentração de derivados de purina de vacas em lactação alimentadas com castanha de caju. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.64, p.959-966, 2012.
- RODRIGUES, M.R.C.; RONDINA, D.; ARAÚJO, A.A. Respostas reprodutivas e metabólicas de ovelhas alimentadas com bagaço de caju desidratado, durante o pós-parto. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, p.171-179, 2011.
- SORNPROM, N. **Extraction and purification of anacardic acid from cashew nut shell**. 2007. 69f. Dissertação (Mestre em Engenharia Química). Kasetsart University.
- SHINKAI, T.; ENISHI, O.; MITSUMORI, M. et al. Mitigation of methane production from cattle by feeding cashew nut shell liquid. **Journal of Dairy Science**, v. 95 p 5308–531, 2012.
- SNIFFEN, C.J.; O'CONNOR, J.D.; VAN SOEST, P.J; et al. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**, v.70, n.10, p.3562-3577, 1992.
- STASIUK, M.; KOZUBEK, A. Biological activity of phenolic lipids. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.67, p.841-60, 2010.
- STERN, M.D.; HOOVER, W.H. Methods for determining and factors affecting rumen microbial protein synthesis: a review. **Journal of Dairy Science**, v.49, p. 1590-1603, 1979.
- TIBO, G.C.; VALADARES FILHO, S.C.; VALADARES, R.F.D. et al. Níveis de concentrado em dieta de novilhos mestiços F1 Simental x Nelore: consumo e digestibilidades. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, p.910-920, 2000.
- TOCCO, G.; FAIS, A.; MELI, G. et al. PEG-immobilization of cardol and soluble polymer-supported synthesis of some cardol–coumarin derivatives: preliminary evaluation of their inhibitory activity on mushroom tyrosinase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, p.36–39, 2009.
- TSUJIMOTO, K.; HAYASHI, A.; JOUNG HA J. et al. Anacardic Acids and Ferric Ion Chelation. **Journal of Biosciences**, v.62, p. 710-6, 2007.
- VALADARES FILHO, S.D.C; PINA, D.S. **Fermentação ruminal**. Jaboticabal. 2.ed. Jaboticabal: Funep, 2011, 565-591p.
- VASCONCELOS, V.R.; BARROS, N. N.; CARVALHO, F.R.F. et al. Nutrição de cabras leiteiras. In: CONGRESSO NORDESTINO DE PRODUÇÃO ANIMAL, 1. 1998, Fortaleza. **Anais ...** Fortaleza, 1998. p.181-193.
- VIEIRA, L.M.; SOUSA M.S.; LIMA A. Fenólicos totais e capacidade antioxidante *in vitro* de polpa de caju (*Anacardium occidentale*). In IVCONNEPI, CONGRESSO DE PESQUISA E INOVAÇÃO DA REDE NORTE E NORDESTE DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA, 2009, Belém. **Anais...** Instituição Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Piauí (IFPI), Belém, PA, 2009.
- WANAPAT, M.; MAPATO, C.; PILAJUN, R. et al. Effects of vegetable oil supplementation on feed intake, rumen fermentation, growth performance, and carcass characteristic of growing swamp buffaloes. **Livestock Science**, v.135, p.32–37, 2011.
- WATANABE, Y.; SUZUKI, R.; KOIKE, S. et al. In vitro evaluation of cashew nut shell liquid as a methane-inhibiting and propionate-enhancing agent for ruminants. **Journal of Dairy Science**, v.93, p.5258–5267, 2010.

II. OBJETIVOS GERAIS

Este trabalho foi conduzido com o objetivo de determinar o efeito de níveis crescentes de líquido da casca da castanha de caju (LCC) em dietas para ruminantes sobre a digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS), a cinética da produção cumulativa de gases, e parâmetros da fermentação ruminal, concentração de N-amoniacoal ($N-NH_3$) e pH *in vitro*.

2.1. Objetivos específicos

1. Determinar os parâmetros da cinética da fermentação ruminal *in vitro*.
2. Determinar o nível de inclusão ideal do LCC para obtenção de maiores benefícios sobre a DIVMS.
3. Estabelecer correlações entre a produção total de gás e o desaparecimento da matéria seca do substrato incubado.
4. Avaliar o efeito de dietas com níveis crescentes de concentrado (0, 200, 400, 600, 800 e 1000 g de concentrado/kg de MS) e de LCC (0; 0,3; 0,6 e 1,2 g LCC/kg MS) sobre os parâmetros da fermentação, concentração de N-amoniacoal e pH.

III. Digestibilidade, cinética e parâmetros de fermentação ruminal *in vitro* de dietas para ruminantes com inclusão de líquido da casca da castanha de caju

RESUMO – Objetivou-se com o presente trabalho avaliar o efeito do líquido da casca da castanha de caju em dietas para ruminantes com níveis crescentes de concentrado, sobre os parâmetros da digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS), a cinética da produção cumulativa de gases, e parâmetros da fermentação ruminal (N-NH₃ e pH do líquido ruminal). O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 5x4+1, com cinco níveis de concentrado (200, 400, 600, 800 e 1.000 g/kg MS) e quatro níveis de LCC (0; 0,3; 0,6 e 1,2 g LCC/kg MS) e uma dieta controle composta apenas por silagem, totalizando 21 tratamentos. Foi observada interação ($P \leq 0,01$) entre os níveis de LCC e de concentrado sobre a DIVMS, fração de rápida degradação (fração A), *lag time* e a produção total de gás. A inclusão de concentrado aumentou linearmente ($P \leq 0,05$) a DIVMS, enquanto que os níveis de LCC resultaram em efeito quadrático ($P \leq 0,001$) sobre esta variável, sendo estimada a máxima DIVMS no nível de 0,5 g LCC/kg MS. A produção total de gás, o desaparecimento do substrato, a fração de lenta degradação (fração D) e sua respectiva taxa de degradação (fração E) aumentaram linearmente ($P \leq 0,01$) conforme aumentaram os níveis de concentrado na dieta. Os níveis de concentrado resultaram em aumento linear ($P < 0,001$) das concentrações de N-NH₃ e reduziram ($P < 0,001$) o pH no líquido ruminal. Os níveis de LCC diminuíram a concentração de N-NH₃ ($p < 0,001$) e aumentaram o pH do líquido ruminal ($p < 0,001$). A inclusão de 0,5 g LCC/kg MS de dietas para ruminantes melhora a DIVMS, sem os parâmetros cinéticos da fermentação ruminal. A adição de LCC em dietas para ruminantes reduz a produção de amônia, e evitou reduções drásticas do pH ruminal, resultados que favorecem o melhor aproveitamento dos nutrientes da dieta.

Palavras chave: ácido anacárdico, amônia, cardanol, cardol, concentrado, produção de gás

III. Digestibility, kinetic and parameters of rumen *in vitro* fermentation for ruminants diets containing levels of cashew nutshell liquid

ABSTRACT- The objective of this study was to evaluate the effect of cashew nutshell liquid (CNSL) in ruminants diets containing increasing levels of concentrate on *in vitro* dry matter digestibility (IVDMD), cumulative gas production kinetic and parameters of rumen fermentation, ammonia-N (NH₃-N) and pH. The experimental design was completely randomized in a factorial arrangement 5x4+ 1, with five levels of concentrate (200; 400; 600; 800 and 1000 g/kg) and four levels of CNSL (0; 0.3; 0.6 and 1.2 g/kg) and a control diet composed only by roughage, totalizing 21 treatments. Corn silage was used as forage and ground corn, soybean meal, urea and mineral supplement as concentrated ingredients. An interaction was observed ($P \leq 0.01$) between the levels of CNSL and the concentrate on the IVDMD, rapid degradation fraction (fraction A), *lag time* and total gas production. The inclusion of concentrate increased the ($P \leq 0.05$) IVDMD linearly, while levels of CNSL resulted in a quadratic effect ($P \leq 0.001$) on this variable, being estimated the point of maximum IVDMD at the inclusion of 5 g of CNSL /kg of concentrate. The total gas production, the fraction of slow degradation (fraction D) and accompanying degradation rate (fraction E) increased linearly ($P \leq 0.01$) when levels of concentrate increased. Levels of CNSL did not influence ($P > 0.05$) the parameters of gas production when analyzed simultaneously in all diets with the inclusion of concentrate. The levels of concentrate resulted in a linear increase ($P < 0.001$) concentrations of NH₃-N and reduced ($P < 0.001$) in ruminal pH. CNSL levels decreased the concentration of NH₃-N and increased ruminal pH. There was a high correlation between the total gas production and disappearance of the substrate ($r = 0.94$), indicating that the production of gas may be a precise technique for estimating the curve of digestibility of foods. The inclusion of 0.5 g CNSL /kg in high concentrate diets improves IVDMD, reduces the production of ammonia, and avoids drastic reductions in ruminal pH resulting from the addition of concentrated ingredients. These results improve the utilization of nutrients.

Key-words: Anacardic acid, ammonia, cardanol, cardol, concentrate, gas production

Introdução

Os índices de produtividade animal são influenciados principalmente pela quantidade de nutrientes fornecidos na dieta e, em particular, pela quantidade de energia disponível para produção. Nesse sentido, a inclusão de alimentos concentrados na dieta de ruminantes permite oferecer níveis de energia e proteína que atendem as exigências energéticas dos microrganismos ruminais e do animal, situação que permite maximizar o desempenho dos ruminantes. Contudo, o excesso de carboidratos não estruturais nessas dietas produz queda do pH do rúmen, influenciando negativamente a digestibilidade e o aproveitamento dos nutrientes da dieta (Costa et al., 2008).

A maximização do desempenho animal também pode ser alcançada com a utilização de aditivos alimentares (Van Nevel & Demeyer, 1988; Broudiscou et al., 2000). Os aditivos na dieta dos ruminantes induzem alterações no metabolismo ruminal, bem como, no perfil dos produtos finais de fermentação, visto que, favorecem o aumento das concentrações de propionato, e reduzem a síntese de acetato e metano no rúmen, ao inibir seletivamente o crescimento das bactérias Gram-positivas e aumentar o crescimento das Gram-negativas (Santos & Pedroso, 2011). Recentemente, atenção especial tem sido dada aos óleos funcionais, extraídos de plantas, por serem capazes de produzir alterações na atividade metabólica das bactérias, principalmente Gram-positivas, podendo modificar o ecossistema microbiano ruminal e, conseqüentemente, a eficiência produtiva dos animais.

O líquido da casca da castanha de caju (LCC) é um óleo funcional considerado fonte natural de lipídios fenólicos (ácido anacárdico, cardol e cardanol), caracterizados por apresentarem em sua estrutura química um anel aromático com grupos hidroxila e, uma cadeia lateral larga e insaturada (Mazzetto et al., 2009). Esta composição confere comprovadas atividades como antimicrobianas, antifúngicas e antioxidantes (Mazzetto et al., 2009; Kubo et al., 1993).

Em ruminantes, o LCC tem sido pouco estudado como aditivo modulador da fermentação ruminal. Alguns trabalhos desenvolvidos *in vitro* demonstraram os efeitos do LCC como modificador da fermentação ruminal, concluindo que pode ser utilizado como aditivo alimentar, uma vez que reduz a produção de metano e N-amoniacal, melhorando utilização da energia e proteína dos alimentos (Kobayashi et al., 2010; Watanabe et al. 2010; Shinkai et al., 2012).

Embora haja relatos sobre os efeitos do LCC na dieta de ruminantes, o mesmo tem sido pouco estudado e, mais pesquisas são necessárias a fim de validar a eficácia do LCC como modificador do ecossistema microbiano do rúmen.

Deste modo, objetivou-se com o presente trabalho determinar o efeito de níveis crescentes de líquido da casca da castanha de caju (LCC) em dietas para ruminantes sobre a digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS), a cinética da produção cumulativa de gases, parâmetros da fermentação ruminal, concentração de N- amoniacal (N-NH₃) e pH *in vitro*.

Material e métodos

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Análises de Alimentos e Nutrição Animal (LANA) e na Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI), ambas pertencentes ao Departamento de Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá, durante o período de fevereiro a agosto de 2012.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 5x4 +1, com cinco níveis de concentrado (200, 400, 600, 800 e 1000 g/kg de MS), quatro níveis de inclusão do líquido da casca da castanha de caju (0; 0,3; 0,6 e 1,2 g de LCC/kg de MS) e uma dieta controle composta apenas por silagem, totalizando 21 tratamentos. Utilizou-se silagem de milho como volumoso e, milho moído, farelo de soja, uréia e suplemento mineral como ingredientes concentrados (Tabela 1 e 2). O LCC foi fornecido com base na matéria seca da dieta e, adicionado ao concentrado.

Tabela 1. Composição bromatológica dos alimentos utilizados nas dietas experimentais (g/kg de matéria seca)

| Alimentos | MS | PB | EE | MM | FDNcp | FDA |
|------------------|-------|---------|------|------|-------|-------|
| Silagem de milho | 348,0 | 66,0 | 23,0 | 16,0 | 480,0 | 292,0 |
| Milho | 880,0 | 83,0 | 36,0 | 44,0 | 110,0 | 49,0 |
| Farelo de Soja | 900,0 | 508,0 | 27,0 | 71,0 | 149,0 | 119,0 |
| Ureia | - | 2.820,0 | - | - | - | - |

As amostras dos alimentos foram secadas em estufa de circulação forçada de ar a 55°C durante 72 horas. Posteriormente, todos os alimentos foram processados em moinho tipo Wiley utilizando peneira com crivos de 1 mm e analisadas quanto aos teores de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), o extrato etéreo (EE) e cinzas (AOAC, 1990). Os componentes da parede celular, fibra em detergente neutro corrigido para cinzas e proteína (FDNcp), fibra em detergente ácido

(FDA) e lignina, foram determinados pelo método de Van Soest et al. (1991). O nitrogênio insolúvel em detergente neutro (NIDN) e o nitrogênio insolúvel em detergente ácido (NIDA) foram realizados segundo a metodologia descrita por Licitra et al. (1996). Os valores de PIDA e PIDN serão calculados multiplicando-se os valores de NIDA e NIDN por 6,25.

Tabela 2. Composição das dietas experimentais (g/kg de MS)

| Alimentos | Tratamentos | | | | | |
|---------------------------------|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 0 | 200 | 400 | 600 | 800 | 1.000 |
| Silagem de milho | 1.000,0 | 800,0 | 600,0 | 400,0 | 200,0 | 0,0 |
| Milho | 0,0 | 182,0 | 366,0 | 549,0 | 730,0 | 914,0 |
| Farelo de soja | 0,0 | 9,0 | 17,0 | 26,0 | 35,0 | 43,0 |
| Ureia | 0,0 | 4,0 | 7,0 | 10,0 | 14,0 | 17,0 |
| Suplemento mineral ¹ | 0,0 | 5,0 | 10,0 | 15,0 | 21,0 | 26,0 |
| PB | 66,0 | 82,0 | 98,0 | 113,0 | 129,0 | 145,0 |
| EE | 23,0 | 25,0 | 27,0 | 29,0 | 32,0 | 38,0 |
| FDNcp | 496,0 | 431,0 | 350,0 | 269,0 | 188,0 | 107,0 |
| CNF | 415,0 | 470,0 | 534,0 | 578,0 | 632,0 | 687,0 |
| NDT ² | 624,0 | 650,0 | 675,0 | 700,0 | 726,0 | 752,0 |

¹Suplemento mineral: 551,2g/kg Carbonato de Cálcio, 258,4 g/kg Caulim, 24,7 g/kg Flor de Enxofre, 157,8 g/kg Sal comum, 5,9 mg/kg Iodato de Cálcio, 2 mg/kg Selenito de Sódio, 11 mg/kg Sulfato de Cobalto, 260 mg/kg Sulfato de Cobre, 240 mg/kg Sulfato de Manganês, 228 mg/kg Sulfato de Zinco

²Calculado segundo o NRC (2001).

Os carboidratos não fibrosos foram calculados pela seguinte equação (Sniffen et al., 1992):

$$\text{CNF} = 100 - (\% \text{FDN} + \% \text{PB} + \% \text{EE} + \% \text{CINZAS})$$

Os teores de nutrientes digestíveis totais (NDT) foram calculados a partir da equação (NRC, 2001):

$$\text{NDT} = \text{CNFD} + \text{PBD} + (2,25 \times \text{EED}) + \text{FDNnD} - 7$$

Onde, CNFD são os carboidratos não fibrosos digestíveis; PBD, a proteína bruta digestível; EED, extrato etéreo digestível; FDNnD fibra em detergente neutro corrigida para nitrogênio digestível e o valor 7 refere-se ao NDT fecal metabólico.

Os valores anteriores foram estimados conforme o NRC (2001) assim:

$\text{CNFD} = 0,98 (100 - [(\text{FDN} - \text{PDIN}) + \text{PB} + \text{EE} + \text{Cinzas}] \times \text{FAP})$; em que FAP = fator de ajuste para processamento físico: 1 para o milho moído, 1,04 para Farelo de cereais e 0,94 para a silagem de milho;

PBD (Volumoso) = $PB \times \text{Exp}^{-1,2 \times \left(\frac{PIDA}{PB}\right)}$; em que PIDA= proteína insolúvel em detergente ácido;

PBD (Concentrado) = $PB \times \left[1 - \left(0,4 \times \frac{PIDA}{PB} \right) \right]$;

EED = $(EE - 1) \times 100$;

FDNnD = $0,75 \left[(FDN-PDIN) - L \right] \times \left[1 - \left(\frac{L}{FDN-PDIN} \right) 0,667 \right]$; em que L= Lignina.

Os coeficientes digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS), N-amoniaco (N-NH₃) e pH do líquido ruminal, produção cumulativa de gases e parâmetros cinéticos da fermentação ruminal foram determinados utilizando o inócuo ruminal e a solução tampão.

O inócuo ruminal era proveniente de dois bovinos da raça Holandesa, adultos, castrados, com peso corporal médio de 380 kg, e providos de cânula ruminal. Os animais receberam uma dieta composta por 70% de volumoso (silagem de milho) e 30% de concentrado (milho, farelo de soja e suplemento mineral). Os animais foram alimentados duas vezes ao dia, às 8 horas e às 16 horas.

A coleta de líquido ruminal foi realizada no período da manhã antes da primeira refeição via cânula ruminal, utilizando uma bomba a vácuo e um kitassato com capacidade de 2000 mL. O líquido ruminal foi mantido em banho-maria a 39°C e o recipiente purgado com CO₂ antes e após a coleta. Foram coletados 4 litros de líquido ruminal, sendo dois litros/animal misturados e incluindo uma fração sólida do conteúdo ruminal. O material coletado foi transferido para uma garrafa térmica pré-aquecida previamente purgada com CO₂ e fechada hermeticamente. Todo o material coletado foi homogeneizado durante 10 segundos utilizando um liquidificador. Posteriormente, o material foi filtrado em quatro camadas de tecido de algodão (gaze) e utilizado nas incubações.

A solução tampão era preparada com os seguintes reagentes: A solução A (g/litro) composta por: 10,0 g KH₂P0₄; 0,5 g MgSO₄7H₂O; 0,5 g NaCl; 0,1 g CaCl₂2H₂O; 0,5 g ureia, e a solução B (g/100mL): 15,0 g Na₂CO₃; 1,0 g Na₂S.9H₂O. As soluções foram misturadas na relação 1:5 atingindo o pH de 6,8 na temperatura constante de 39°C.

A DIVMS das dietas foi determinada de acordo com metodologia descrita por Tilley & Terry (1963) modificada por Holden et al. (1999), utilizando o rúmen artificial (Daisy^{II} Fermenter®, Ankom).

Foram pesados 0,5 gramas de amostra em saquinhos de TNT -100 g/m, cortados e selados a um tamanho de 5,0 x 5,0 cm, conforme Casali et al. (2008). Foram utilizados dois saquinhos sem amostra (brancos) em cada jarro para correção dos dados. Os saquinhos com amostra foram colocados nos jarros, distribuídas equitativamente 26 saquinhos/jarro (24 saquinhos com amostra e dois saquinhos sem amostra ou brancos), totalizando 104 saquinhos. Em seguida, eram adicionados 1600 mL da solução tampão e 400 mL do inócuo ruminal e, acrescentado CO₂ para manter as condições anaeróbias. Após este procedimento, os jarros permaneceram no rúmen artificial Daisy^{II} Fermenter® (Ankom) a 39°C durante 48 horas com agitação contínua.

A incubação foi interrompida após das 48 horas, iniciando o segundo estágio do método da digestibilidade *in vitro*, quando foram adicionados de 40 mL de ácido clorídrico (HCl) 6 N e 8 gramas de pepsina (Sigma 1:10000) em cada jarro. A pepsina foi previamente dissolvida em 34 mL de água destilada a 35°C durante 5 minutos, procurando manter o pH da solução entre 2,0 a 3,5 (Holden, 1999). A incubação foi mantida por mais 24 horas a 39°C sob agitação contínua.

Após 24 horas de incubação, os jarros foram drenados e lavados com água da torneira entre 5 a 6 vezes até a água sair limpa. Em seguida os saquinhos foram pré-secos em estufas de circulação forçada de ar a 55°C por 12 horas e posteriormente levados a estufa de 105°C durante 24 horas, e em seguida foram pesados.

A DIVMS foi calculada utilizando o resíduo após a incubação, através da fórmula:

$$\text{DIVMS} = \left[\frac{100 - (W3 - (W1 \times W4))}{W2} \right] \times 100$$

Em que, W1 é o peso da tara do filtro; W2 é o peso da amostra; W3 é o peso final do filtro e W4 é a correção com filtro em branco.

Para a determinação da produção total de gás e os parâmetros da cinética da fermentação ruminal, foi utilizada a técnica automática *in vitro*. Foram utilizados oito frascos de vidro, com capacidade de 250 mL, onde foram adicionados 0,500 gramas de amostra das dietas em duplicata, 100 mL da solução tampão, 25 mL de inócuo ruminal e CO₂. Para cada incubação realizada, foram utilizados dois frascos como brancos, contendo apenas inócuo ruminal e solução tampão, com o objetivo de ajustar os valores de pressão.

O aumento da pressão produzido dentro dos frascos durante a incubação foi mensurado em libras por polegada quadrada (psi) utilizando sistema automático RF: Gás Production System® (ANKOM). A pressão de gás dentro dos frascos foi registrada por sensores de pressão localizados nas tampas dos frascos ou módulos, os quais transferiram as informações de cada frasco por meio de uma base coordenadora conectada a um computador, a intervalos de 5 minutos, totalizando 576 leituras durante 48 horas de incubação.

Para a obtenção do resíduo ao final das 48 horas de fermentação, transferiam-se os conteúdos dos frascos em cadinhos filtrantes de porosidade nº 1 para secagem na estufa a 105°C durante 24 horas e, posteriormente pesados. A fração do resíduo que degradou durante a incubação foi determinada como o peso do substrato incubado menos o peso do resíduo.

Foram determinadas as correlações entre os resultados da digestão por meio do peso dos resíduos com a produção de gás.

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

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

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

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

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

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

A produção de gás em mL (V) foi calculada a partir da pressão corrigida dos frascos, usando a pressão atmosférica da região (96,538 kPa) e a pressão atmosférica em condições normais (101,325 kPa), sendo este o valor de P .

A extensão e a taxa de potencial de produção de gás, em resposta à degradação do alimento, foram determinadas usando o um modelo logístico bicompartimental exponencial proposto por Pell & Schofield et al. (1994):

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

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

O ajuste das curvas e as estimativas dos parâmetros de interesse biológico foram realizados utilizando-se o processo iterativo do Gauss-Newton por meio do procedimento para modelos não lineares (PROC NLIN) do programa SAS (*Statistical Analysis System*, versão 9.1).

Para avaliar o modelo não linear, foi utilizado o coeficiente de determinação (r^2). Este valor representa quanto o modelo é capaz de ajustar os dados de produção de gás (Y= mL de gás/ g substrato incubado). Este valor é obtido a partir da soma de quadrado do erro (SCE) e a soma total dos quadrados (SCT) a partir da equação:

$$r = 1,0 - \frac{\text{SCE}}{\text{SCT}}$$

Para determinação *in vitro* da concentração de N-amoniacoal e do pH do líquido ruminal, foram simuladas as condições do rúmen, utilizando-se os jarros da incubadora Daisy^{II} Fermenter® (Ankom). Os jarros foram providos de tampas com válvulas e um sistema de três vias para permitir a coleta do líquido ruminal tamponado, assim como uma válvula tipo Büssen que permitia a liberação dos gases produzidos durante a fermentação.

Para cada jarro, foram pesadas 10 g de amostra, em triplicata, junto com 1600 mL de solução tampão e 400 mL de inócuo ruminal. Os jarros foram mantidos em um ambiente a 39°C sob agitação contínua (Figura 1).

Durante a incubação, foram coletadas amostras de 20 mL do líquido ruminal tamponado utilizando-se uma seringa e a torneira de três vias instalada na tampa de

cada jarro. As amostras foram coletas nos horários, 1, 2, 4, 6 e 8 horas após do início da incubação.

Em cada horário, foram utilizados 10 mL do líquido ruminal tamponado para mensurar o pH das amostras em duplicata utilizando-se um pHmetro digital Digimed DM20. O líquido ruminal restante (10 mL) foi armazenado em potes plásticos contendo 1 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 1:1, interrompendo o processo fermentativo e reduzindo o pH, evitando assim a volatilização do nitrogênio amoniacal ($N-NH_3$).



Figura 1. Metodologia *in vitro* para determinação de amônia e pH do líquido ruminal.

A determinação do nitrogênio amoniacal ($N-NH_3$) foi realizada de acordo com o método colorimétrico de Chaney & Marbarch, (1962) descrita em Campos (2004).

As amostras foram descongeladas e centrifugadas a 3000 rpm durante 15 min. Foram pipetados 40 μ L do sobrenadante e transferidos em tubos de ensaio. Em seguida, foram adicionados 5 mL de reagente fenol (50 mg de nitroprussiato de sódio e 10 g de cristais de fenol diluídos em 1 litro de água destilada) e 5 mL de reagente hipoclorito de sódio (5 g de hidróxido de sódio, 37,75 g de fosfato de sódio dibásico anidro e 25 mL de solução de hipoclorito de sódio 5% diluídos em 1 litro de água destilada).

Os tubos foram tampados, agitados, e mantidos em banho-maria a 37°C por 15 minutos. Posteriormente, foram realizadas as leituras de absorvância em espectrofotômetro com comprimento de onda de 550 nm cujos valores foram utilizados para calcular as concentrações de nitrogênio amoniacal em mg/dL de líquido ruminal.

Foi obtida uma equação de regressão linear a partir de uma curva de calibração do aparelho com diferentes concentrações de uma solução padrão preparada com cloreto de amônio. Admitiu-se um r mínimo de 0,99 para esta curva.

Os dados obtidos de cada parâmetro foram desdobrados em polinômios ortogonais de forma a permitir a análise de variância e regressão, de acordo com suas distribuições, utilizando-se o programa estatístico SAS® 9.2 (2009). As interações quando significativas foram desdobradas, com o estudo de um efeito dentro do outro e, analisadas mediante o modelo de regressão.

O modelo matemático utilizado foi:

$$Y_{ij} = \mu + D_i + L_j + D L_{ij} + e_{ij}; \quad Y_{ij} = \mu + D_i + L_j / D_i + e_{ij}$$

Em que:

i= Dieta

j= Nível de LCC

D_i = O efeito da dieta, variando de 1 a 5

L_j = Efeito principal do nível de LCC (0; 0,3; 0,6 e 1,2 g/kg)

D_{ij}= Efeito da interação da dieta com o nível de LCC

L_j/D_i = Efeito do LCC dentro da dieta, quando significativa a interação

e_{ij}= erro

Os dados da DIVMS, os parâmetros de fermentação ruminal, a concentração de N-amoniaco e o pH do líquido ruminal dos tratamentos testes foram comparados com o controle utilizando o teste de Dunnett e adotou-se $\alpha = 0,05$ de probabilidade. Todos os procedimentos estatísticos foram conduzidos utilizando-se o programa SAS® 9.2 (2009).

Resultados e discussão

Todas as dietas com inclusão de concentrado apresentaram maior ($P < 0,05$) digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS), quando comparadas com a dieta controle (sem concentrado) (Tabela 3). A digestibilidade da DIVMS aumentou linearmente ($P < 0,001$) conforme aumentou a inclusão do concentrado na dieta ($y = 66,42 + 0,18x$; $r^2 = 0,92$). Em geral, o incremento nos níveis de concentrado dietético resulta em aumento na digestibilidade dos nutrientes (exceto FDN), pois fornecem maior quantidade de energia que é disponível para o adequado crescimento das bactérias ruminais (Nussio, 2011).

Do mesmo modo, Dias et al. (2000) e Ítavo et al. (2002) observaram aumento linear na digestibilidade aparente total da MS com quantidades crescentes de concentrado nas dietas.

Tabela 3. Coeficientes de digestibilidade *in vitro* da matéria seca (g/g) de dietas para ruminantes com níveis crescentes de concentrado e líquido da casca da castanha de caju

| LCC (g/kg) | Concentrado (g/kg) | | | | | | Média | CV (%) |
|-------------|--------------------|-------------------|-------|-------------------|-----------------|------------------|-------|--------|
| | 0 | 200 | 400 | 600 | 800 | 1.000 | | |
| 0 | 0,591 | 0,577 | 0,767 | 0,794 | 0,796 | 0,800 | 0,747 | 13,3 |
| 0,3 | - | 0,719 | 0,768 | 0,839 | 0,894 | 0,883 | 0,821 | 9,78 |
| 0,6 | - | 0,769 | 0,757 | 0,756 | 0,821 | 0,849 | 0,791 | 6,08 |
| 1,2 | - | 0,672 | 0,730 | 0,696 | 0,797 | 0,787 | 0,733 | 8,75 |
| Média | 0,59 | 0,68* | 0,75* | 0,77* | 0,82* | 0,83* | | |
| CV (%) | 1,54 | 13,69 | 3,70 | 9,28 | 7,12 | 5,83 | | |
| Conc. | | | | ***L ¹ | | | | |
| LCC | | | | ***Q ² | | | | |
| LCC x Conc. | | | | *** | | | | |
| LCC/Conc. | | ***Q ³ | ns | ns | *Q ⁴ | **Q ⁵ | | |

*Difere do controle pelo teste de Dunnett (P<0,05)

*(P<0,05); **(P<0,01); *** (P<0,001); ns (P>0,05).

L: efeito linear; Q: efeito quadrático.

¹y=-0,664 + 0,0018x; r² = 0,92

²y=0,755+1,956x -18,06x²; r² = 0,82;

³y = 0,578 + 5,716x - 41,21x²; r² = 0,98;

⁴y = 0,812 + 1,740x - 17,16x²; r² = 0,55;

⁵y = 0,809 + 2,179x -19,97x²; r² = 0,80.

Houve efeito quadrático (P<0,001) do nível de LCC sobre a DIVMS ($y = 75,53 + 195,6x - 1806x^2$; r² = 0,82), sendo estimado o ponto de máxima DIVMS com 0,5 g de LCC/kg de MS. Assim, este resultado indica que a DIVMS aumentou até o nível de 0,5 g de LCC/kg de MS e posteriormente, decresceu com a inclusão de níveis de LCC maiores. Esta resposta quadrática deve-se a que a suplementação de LCC inibe a fermentação ruminal associada à sua propriedade antimicrobiana devida à presença de lipídios fenólicos em sua composição química (ácido anacárdico, cardol e cardanol) (Kubo et al., 1993). Os lipídios fenólicos apresentam propriedades anfipáticas, o que lhes permite interagir com os lipídios presentes nas membranas bacterianas, provocando o aumento da permeabilidade da membrana e, a fuga dos componentes citoplasmáticos, com a consequente lise da célula microbiana (Kubo et al., 1991; Burt et al., 2004). Este mecanismo de ação do LCC, possivelmente, seja o motivo da redução da digestibilidade da MS quando o óleo é administrado em altas doses, afetando o crescimento de algumas bactérias ruminais, principalmente as Gram-positivas.

Utilizando-se altas doses (5000 mg/L) de óleos essenciais Castillejos et al. (2006), também encontraram redução na digestibilidade da DIVMS, sugerindo que elevadas concentrações de compostos fenólicos (compostos ativos dos óleos funcionais) exibem intensa atividade antimicrobiana que pode afetar negativamente o processo de fermentação total.

Resultados semelhantes ao obtido no presente estudo foram relatados por Coneglian (2009), utilizando-se o produto Essential®, composto por LCC e o óleo de mamona, em dietas para bovinos, e obteve efeito quadrático dos níveis de óleos funcionais sobre a digestibilidade aparente total dos nutrientes, sendo que, o nível que resultou na maior digestibilidade dos nutrientes foi de 0,60 g de Essential®/Kg de MS em dietas com alta inclusão de volumoso (feno) e, de 0,57 g de Essential®/Kg de MS para dietas com alta inclusão de grãos.

Contudo, outros estudos não reportaram influência dos óleos essenciais sobre a digestibilidade da MS (Busquet et al., 2005; Kamra et al., 2005; Benchaar et al., 2007). Deste modo, maior número de pesquisas é necessário a fim de elucidar o efeito dos óleos funcionais sobre a digestibilidade da MS, pois os resultados ainda são controversos, situação devida em parte, a que o efeito dos óleos funcionais depende do tipo de óleo testado e do nível de inclusão do mesmo na dieta.

Foi observada interação ($P < 0,001$) entre os níveis de concentrado e LCC sobre a DIVMS, uma vez que, houve efeito quadrático ($P < 0,05$) dos níveis de LCC para esta variável dentro das dietas, 200 g/kg ($y = 57,87 + 571,6x - 4121x^2$; $r^2 = 0,98$), 800 g/kg ($y = 81,24 + 174,0x - 1716x^2$; $r^2 = 0,55$) e 1.000 g/kg ($y = 80,97 + 217,9x - 1997x^2$; $r^2 = 0,80$) de concentrado, sendo estimada a maior digestibilidade nos níveis de 0,7; 0,5 e 0,5 g de LCC/kg de MS dentro de cada dieta, respectivamente.

Os parâmetros da cinética da fermentação ruminal determinados a partir da incubação *in vitro* de dietas com níveis crescentes de concentrado e LCC são mostrados na Tabela 4. Os coeficientes de determinação (r^2) obtidos nas análises de produção de gás foram superiores a 0,99 mostrando bom ajuste do modelo logístico bicompartimental para descrever a fermentação ruminal neste estudo.

Dietas com 400; 600; 800 e 1.000 g/kg de concentrado resultaram em maior ($P < 0,05$) degradação da fração A (mL/gás), comparado com a dieta controle (sem concentrado) pelo teste de Dunnett, no entanto, a dieta com 200 g/kg de concentrado não apresentou o mesmo efeito ($P > 0,05$). Este comportamento deve-se a que, quanto maior a quantidade de carboidratos prontamente fermentáveis (açúcares solúveis e

amido) no alimento, maior será o volume de gás produzido na fração de rápida degradação (fração A).

A degradação da fração D (lenta degradação; $y = 11,48 + 0,032x$; $r^2 = 0,92$) e sua respectiva taxa de degradação (fração E; $y = 11,48 + 0,032x$; $r^2 = 0,92$) aumentaram linearmente ($P < 0,001$), conforme aumentou a inclusão de concentrado nas dietas. O crescimento microbiano é diretamente dependente da disponibilidade de energia no rúmen, energia que é proveniente, principalmente, da fermentação dos carboidratos prontamente fermentáveis (Nocek & Russell, 1988). Dessa forma, o aumento dos níveis de concentrado na dieta aumentou a concentração de carboidratos solúveis e, conseqüentemente, pode melhorar a degradação da celulose e hemicelulose (Fração D) e sua velocidade de degradação (Fração E), uma vez que houve maior disponibilidade de energia para o crescimento das bactérias ruminais.

Após avaliar o efeito de níveis crescentes de concentrado e dois níveis de proteína sobre a digestibilidade aparente dos nutrientes de vacas leiteiras, Silva et al. (2009) não encontraram influencia do nível de concentrado sobre a digestibilidade do FDN, contudo, a digestibilidade do FDN foi maior quando o nível de proteína bruta nas dietas aumentou. Os autores sugeriram que este resultado era devido ao maior aporte de nitrogênio aos microrganismos ruminais, situação que pode melhorar a degradação da fibra, conforme relatado por Van Soest (1994). No presente estudo, o aumento dos níveis de concentrado pode ter aumentado a degradação da fração D (celulose e hemicelulose) em decorrência do maior teor de proteína dietética, pois houve maior quantidade de nitrogênio disponível para a manutenção e crescimento da população microbiana ruminal.

A fração B (/h) (taxa de degradação da fração A) não foi influenciada ($P > 0,05$) pelas dietas experimentais. No entanto, a fração E (/h) (taxa de degradação da fração D) foi maior nas dietas com 400; 600; 800 e 1.000 g de concentrado/kg, quando comparado com a dieta controle, visto que as dietas com concentrado apresentam maior conteúdo de carboidratos solúveis, os quais são degradados mais rapidamente pelas enzimas bacterianas que os carboidratos estruturais (Azevêdo et al., 2009).

A dieta com 200 g de concentrado/kg apresentou uma taxa de degradação similar ($P > 0,05$) à obtida com a dieta controle (0,047 e 0,045 /h, respectivamente). Esta similaridade da degradação da fração E nestas duas dietas deve-se a que, a dieta com 200 g de concentrado/kg, apresentou alta concentração de FDN, similar à encontrada na dieta controle (431 vs. 496 g/kg; Tabela 2).

Tabela 4. Parâmetros cinéticos da fermentação ruminal de dietas com níveis crescentes de concentrado e líquido da casca da castanha de caju

| Parâmetros | Concentrado (g/kg) | | | | | | | LCC (g/kg) | | | | | Anova | | |
|--------------|--------------------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|------------|-------|-------|--------|-------|-------------------|-----|-------------|
| | 0 | 200 | 400 | 600 | 800 | 1000 | CV% | 0 | 3 | 6 | 12 | CV% | Conc. | LCC | LCC x Conc. |
| A (mL/gás) | 1,90 | 2,18 | 2,64* | 2,26* | 2,40* | 2,68* | 27,18 | 2,33 | 2,49 | 2,47 | 2,45 | 25,23 | ns | ns | ** |
| B (/h) | 0,80 | 0,76 | 0,77 | 0,80 | 0,80 | 0,77 | 17,30 | 0,78 | 0,75 | 0,77 | 0,80 | 18,31 | ns | ns | ns |
| C(horas) | 4,06 | 2,92* | 2,09* | 2,44* | 1,60* | 1,61* | 39,77 | 2,18 | 1,89 | 2,34 | 2,09 | 29,53 | ***L ¹ | ns | *** |
| D (mL/gás) | 10,22 | 12,04* | 13,05* | 12,95* | 14,46* | 14,55* | 7,59 | 13,61 | 13,26 | 13,31 | 13,37 | 7,58 | ***L ² | ns | ns |
| E (/h) | 0,047 | 0,045 | 0,042* | 0,057* | 0,057* | 0,062* | 9,98 | 0,052 | 0,051 | 0,055 | 0,052 | 8,74 | ***L ³ | ns | ns |
| A+D (mL/gás) | 12,13 | 14,22* | 15,69* | 15,21* | 16,85* | 17,23* | 6,34 | 15,94 | 15,75 | 15,78 | 15,83 | 5,81 | ***L ⁴ | ns | ** |
| DMS (mg) | 344,4 | 366,4 | 382,0 | 376,1 | 390,8 | 394,8 | 3,81 | 377,1 | 378,6 | 384,3 | 3,81,0 | 3,83 | ***L ⁵ | ns | ns |

*Difere do controle pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$).

($P \leq 0,01$); *($P \leq 0,001$); ns ($P \geq 0,05$).

L - efeito linear; Q - efeito quadrático.

¹y = 1,203 - 0,015x; $r^2=0,77$

²y = 11,48 + 0,032x; $r^2=0,92$

³y = 0,038 + 0,0001x; $r^2=0,83$

⁴y = 13,68 + 0,036x; $r^2=0,87$

⁵y = 343,82 + 9,1229x; $r^2= 0,86$

DMS = desaparecimento do substrato após 48 horas de incubação (mg).

$r^2= 0,99$ - ajuste do modelo logístico bicompartimental para descrever a fermentação para todas as dietas experimentais.

Os parâmetros da cinética da fermentação obtidos da produção de gás *in vitro* foram analisados sobre 100 mg de substrato de acordo com o modelo $y=A/\{1+\exp [2 + 4B (C-t)]\} + D/\{1 + \exp [2 + 4E (C-t)]\}$, onde y é o volume total de gás em (mL); A e D são o volume de gás (mL) proveniente da digestão rápida (carboidratos solúveis e amido) e digestão lenta (celulose e hemicelulose), respectivamente; B e E correspondem à taxa de degradação das frações de rápida e lenta degradação (/h), respectivamente; C é o *lag time* (h), tempo de colonização bacteriana.

Todas as dietas com inclusão de concentrado apresentaram menor tempo de colonização dos microrganismos ao substrato ou *lag time* (fração C), quando comparadas com a dieta controle (sem concentrado). Os alimentos volumosos, como no caso da silagem, geralmente apresentam maior *lag time* por conter maiores teores de fibra detergente neutra (FDN) (Azevêdo et al., 2003), necessitando de um tempo mais longo para a ação dos microrganismos ruminais. O alto *lag time* encontrado para a silagem (dieta controle), de 4,06 h, explica a menor DIVMS obtida para esta dieta quando comparada às dietas com inclusão de concentrado (*lag time* em média de 2,1 h).

Houve efeito linear decrescente ($P < 0,001$) dos níveis de concentrado sobre o *lag time* (fração C) ($y = 1,203 - 0,015x$; $r^2 = 0,77$). Este resultado está relacionado com a concentração de açúcares solúveis no ambiente ruminal, que aceleram o crescimento bacteriano (Hiltner & Dehority, 1983), reduzindo o tempo de colonização das bactérias e, portanto, aumentando o grau de contato entre os microrganismos (enzimas) e o substrato (Nogueira et al., 2006). Hiltner & Dehority (1983) encontraram redução no *lag time* da fermentação da celulose *in vitro* quando adicionaram carboidratos solúveis no líquido ruminal, e afirmaram que o resultado era decorrente da proliferação acelerada das bactérias, uma vez que o aumento da quantidade do inócuo ruminal resultou no mesmo efeito.

Cabe ressaltar que, quanto menor o tempo de colonização (*lag time*), mais rapidamente a microbiota ruminal conseguirá degradar o substrato (Pereira et al., 2008), incrementando assim a quantidade de gás produzida. Por tal motivo, todas as dietas com inclusão de concentrado resultaram em maior ($P < 0,05$) produção total de gás que a dieta controle.

A produção total de gás (fração A + D; mL/gás) apresentou resposta linear positiva ($P < 0,001$), em relação aos níveis de concentrado ($y = 13,68 + 0,036x$; $r^2 = 0,87$). Este resultado foi similar ao obtido com os valores de digestibilidade da matéria seca (DMS) após 48 horas de fermentação, visto que estes valores também aumentaram em resposta do aumento dos níveis de concentrado. A produção total de gás e a DMS são dois parâmetros intimamente relacionados (Nsahlai et al., 1995; Pell et al., 1997). A maior produção de gás está relacionada ao aumento dos carboidratos prontamente fermentáveis, que influenciam positivamente a fração de rápida degradação (fração A) e, finalmente, a produção total de gás (fração A + D) (Campos et al., 2000). Na figura 2 ilustra-se as curvas de produção cumulativa de gás em mL de gás produzido/100 mg de matéria seca incubada das dietas com níveis de concentrado e LCC.

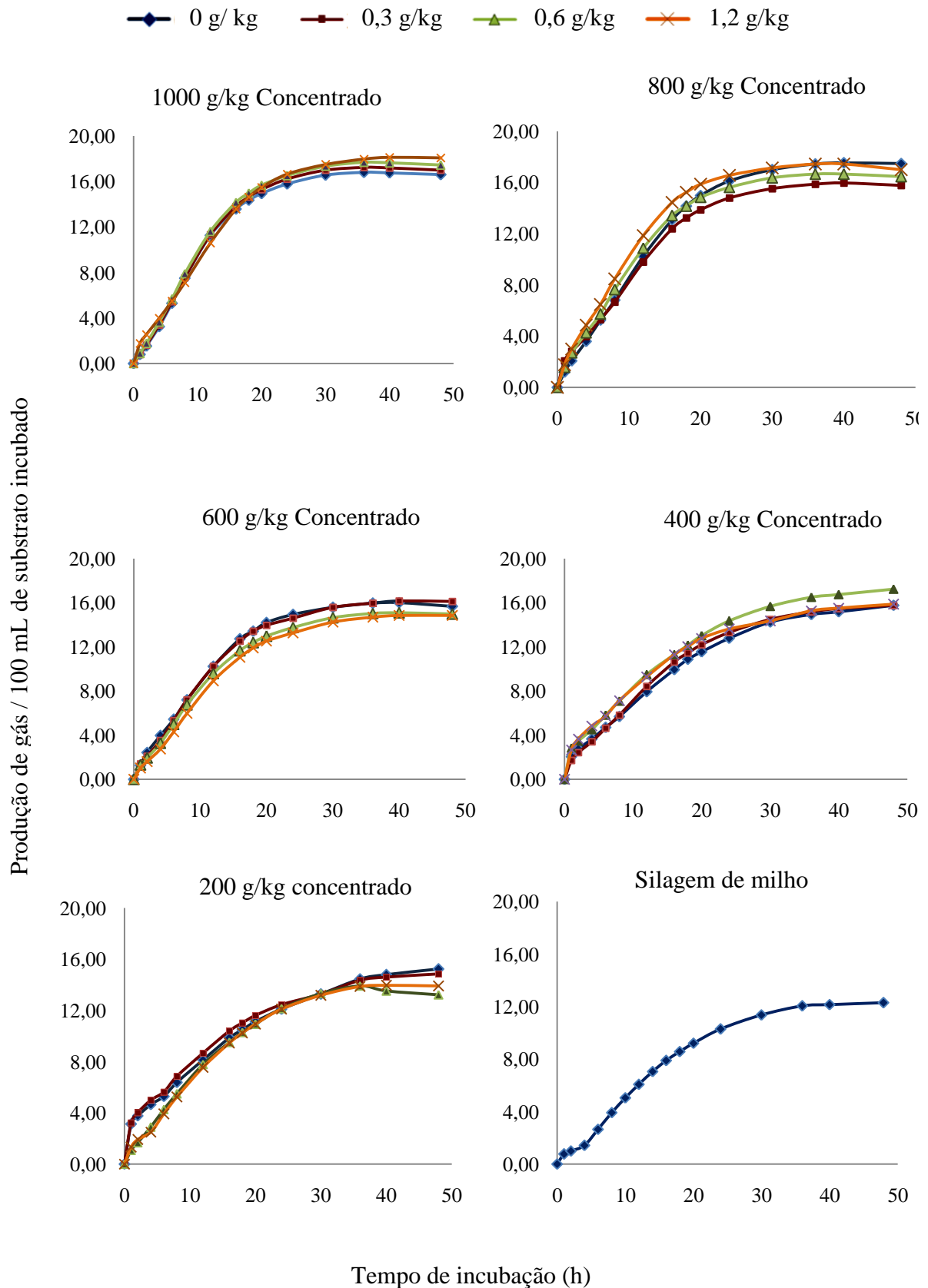


Figura 2. Curvas de produção cumulativa de gás em mL de gás/ 100 mg de MS incubada das dietas com níveis de concentrado e líquido da casca da castanha de caju. LCC.

Para confirmar a relação entre a produção total de gás e substrato que degradou durante a incubação (DMS), foi realizada a correlação de Pearson, observando-se uma alta correlação positiva entre estas duas variáveis (0,94). Este resultado demonstra a possibilidade de estimar a curva de digestão da MS através dos valores da produção total de gás (Figura 3). A técnica de produção de gás *in vitro* oferece uma rápida estimativa da taxa de degradação, podendo ser uma técnica precisa para estimar a digestibilidade dos alimentos (Trei et al., 1970).

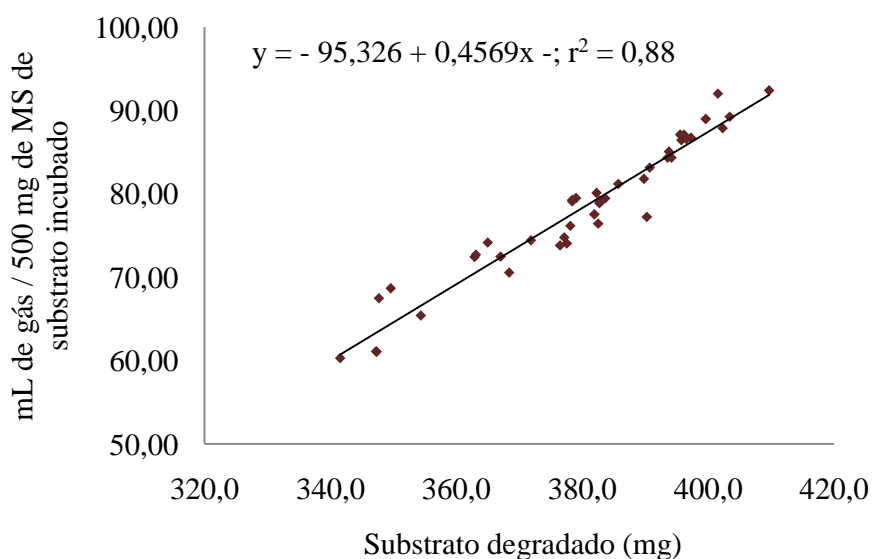


Figura 3. Correlação entre a produção de gás e substrato degradado (mg) das dietas experimentais

Não foi encontrado efeito ($P > 0,05$) do LCC quando analisado simultaneamente em todas as dietas com inclusão de concentrado sobre os parâmetros de produção de gás (ajustados no modelo bicompartimental). Contudo, foram observados efeitos isolados do LCC sobre a produção de gás apenas dentro de alguns níveis de concentrado. Houve interação entre os níveis de LCC e concentrado sobre a fração A e C, e sobre a produção total de gás (fração A + D). Estas interações foram desdobradas e apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5. Desdobramento da interação entre os níveis de líquido da casca da castanha de caju e concentrado sobre a fração A e C, e a produção total de gás (fração A+D)

| Item | Concentrado (g/kg) | | | | | | LCC x Concentrado | | | | |
|--------------|--------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------------|-----------------|-----------------|-----|-------|
| | LCC (g/kg) | 200 | 400 | 600 | 800 | 1.000 | 200 | 400 | 600 | 800 | 1.000 |
| A (mL/gás) | 0 | 2,17 | 2,21 | 2,24 | 2,58 | 2,43 | **L ¹ | ns | ns | ns | ns |
| | 0,3 | 2,97 | 2,30 | 2,23 | 2,03 | 2,59 | | | | | |
| | 0,6 | 2,05 | 3,35 | 2,29 | 2,28 | 2,67 | | | | | |
| | 1,2 | 1,54 | 2,94 | 2,25 | 2,51 | 3,01 | | | | | |
| C (horas) | 0 | 1,28 | 1,64 | 2,02 | 2,96 | 2,99 | ***L ² | *Q ³ | ns | ns | ns |
| | 0,3 | 0,50 | 2,15 | 2,23 | 1,59 | 3,03 | | | | | |
| | 0,6 | 2,64 | 1,79 | 2,36 | 1,87 | 2,87 | | | | | |
| | 1,2 | 2,06 | 0,90 | 3,03 | 1,69 | 2,78 | | | | | |
| A+D (mL/gás) | 0 | 14,67 | 15,36 | 15,77 | 17,38 | 16,54 | ns | ns | *L ⁴ | ns | ns |
| | 0,3 | 14,69 | 15,44 | 15,87 | 15,83 | 17,05 | | | | | |
| | 0,6 | 13,59 | 16,95 | 14,90 | 16,46 | 17,41 | | | | | |
| | 1,2 | 13,94 | 15,43 | 14,64 | 17,23 | 17,92 | | | | | |

*P≤0,05; **P≤0,01; ***P≤0,001.ns (P>0,05).

L - efeito linear; Q - efeito quadrático.

¹ y = 2,591 - 7,833x; r² = 0,46

² y = 1,081 + 10,19x; r² = 0,31

³ y = 1,7065 + 14,124x - 175,25 x²; r² = 0,94

⁴ y = 15,96 - 13,53x; r² = 0,84

Na dieta com 200 g de concentrado/kg houve efeito linear decrescente ($P < 0,01$) ($y = 2,591 - 7,833x$; $r^2 = 0,46$) e crescente ($P < 0,001$) ($y = 1,081 + 10,19x$; $r^2 = 0,31$) dos níveis de LCC para a degradação da fração A e C, respectivamente. O *lag time* ou fração C, possivelmente aumentou devido ao efeito antimicrobiano do LCC, reduzindo a quantidade de bactérias disponíveis para degradar o substrato e, portanto, diminuindo a produção de gás da fração de rápida de degradação (fração A).

No presente estudo, não foi identificado o tipo de microrganismo ruminal sobre o qual o LCC poderia ter atuado. Contudo, vários estudos determinaram que o LCC atua principalmente sobre as bactérias Gram-positivas (Himejima & Kubo, 1991; Kubo et al., 1993; Parasa et al., 2011). Bactérias Gram-negativas, produtoras de propionato são resistentes à ação do LCC (Parasa et al., 2011), possivelmente, porque estas bactérias apresentam em sua constituição uma membrana externa de proteção que esta ausente nos organismos Gram-positivos.

A diminuição do número de bactérias Gram-positivas induzido pelo LCC, pode indiretamente promover o crescimento de bactérias Gram-negativas (resistentes ao LCC), tais como *Selenomonas dextrinosolvens*, *Selenomonas ruminantium* e *Megasphaera elsdenii*, envolvidas na produção de propionato (Watanabe et al., 2010). Portanto, ao induzir mudanças nas espécies bacterianas do rúmen, o LCC pode melhorar a eficiência da fermentação ruminal, o que significa na prática, aumentar a produção de propionato e deprimir a metanogênese (Watanabe et al., 2010). O LCC é excelente aditivo que pode reduzir indiretamente a metanogênese ao inibir o crescimento das bactérias Gram-positivas, responsáveis pela formação de hidrogênio e formato, intermediários na formação do metano no ambiente ruminal (Shinkai et al., 2012).

Na dieta com 400 g de concentrado/kg houve efeito quadrático ($P < 0,05$) dos níveis de LCC sobre a fração C ($y = 1,7065 + 14,124x - 175,25 x^2$; $r^2 = 0,94$), sendo estimado o maior tempo de colonização no nível de 0,4 g de LCC/kg.

Por outro lado, dentre as dietas com 600 g/kg de concentrado, foi observado efeito linear decrescente ($P < 0,05$) dos níveis de LCC sobre a produção total de gás ($y = 15,96 - 13,53x$; $r^2 = 0,84$). A redução da produção total de gás na dieta com 600 g/kg de concentrado, em resposta ao aumento do nível de LCC, não é um indicativo que o LCC tenha afetado a digestibilidade desta dieta, pois os níveis dietéticos do óleo não comprometeram a DIVMS. Este efeito pode ser resultado de uma redução na produção de metano e amônia, pois, a literatura relata que os compostos fenólicos, componentes do LCC, além de inibir o crescimento das bactérias metanogênicas, pode inibir as

bactérias hiper-produtoras de amônia, especialmente o *Clostridium sticklandii* e a *Peptostreptococcus anaerobius* (McIntosh et al., 2003).

A concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) aumentou linearmente (P<0,001) com o aumento no nível de concentrado na dieta ($y = 12,74 + 0,091x$; $r=0,91$) (Tabela 6). Esperava-se que ao aumentar a inclusão de concentrado nas dietas, as concentrações de N-NH₃ fossem reduzidas devido a uma maior síntese de proteína microbiana, resultante da maior quantidade de energia disponível no rúmen pela inclusão do concentrado. No entanto, o aumento dos níveis de concentrado nas dietas resultou em maiores concentrações de N-NH₃, possivelmente, por aumentar o teor de proteína da dieta (82 para 145 g/kg de PB), situação que pode promover atividades proteolíticas e a desaminação de aminoácidos no rúmen, quando a taxa de produção de amônia excede sua taxa de utilização (Wallace et al., 1987). Este resultado está em acordo com aqueles obtidos por Valadares Filho et al. (1997) e Dias et al. (2000), onde os autores encontraram efeito linear positivo na concentração de N-NH₃ com o aumento dos níveis de proteína na ração.

Tabela 6. Valores médios da concentração *in vitro* de amônia (mg/dL) de dietas com níveis de concentrado e líquido da casca da castanha de caju (LCC)

| LCC (g/kg) | Concentrado (g/kg) | | | | | | Média | CV (%) |
|---------------------|--------------------|-------|-------|-------------------|-------|-------|-------|--------|
| | 0 | 200 | 400 | 600 | 800 | 1.000 | | |
| 0 | 15,52 | 14,84 | 17,95 | 18,14 | 21,86 | 22,82 | 19,12 | 27,8 |
| 0,3 | - | 15,13 | 17,03 | 17,10 | 21,16 | 21,86 | 18,45 | 24,9 |
| 0,6 | - | 14,67 | 16,31 | 16,35 | 20,99 | 21,07 | 17,88 | 26,4 |
| 1,2 | - | 13,90 | 16,12 | 16,13 | 20,87 | 20,75 | 17,55 | 26,9 |
| Média | 15,52 | 14,6 | 16,9 | 16,9 | 21,2* | 21,6* | | |
| CV (%) | 27,25 | 20,1 | 21,4 | 20,4 | 23,6 | 21,7 | | |
| Tempo de coleta (h) | | | | | | | | |
| 1 | 9,57 | 11,42 | 11,75 | 11,91 | 13,30 | 13,77 | 12,43 | 12,9 |
| 2 | 18,21 | 19,07 | 20,59 | 21,22 | 25,49 | 26,16 | 22,51 | 14,4 |
| 4 | 19,41 | 15,93 | 19,87 | 18,79 | 25,62 | 24,49 | 20,94 | 18,4 |
| 6 | 18,60 | 14,23 | 17,43 | 17,03 | 23,17 | 22,89 | 18,95 | 19,5 |
| 8 | 11,81 | 12,51 | 14,62 | 15,70 | 18,52 | 20,82 | 16,43 | 21,2 |
| Anova | | | | | | | | |
| Conc. | | | | ***L ¹ | | | | |
| LCC | | | | ***L ² | | | | |
| Tempo | | | | ***Q ³ | | | | |
| LCC x Conc. | | | | ns | | | | |

*Difere do controle pelo teste de Dunnett (P<0,05).

*(P<0,05); **(P≤0,01); ***(P≤0,001); ns (P≥0,05).

L - efeito linear; Q - efeito quadrático.

¹y = 12,74 + 0,091x; r² = 0,91

²Y = 18,92 -12,71x; r² = 0,86

³y = 10,88 + 4,777x -0,524x², r² = 0,54; 4,55 h máxima

De forma diferente, os níveis de LCC reduziram linearmente ($P < 0,001$) a concentração ruminal de $N-NH_3$ ($y = 18,92 - 12,71x$; $r^2 = 0,86$) (Figura 4). Este efeito pode ser devido à inibição produzida pelos componentes ativos do LCC no crescimento de bactérias proteolíticas, assim como, podem estimular o crescimento de microrganismos que utilizam a amônia como fonte de energia (Watanabe et al., 2010). Cabe ressaltar que a redução do $N-NH_3$ sugere que a amônia foi utilizada como substrato para a síntese de proteína microbiana, diminuindo a excreção de nitrogênio e o gasto energético para síntese e excreção de uréia (Sniffen et al., 1992).

Estudos prévios demonstraram que o Timol em doses de 500 mg/L, um dos principais compostos do óleo de tomilho e orégano, reduzem expressivamente a produção de amônia (NH_3) e aumentam as concentrações de propionato no rúmen (McIntosh et al., 2003; Castllejos et al., 2006;) situação que resulta em aumento na eficiência do metabolismo energético e, conseqüentemente do animal, com menor poluição ambiental.

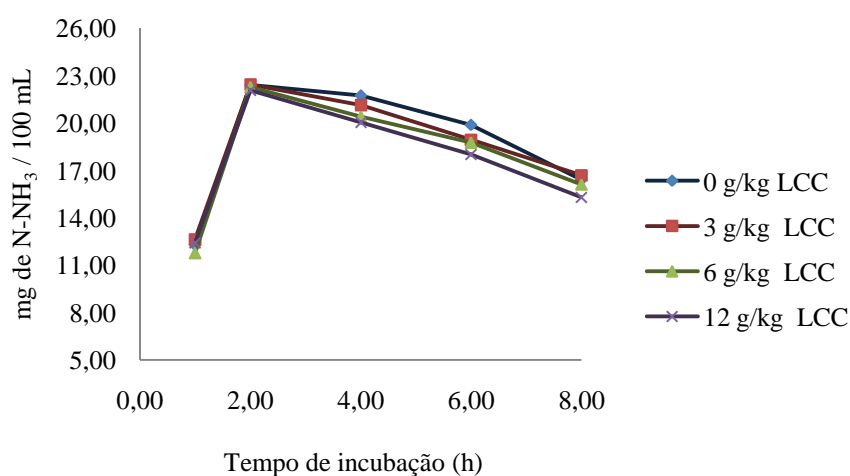


Figura 4. Variação na concentração *in vitro* de N-amoniaco ($N-NH_3$) no líquido ruminal durante um período de 8 horas de incubação.

Houve efeito quadrático ($P < 0,001$) do tempo de incubação sobre a produção de amônia ($y = 10,88 + 4,777x - 0,524x^2$; $r^2 = 0,54$), sendo estimada a máxima produção de amônia no líquido ruminal às 4,6 h de incubação, com um valor de 21,74 mg $N-NH_3$ /dL. Ribeiro et al. (2009) encontraram valores semelhantes, sendo a máxima

concentração de amônia estimada em 29,41 mg/dL, 4 horas após a alimentação de bezerros que receberam dietas ricas em concentrado.

Slyter et al. (1979) e mais recentemente Clark et al. (1992), indicaram que a concentração de N-NH₃ necessária para manter o máximo crescimento e síntese de proteína microbiana por unidade de substrato fermentado é de 5 mg N-NH₃/dL. Entretanto, Owens & Bergen (1983) sugeriram que as concentrações para maximizar a síntese microbiana podem variar entre 0,35 a 29 mg N-NH₃/dL no fluido ruminal, encontrando-se os valores de amônia obtidos neste estudo dentro deste intervalo. De acordo com Gabara (2001), o nível ótimo de N-NH₃ varia conforme o alimento e a disponibilidade de carboidratos fermentáveis no rúmen.

Tabela 7. Valores médios da concentração *in vitro* de pH de dietas com níveis crescentes de concentrado e de líquido da casca da castanha de caju

| LCC (g/kg) | Concentrado (g/kg) | | | | | | Média | CV (%) |
|---------------------|--------------------|-----------------|-----------------|-------------------|-----------------|-----------------|-------|--------|
| | 0 | 200 | 400 | 600 | 800 | 1.000 | | |
| 0 | 6,72 | 6,70 | 6,65 | 6,62 | 6,67 | 6,68 | 6,66 | 1,36 |
| 0,3 | - | 6,71 | 6,66 | 6,66 | 6,66 | 6,64 | 6,66 | 1,44 |
| 0,6 | - | 6,71 | 6,68 | 6,70 | 6,68 | 6,65 | 6,68 | 1,34 |
| 1,2 | - | 6,74 | 6,69 | 6,71 | 6,69 | 6,62 | 6,69 | 1,48 |
| Média | 6,72 | 6,71 | 6,67 | 6,67 | 6,67 | 6,65 | | |
| CV (%) | 0,69 | 0,96 | 1,23 | 1,63 | 1,29 | 1,73 | | |
| Tempo de coleta (h) | | | | | | | | |
| 1 | 6,79 | 6,78 | 6,77 | 6,81 | 6,78 | 6,78 | 6,79 | 0,36 |
| 2 | 6,73 | 6,76 | 6,75 | 6,75 | 6,74 | 6,74 | 6,75 | 0,43 |
| 4 | 6,70 | 6,73 | 6,67 | 6,67 | 6,68 | 6,67 | 6,68 | 0,62 |
| 6 | 6,68 | 6,65 | 6,58 | 6,57 | 6,59 | 6,56 | 6,60 | 0,80 |
| 8 | 6,68 | 6,65 | 6,59 | 6,56 | 6,57 | 6,49 | 6,57 | 0,96 |
| Anova | | | | | | | | |
| Conc. | | | | ***L ¹ | | | | |
| LCC | | | | ***L ² | | | | |
| Tempo | | | | ***L ³ | | | | |
| LCC x Conc. | | | | *** | | | | |
| LCC/Conc. | ns | *L ⁴ | *L ⁵ | *L ⁶ | *L ⁷ | *L ⁸ | | |

Teste de Dunnett (P>0,05).

*(P<0,05); **(P≤0,01); ***(P≤0,001).

L - efeito linear; Q - efeito quadrático.

$$^1y = 6,7162 - 0,0077x; r^2 = 0,75$$

$$^2y = 6,658 + 0,2762x; r^2 = 0,88$$

$$^3y = 6,8148 - 0,0326x; r^2 = 0,99$$

$$^4y = 6,698 + 0,323x; r^2 = 0,92$$

$$^5y = 6,652 + 0,342x; r^2 = 0,93$$

$$^6y = 6,634 + 0,733x; r^2 = 0,83$$

$$^7y = 6,664 + 0,209x; r^2 = 0,69$$

$$^8y = 6,67 - 0,428x; r^2 = 0,77$$

O pH do líquido ruminal teve uma queda linear ($P < 0,001$) em resposta à inclusão do concentrado na dieta ($y = 6,7162 - 0,0077x$; $r^2 = 0,75$) e o tempo de coleta ($y = 6,8148 - 0,0326x$; $r^2 = 0,99$) (Tabela 7). Estes resultados são devidos à maior concentração de carboidratos solúveis que estimulam a produção de AGCC e ácido láctico, os quais se acumulam no líquido ruminal, reduzindo o pH e, aumentando a produção total de gás, como evidenciado neste estudo. A redução do pH exerce uma ação seletiva sobre as bactérias, principalmente as celulolíticas, que tem seu crescimento inibido em ambiente ruminal ácido, comprometendo assim a digestibilidade do FDN (Cabral et al., 2008).

A inclusão do LCC aumentou linearmente ($P < 0,001$) o pH do líquido ruminal independente da dieta utilizada ($y = 6,658 + 0,2762x$; $r^2 = 0,88$). Provavelmente, este efeito está relacionado à atividade antimicrobiana do LCC contra as bactérias Gram-positivas, o que promove o crescimento de microrganismos Gram-negativos, tais como *Selenomonas ruminantium* e *Megasphaera elsdenii* (Watanabe et al., 2010), principais bactérias utilizadoras do lactato como substrato energético (Kozloski, 2011), o que pode contribuir com o aumento do pH observado.

Houve interação ($P < 0,001$) entre os níveis de LCC e de concentrado sobre o pH do líquido ruminal. Com exceção da dieta com 1000 g de concentrado/kg, onde o pH teve uma queda linear ($y = 6,67 - 0,428x$; $r^2 = 0,77$), a inclusão do LCC na dieta produziu aumento linear no pH do líquido ruminal. Esse fato pode ser observado nas dietas com 200 g/kg ($y = 6,698 + 0,323x$; $r^2 = 0,92$), 400 g/kg ($y = 6,652 + 0,342x$; $r^2 = 0,93$), 600 g/kg ($y = 6,634 + 0,733x$; $r^2 = 0,83$) e 800 g/kg ($y = 6,664 + 0,209x$; $r^2 = 0,69$). Este resultado indica que o LCC é eficaz em manter estáveis as condições de pH ruminal em dietas até com 800 g/kg de concentrado, acima desta proporção, a eficiência do LCC para manter o pH pode ser reduzida.

Conclusões

A inclusão de 0,5 g de LCC/kg MS de dietas para ruminantes melhora a DIVMS, favorecendo o melhor aproveitamento dos nutrientes da dieta, sem os parâmetros cinéticos da fermentação ruminal. A adição de LCC em dietas para ruminantes reduz a produção de amônia, e evita reduções drásticas do pH ruminal, conseqüentes, da inclusão de ingredientes concentrados, resultados que favorecem o melhor aproveitamento dos nutrientes da dieta.

Referências bibliográficas

- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALITICAL CHEMISTS - AOAC. **Official Methods of Analysis**. 15 ed. Arlington, V.A., 1990.
- AZEVÊDO, J.A.G.; PEREIRA, J.C.; QUEIROZ, A.C. et al. Composição químico-bromatológica, fracionamento de carboidratos e cinética da degradação *in vitro* da fibra de três variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, p.1443-1453, 2003.
- AZEVÊDO, M.M.R.; VASCONCELOS, V.R.; PIMENTEL, J.C.M. Dinâmica de fermentação ruminal *in vitro* do pseudofruto de cinco clones de cajueiro. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.752-759, 2009.
- BENCHAAR, C.; CHAVES, A.V.; FRASER, G.R. et al. Effects of essential oils and their components on *in vitro* rumen microbial fermentation. **Journal Animal Science**, v.87, p.413-419, 2007.
- BUSQUET, M.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A. et al. Effect of garlic oil and four of its compounds on rumen microbial fermentation. **Journal of Dairy Science**, v.88, p.4393-4404, 2005.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, p.223-253, 2004.
- BROUDISCOU, L.P.; PAPON, Y.; BROUDISCOU, A.F. Effects of dry plant extracts on fermentation and methanogenesis in continuous culture of rumen microbes. **Animal Feed Science and Technology**, v.87, p.263-277, 2000.
- CABRAL, L.S.; VALADARES FILHO, S.C.; DETMANN, E.J. et al. Eficiência microbiana e parâmetros ruminais em bovinos alimentados com dietas à base de volumosos tropicais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, p.919-925, 2008.
- CAMPOS, F.P.; VIEIRA BOSE, M.L.; BONI, C. et al. Avaliação do sistema de monitoramento computadorizado de digestão *in vitro*. Desaparecimento da matéria seca e/ou FDN pela produção de gás. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, p. 537-544, 2000.
- CAMPOS, F.P.; NUSSIO, C.M.B.; NUSSIO, L.G. **Métodos de análises de alimentos**. Piracicaba: FEALQ, 2004. 135p.
- CASALI, A.O.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C. et al. Estimação de teores de componentes fibrosos em alimentos para ruminantes em sacos de diferentes tecidos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.130-138, 2009.
- CASTILLEJOS, L.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A. Effect of essential oil active compounds on rumen microbial fermentation and nutrient flow *in vitro* systems. **Journal of Dairy Science**, v.89, p.2649-2658, 2006.
- CHANEY, A.L.; MARBACH, E.P. Modified reagents for determination of urea and ammonia. **Clinical Chemistry**, v.8, p.130-137, 1962.
- CLARK, J. H.; KLUSMEYER, T.H.; CAMERON, M.R. Symposium: nitrogen metabolism and amino acid nutrition in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.75, p. 2304-2323, 1992.
- CONEGLIAN, S.M. **Uso de óleos essenciais de mamona e caju em dietas de bovinos**. 2009. 100f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá.
- COSTA, S.F.; PEREIRA, M.N.; MELO, L.Q. et al. Alterações morfológicas induzidas por butirato, propionato e lactato sobre a mucosa ruminal e epiderme de bezerras.

- II. Aspectos ultra-estruturais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, p.10-18, 2008.
- DIAS, H.L.C.; VALADARES FILHO, S.C.; COELHO DA SILVA, J.F. et al. Consumo e digestões totais e parciais em novilhos F1 limousin x nelore alimentados com dietas contendo cinco níveis de concentrado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, p.545-554, 2000.
- GABARA, P.R. **Digestibilidade de nutrientes e parâmetros ruminais e sanguíneos de novilhos nelore alimentados com fontes protéicas e energéticas com diferentes degradabilidades ruminais**. SP: ESALQ, 2001, 94p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2001.
- HILTNER, P.; DEHORITY, B.A. Effect of soluble carbohydrates on digestion of cellulose by pure cultures of rumen bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v.46, p.642-648, 1983.
- HIMEJIMA, M.; KUBO, I. Antibacterial Agents from the Cashew *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae) Nut Shell Oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.39, p.418-421, 1991.
- HOLDEN, L.A. Comparison of methods of in vitro dry matter digestibility for tem feeds. **Journal of Animal Science**, v.82, p. 171794, 1999.
- ÍTAVO, L.C.V.; VALADARES FILHO, S.C.; SILVA, F.F. et al. Consumo e digestibilidade aparentes totais e parciais de nutrientes em novilhos alimentados com dietas contendo vários níveis de concentrado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, p.1543-1552, 2002.
- KAMRA, D.N.; AGARWAL, N.; CHAUDHARY, L.C. Inhibition of ruminal methanogenesis by tropical plants containing secondary plant compounds. **International Congress Series**, v. 1293, p.156–163, 2005.
- KOBAYASHI, Y., NAGASHIMA, K.; MOCHIZUKI, M. **Rumen fermentation improving agent**, 2010.
- KUBO, I.; HIMEJIMA, M. Anethole, a synergist of polygodial against filamentous microorganisms. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v.39, p.2290-2292, 1991.
- KUBO, I.; MUROI, H.; HIMEJIMA M. Structure-antibacterial activity relationships of anacardic acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.41, p.1016-1019, 1993.
- KOZLOSKI, G.V. **Bioquímica dos ruminantes**. 3ed. Santa María: UFSM. 2011. 212p.
- LICITRA, G.; HERNANDEZ, T.M.; VAN SOEST, P.J. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v.57, p.347-358, 1996.
- MAZZETTO, S. E.; LOMONACO, D.; MELE, G. Óleo da castanha de caju: oportunidades e desafios no contexto do desenvolvimento e sustentabilidade industrial. **Química Nova**, v. 32, p. 732-741, 2009.
- McINTOSH, F. M.; WILLIAMS, P.L.R.; WALLACE, R.J. et al. Effects of essential oils on ruminal microorganisms and their protein metabolism. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.5011–5014, 2003.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requeriments of dairy cattle**. 7.rev.ed. Washinton, D.C, 2001.
- NOCEK, J.E.; RUSSELL, J.B. Protein and energy as an integrated system: relationship of ruminal protein and carbohydrate availability to microbial synthesis and milk production. **Journal of Dairy Science**, v.71, p.2070-2107, 1988.

- NOGUEIRA, U.T.; MAURÍCIO, R.M.; GONÇALVES, L.C. Comparação de substratos com diferentes quantidades de carboidratos solúveis utilizando a técnica *in vitro* semi-automática de produção de gases. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, p. 633-641, 2006.
- NSAHLAI, I.V.; UMUNNA, N.N.; NEGASSA, D. The effect of multi-purpose tree digesta on *in vitro* gas production from napier grass or neutral-detergent fibre. **Journal of the Science of Food and Agriculture**.v.69, p. 519-528, 1995.
- NUSSIO, L.G.; CAMPOS, F.P.; LIMA, M.L.M. Aditivos In: **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal. 2.ed. Jaboticabal: Funep, 2011, 565-591p.
- OWENS, F.N.; BERGER, W.G. Nitrogen metabolism of ruminant animal:historical perspective, current understanding and future implications. **Journal Animal Science**, v. 57, p. 498-518, 1983.
- PARASA, L.S.; SUNITA T.; RAO K B.; et al. Acetone extract of Cashew (*Anacardium occidentale*, L.) nuts shelliquid against Methicillin resistant Staphylococcus aureus(MRSA) by minimum inhibitory concentration (MIC). **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v.3, p.736-742, 2011.
- PELL, A.N.; SCHOFIELD, P.; STONE, W.C. Rates of digestion of feeds measured *in vitro* with computers. **Proceedings of the Cornell Nutrition Conference**, v.13, p.74-81, 1994.
- PELL, A.N.; DOANE, P.H.; SCHOFIELD, P. **In vitro digestibility and gas production**. In: SIMPÓSIO SOBRE TÓPICOS ESPECIAIS EM ZOOTECNIA, Lavras, MG, p.109 - 132 1997.
- PEREIRA, L.G.R.; BARREIROS, D.C.; OLIVEIRA L.S. et al. Composição química e cinética de fermentação ruminal de subprodutos de frutas no sul da Bahia. **Livestock Research for Rural Development**, v.20, p.1-11, 2008.
- RIBEIRO, M. D.; PEREIRA, J. C.; BETTERO, V. P. et al. Níveis de concentrado na dieta de bezerras. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.1133-1141, 2009.
- SANTOS. F.L.A.P.; PEDROSO, A.M. **Metabolismo de proteínas**. Jaboticabal. 2.ed. Jaboticabal: Funep, 2011, 265-292p.
- SAS Institute. 2009. SAS Proprietary Software, Release 9.2. SAS Inst. Inc., Cary, NC.
- SILVA, C.V.; LANA, R. P.; CAMPOS, J. M.S. et al. Consumo, digestibilidade aparente dos nutrientes e desempenho de vacas leiteiras em pastejo com dietas com diversos níveis de concentrado e proteína bruta. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.1372-1380, 2009.
- SHINKAI, T.; ENISHI, O.; MITSUMORI, M. et al. Mitigation of methane production from cattle by feeding cashew nut shell liquid. **Journal of Dairy Science**, v. 95 p.5308–5311, 2012.
- SLYTER, L.L.; SATTER, L.D.; DINIUS, D.A. Effect of ruminal ammonia concentration on nitrogen utilization by steers. **Journal of Animal Science**, v.48, p.906-912, 1979.
- SNIFFEN, C.J.; O'CONNOR, J.D.; VAN SOEST, P.J; et al. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**, v.70, p.3562-3577, 1992.
- TILLEY, J.M.A.; TERRY, R.A. A two-stage techniques for digestion of forage crops. **Journal of the British Grassland Society**, v. 18, p.104-111, 1963.
- TREI, J.; HALE, W.H.; THEURER, B. Effect of grain processing on *in vitro* gas production. **Journal of Animal Science**, v.30, p.825-831, 1970.
- VALADARES FILHO, S.C. Digestão pós-ruminal de proteína e exigências de aminoácidos para ruminantes. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE

- DIGESTIBILIDADE EM RUMINANTES, 1997, Lavras. **Anais...** Lavras: UFPA - FAEPE, Lavras, 1997. p.87-110
- VAN NEVEL, C.; DEMEYER, D.I. Manipulation of rumen fermentation. In: HOBSON, H.D. (Ed.) **The rumen microbial ecosystem**. New York: Elsevier Science, 1988. p.387-443.
- VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B.; LEWIS, B.A. Symposium: Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.35-83, 1991.
- VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2.ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994. 476 p.
- WALLACE, D. C.; YE, J.H.; NECKELM, S.N. et al. Sequence analysis of cDNAs for the human and bovine ATP synthase beta subunit: mitochondrial DNA genes sustain seventeen times more mutations. **Current Genetics**, v.12, p.81- 90, 1987.
- WATANABE, Y.; SUZUKI, R.; KOIKE, S. et al. *In vitro* evaluation of cashew nut shell liquid as a methane-inhibiting and propionate-enhancing agent for ruminants. **Journal of Dairy Science**, v.93, p.5258–5267, 2010.

VI. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na presente pesquisa, foi demonstrado que a inclusão de 0,5 g/kg do LCC em dietas para ruminantes pode aumentar a digestibilidade *in vitro* da matéria seca, favorecendo o melhor aproveitamento dos nutrientes da dieta, sem prejudicar a produção total de gás nem os parâmetros cinéticos da fermentação ruminal.

Foi evidenciado que a adição do LCC em dietas com altos níveis de concentrado é uma alternativa viável para reduzir a produção de amônia ruminal, podendo ser considerada sua utilização como uma estratégia nutricional para melhorar a utilização da proteína dietética e diminuir eficientemente a poluição ambiental. Por outro lado, a inclusão de LCC pode ser eficaz em manter estáveis as condições de pH ruminal em dietas até com 800 g/kg de concentrado, permitindo a adequada degradação dos alimentos e a utilização de dietas com alto conteúdo de ingredientes concentrados, principalmente a base de milho moído (915 g/kg).

Entretanto, futuras pesquisas são necessárias a fim de elucidar as vantagens de utilizar o LCC na alimentação dos ruminantes, devendo ser demonstrado seu potencial para modificar a fermentação ruminal, sendo recomendado mensurar a produção de metano e propionato, assim como estabelecer o benefício econômico obtido com a inclusão deste óleo na dieta.