

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ – UEM
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO SUSTENTÁVEL E
SAÚDE ANIMAL

Avaliação *in vitro* da associação de quitosana e líquido da casca da castanha de caju como aditivos para ruminantes.

Autora: Daniele Cristina Pereira

UMUARAMA-PR

DEZEMBRO/2018

Autora: Daniele Cristina Pereira

Avaliação *in vitro* da associação de quitosana e líquido da casca da castanha de caju como aditivos para ruminantes.

Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE PRODUÇÃO SUSTENTÁVEL E SAÚDE ANIMAL, no Programa de Pós-Graduação em Produção Sustentável e Saúde Animal da Universidade Estadual de Maringá - Área de concentração: Produção sustentável.

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

Co-orientador: Prof. Dr. Antônio Campanha Martinez

UMUARAMA

Dezembro/2018

FOLHA DE APROVAÇÃO

DANIELE CRISTINA PEREIRA

Avaliação *in vitro* da associação de quitosana e líquido da casca da castanha de caju como aditivos para ruminantes.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Sustentável e Saúde Animal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Veterinária pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Rafael Henrique de Tonissi e Buschinelli de Goes
Universidade Federal da Grande Dourados (Presidente)

Prof. Dr. Jefferson Rodrigues Gandra
Universidade Federal da Grande Dourados (Membro)

Prof. Dr. Mayara Andressa Sabedot
Universidade Federal da Grande Dourados (Membro)

Aprovada em: 13 de dezembro de 2018.

Local da defesa: Sala de reuniões da Faculdade de Ciências Agrárias – UFGD.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Luiz Márcio Pereira e Odilia Barreto, meu noivo Eduardo Presendo e meu irmão Luiz Flavio Pereira pelo incentivo, paciência e amor fornecido nessa trajetória.

DEDICO A VOCÊS ESSA NOVA CONQUISTA!

Agradecimentos

A DEUS, que sempre atendeu as minhas preces, iluminou e abençoou a minha trajetória.

À minha família, pelo incentivo, orientações e por acreditar no meu potencial.

Ao meu noivo Eduardo Presendo, pela paciência e pelo grande exemplo de pessoa e de Médico Veterinário que é.

À Universidade Estadual de Maringá e ao Programa de Pós-Graduação em Produção Sustentável e Saúde Animal, pela realização do projeto.

Ao Prof. Dr. Rafael Henrique de Tonissi e Buschinelli de Goes, pelos ensinamentos, pela paciência e dedicação ao passar conhecimentos.

Ao meu Co-orientador Prof. Dr. Antonio Campanha Martinez, pelo incentivo.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Produção Sustentável e Saúde Animal, pelo ensinamento.

Aos professores, técnicos e alunos da Universidade Federal da Grande Dourados - UFGD, em especial à colega Mariana Viegas dos Santos, que me ajudou muito durante todo experimento.

À todos os colegas de turma e ao meu amigo de graduação e mestrado, Jefferson (Coxinha).

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para realização desse trabalho.

Biografia

DANIELE CRISTINA PEREIRA, filha de Luiz Márcio Pereira e Odilia Barreto, nasceu em Sarandi, Paraná, no dia 27 de agosto de 1992.

Em março de 2011, ingressou no curso de Medicina Veterinária, na Universidade Estadual de Maringá – Campus Umuarama, onde colou grau em abril de 2016.

Em março de 2017, iniciou no Programa de Pós-Graduação em Produção Sustentável e Saúde Animal, em nível de Mestrado, na Universidade Estadual de Maringá, Campus de Umuarama, Paraná, onde desenvolveu estudos na área de nutrição de ruminantes, submetendo-se à defesa da dissertação em dezembro de 2018.

RESUMO

Devido ao uso indiscriminado de antibióticos na alimentação animal, aumentou a preocupação com a produção sustentável sem que ocorresse perda no desempenho dos animais. Estudos mostram que a quitosana (Q) e o líquido da casca de castanha de caju (LCC), tem proporcionado bons resultados quando são utilizados como aditivos na nutrição animal, tornando-se uma alternativa na substituição do uso de ionóforos, como a monensina. Porém, ainda não se tem muitos estudos sobre a associação entre a quitosana e o LCC e quais os benefícios que essa associação pode trazer para a produção animal. O presente trabalho realizou a avaliação *in vitro* da associação entre quitosana e líquido da casca de castanha de caju. Foram quatro tratamentos: Controle, LCC (600mg/Kg de MS), Quitosana (900mg/kg de MS) e LCC (600mg/Kg de MS) + Quitosana (900mg/Kg de MS). Foram analisados na relação de volumoso:concentrado de: 100:0, 50:50, 40:60 e 20:80. Esta avaliação foi realizada através das análises de DIVMS, DIVFDN, DIVPB, pH e NAR. Dois bovinos foram os doadores de líquido ruminal, as coletas ocorreram no período da manhã sempre com os animais em jejum, e logo após a coleta o material foi encaminhado ao laboratório para armazenamento e posterior análise. Nos principais resultados encontram-se a menor digestibilidade de MS, FDN e PB quando associados os dois aditivos, porém, quando os aditivos são usados isoladamente apresentam maior digestibilidade do que quando comparados com o tratamento controle. A associação dos aditivos mostrou resultados positivos no pH e no NAR, mantendo-os na faixa ótima de atividade de microrganismos ruminais até a última coleta de amostras. Esta associação demonstrou que entre os aditivos o líquido da casca da castanha de caju foi o que atuou de forma mais positiva na digestibilidade dos nutrientes.

Palavras-chave: Aditivos naturais, *Anacardium occidentale*, Análise bromatológica, Quitina, Modulação ruminal.

ABSTRACT

Due to the indiscriminate use of antibiotics in animal feed, concern for sustainable production increased without loss of animal performance. Studies have shown that chitosan (Q) and cashew nut liquid (LCC) have provided good results when used as additives in animal nutrition, making it an alternative in the substitution of ionophores such as monensin. However, there are not many studies about the association between chitosan and LCC and what benefits this association can bring to animal production. The present work carried out the in vitro evaluation of the association between chitosan and liquid cashew nuts. The treatments were: Control, LCC (600mg/kg DM), Chitosan (900mg/kg DM) and LCC (600mg/kg DM) + Chitosan (900mg/kg DM). And they were analyzed in the ratio of bulky: concentrate of: 100: 0, 50:50, 40:60 and 20:80. This evaluation was performed through the IVDMD, DIVFDN, DIVPB, pH and NAR. Two cattle were the donors of ruminal fluid, the collections occurred in the morning always with the animal fasting, and soon after the collection the material was sent to the laboratory for storage and later analysis. The main results were the lowest digestibility of DM, NDF and PB when we associated the two additives, however, when the additives are used alone they present higher digestibility than when compared to the control treatment. The association of the additives showed positive results in the pH and NAR, keeping them in the optimum range of ruminal microorganisms activity until the last sample collection. This association also showed that among the additives the cashew nut liquid was the one that most positively influenced the nutrient digestibility.

Key words: Natural additives, *Anacardium occidentale*, Bromatological analysis, Chitin, Ruminal modulation.

LISTA DE FÍGURAS:

- Figura 1:** Incubadora *in vitro* TE – 150 (tecnal®) com capacidade para 4 jarros..... 27
- Figura 2:** Balança analítica utilizada para pesar as amostras de alimentos utilizados no experimento..... 29
- Figura 3:** Material para a coleta de líquido ruminal: Garrafa térmica aquecida e com CO₂, botijão de CO₂, Becker coletor de líquido ruminal e gaze para filtrar o líquido ruminal..... 30
- Figura 4:** Jarros encubados na incubadora *in vitro* TE-150, nos jarros contém as amostras de alimento, inócuo, solução tampão e os tratamentos: controle (1), quitosana (2), líquido da casca da castanha de caju (3) e quitosana + líquido da casca da castanha de caju (4)..... 32
- Figura 5 (A e B):** A: Amostras dos alimentos utilizados no experimento sendo colocados nos jarros. B: Líquido ruminal sendo colocado logo após os alimentos, depois seguiam para a incubação *in vitro*..... 35
- Figura 6:** Coleta de líquido ruminal que acontecia de 2 em 2 horas através da adaptação nas tampas dos jarros.....36
- Figura 7:** Fotografia do pHmetro digital utilizado para aferição do pH das amostras.....37
- Figura 8 (A e B):** A: amostra de nitrogênio amoniacal ruminal na centrifuga. B: sobrenadante das amostras de nitrogênio amoniacal ruminal que sofrerá a destilação..... 38
- Figura 9 (A e B):** A: Amostra no conjunto de destilação do laboratório de nutrição animal. B: Titulação com ácido clorídrico de amostras de NAR depois de passarem pela destilação..... 39
- Figura 10:** Digestibilidade *in vitro* de matéria seca das amostras experimentais..... 41
- Figura 11:** Digestibilidade *in vitro* de proteína bruta das amostras experimentais... 44
- Figura 12:** Valores de pH das amostras experimentais obtidos após coletas nos jarros digestores..... 45
- Figura 13:** Valores de Nitrogênio Amoniacal Ruminal obtidos após coletas nos jarros digestores..... 47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Relação Volumoso:Concentrado.....	27
Tabela 2: Composição química dos alimentos utilizados nas dietas experimentais.	28
Tabela 3: Digestibilidade <i>in vitro</i> de matéria seca das amostras experimentais.....	41
Tabela 4: Digestibilidade <i>in vitro</i> de fibra detergente neutro das amostras experimentais.....	42
Tabela 5: Digestibilidade <i>in vitro</i> de proteína bruta das amostras experimentais.....	43
Tabela 6: Valores de pH obtidos após coletas nos jarros digestores.....	45
Tabela 7: Valores de nitrogênio amoniacal ruminal obtidos após coletas nos jarros digestores.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGV – Ácidos Graxos Voláteis

C – Controle

°C – Graus Celcius

CH₄ – Metano

DIVFDN – Digestibilidade *in vitro* de fibra em detergente neutro

DIVMS – Digestibilidade *in vitro* de matéria seca

DIVPB – Digestibilidade *in vitro* de proteína bruta

dL – Decilitros

FDN – Fibra detergente neutro

g – Gramas

H₂ – Hidrogênio

HCl – Ácido Clorídrico

Kg – Quilogramas

LCC – Líquido da casca de castanha de caju

Mg – Miligramas

mL – Mililitro

MS – Matéria seca

NADH – Nicotinamida adenosina difosfato

NAR – Nitrogênio amoniacal ruminal

N-NH₃ – Nitrogênio amoniacal

PB – Proteína bruta

Q – Quitosana

TNT – Tecido não tecido

V:C – Volumoso:Concentrado.

SUMÁRIO

1. REVISÃO BOBLOGRAFICA.....	15
1.1 Bovinos	15
1.2 Quitosana	16
1.3 Líquido da casca da castanha de caju	18
1.4 Ambiente ruminal	20
1.5 pH ruminal	20
1.6 Amônia e Nitrogênio Amoniacal (N-NH ₃)	22
1.7 Gás metano	23
1.8 Técnica de Avaliação de Digestibilidade	24
4. 8. 1 Técnica Digestibilidade <i>in vitro</i>	24
2. OBJETIVO DA PESQUISA.....	25
2.1. Objetivo Geral.....	25
2.2. Objetivos Específicos.....	25
3. MATERIAL E METODOS.....	26
3.1. Realização do Experimento	26
3.1.1. Parte I do experimento	29
3.1.1.1 Preparo dos Equipamentos	29
3.1.1.2 Coleta do Material	30
3.1.1.3 Digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca	31
3.1.1.4 Determinação de Fibra Detergente Neutro	33

3.1.1.5 Determinação de Proteína Bruta	34
3.1.2 Parte II do Experimento	35
3.1.2.1 Preparação das Amostras e Incubação	35
3.1.2.2 Avaliação de pH ruminal	37
3.1.2.3 Avaliação de nitrogênio amoniacal ruminal	37
3.1.3 Análise estatística	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
5. CONCLUSÃO.....	49
6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	50
7. ANEXOS.....	64
8. NORMAS PARA PUBLICAÇÃO DA REVISTA - RBSPA.....	70
9. ARTIGO SUBMETIDO A REVISTA.....	77

1. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

1.1. Bovinos

Criadores de gado leiteiro passam por uma fase de corte de gastos, visto que o valor do litro de leite cai cada vez mais, em outubro de 2018 este valor foi de R\$ 1,19 (CONSELEITE, 2018), esse corte de gastos também se dá por causa do aumento no custo de produção animal. Entre os custos, a nutrição geralmente é um dos maiores, podendo chegar a até 60% do custo total na propriedade leiteira, (CEPEA, 2015). Com este cenário nada animador, os produtores buscam alternativas para melhorar a produção animal, diminuindo gastos e com isso aumentar a rentabilidade da propriedade.

Dentro da nutrição dos bovinos, o uso de aditivos é uma grande ferramenta para maximizar a produção animal. A Instrução Normativa 13/2004 do ministério da agricultura, pecuária e abastecimento (MAPA, 2004), define aditivos como: substância, micro-organismo ou produto formulado, adicionado intencionalmente aos produtos, que não é utilizada normalmente como ingrediente, tenha ou não valor nutritivo e que melhore as características dos produtos destinados à alimentação animal ou dos produtos animais, melhore o desempenho dos animais sadios ou atenda às necessidades nutricionais.

Os aditivos atuam de várias formas no organismo dos bovinos, entre eles, um dos mais utilizados são os ionóforos, que modulam a fermentação ruminal, fazendo com que diminua o número de bactérias gram positivas e aumente as bactérias gram negativas, melhorando a produção de propionato e diminuindo o ácido acético, láctico e metano (SHINKAI et al., 2012), dessa forma, os animais conseguem diminuir a perda de energia que ocorre principalmente durante a formação do metano (RUSSELL & STROBEL, 1989), além de diminuir as desordens como a acidose ruminal (OWENS et al., 1991).

Porém, após 30 anos de uso, a União Europeia confirmou a proibição dos antibióticos ionóforos na suplementação animal até o final do ano de 2005 (RATCLIFF, 2003), pensando assim em diminuir os riscos de resistência

antimicrobiana que o uso a longo prazo deste aditivo possa trazer a população humana (GUSTAFSON & BOWEN, 1997).

Outro aditivo bastante conhecido são as leveduras, que atuam aumentando o desempenho animal. Elas estimulam bactérias ruminais que alteram a relação acetato/propionato e aumentam o crescimento de bactérias que usam a amônia ruminal (NEWBOLD et al., 1996). Entretanto, existem alguns relatos de intoxicações devido ao uso das leveduras na nutrição animal, principalmente naquelas derivadas da cevada, causada por micotoxinas que se proliferam durante seu armazenamento (HUMPHREYS 1988, GILMOUR et al., 1989, LORETTI et al., 2003, KELLERMAN et al., 2005, BEZERRA Jr et al., 2009b).

1.2. Quitosana

Goiri et al (2009a), recentemente propuseram que fosse feito uso da quitosana como aditivo na nutrição de ruminantes, já que ela atua de forma bem parecida com os antibióticos ionóforos, modulando a fermentação ruminal e maximizando a produção e o desempenho animal, sem que a população humana seja exposta ao possível risco de resistência antimicrobiana causada pelos ionóforos.

A quitina é o segundo polissacarídeo mais abundante da natureza, ficando atrás somente da celulose, a quitosana ou também conhecido como quitosano é um biopolímero natural (N-acetil-D-glicosamina) derivado da desacetilação alcalina da quitina, sendo que, a variação no grau de desacetilação pode levar até a destruição da quitosana quando ele for muito alto (LE DUNG *et al.*, 1994). O grau de desacetilação também pode interferir na sua atividade antimicrobiana (VARUM & SMIDSROD, 2005).

A quitina e a celulose são semelhantes estruturalmente, se diferenciando apenas na substituição dos grupos hidroxilas do carbono-2 presente na unidade de glicose da celulose por grupos acetilados (ANTONINO, 2007).

Goy *et al.* (2004) diferencia a quitosana da quitina pela desacetilação do carbono-2 por grupos aminas, que faz com que a quitosana tenha solubilidade em soluções aquosas de ácidos orgânicos e inorgânicos.

A quitina está presente no exoesqueleto de moluscos, crustáceos, insetos, nematoides e na parede celular de fungos e leveduras, sendo a quitosana então um subproduto da indústria pesqueira (ASSIS & SILVA, 2003). O Japão e os Estados Unidos são os grandes produtores, pesquisadores e consumidores da quitosana (HIRANO & NAGAO, 1989).

Devido a sua baixa toxicidade, baixa ação alergênica, e a sua alta atividade antimicrobiana contra vários tipos de bactérias e fungos, a quitosana tem um papel importante nas indústrias alimentícia e farmacêutica, entre suas aplicações estão: Biofilme comestível para aumentar o tempo de prateleira dos alimentos (AIDER, 2010), meio para liberação de medicação e vacinas, cicatrizantes (LARANJEIRA & FÁVERE, 2009), tratamento de água e dejetos, agricultura e na indústrias têxtil. Além de outras propriedades como, se ligar em células cancerígenas, colesterol e gorduras (MARTHUR; NARANG, 1990; ROBERTS, 1992; KURITA, 1986).

Na medicina veterinária a quitosana foi primeiramente utilizada em bandagens, curativos, tratamento para cicatrização de feridas infectadas (SENEL *et al.*, 2004) e na prevenção de mastite em vacas de aptidão leiteira (MOON *et al.*, 2007). Para a nutrição animal ela vem de forma a atuar na modulação da fermentação e digestão ruminal, melhorando o desempenho animal e sendo um possível substituto aos antibióticos promotores de crescimento (GOIRI *et al.*, 2009a). Além de serem necessárias doses mínimas de quitosana para inibir a ação de determinados grupos de bactérias, sendo essa uma vantagem para utilizá-la como aditivo (TANG *et al.*, 2010).

Sua principal atividade é a ação antimicrobiana contra as bactérias gram positivas, não interferindo tanto nas bactérias gram negativas, e essa atividade atinge seu pico em pH baixo (SENEL *et al.*, 2004). Segundo Begin & Calsteren (1999), as cargas positivas da quitosana interagem com as cargas negativas presentes na superfície de bactérias, possivelmente competindo com íons de cálcio por sítios negativos e assim levando a quebra da membrana da bactéria.

Mingoti (2013), realizou estudos com bovinos da raça holandesa, alimentados com volumoso e concentrado na proporção de 50:50, onde administrou doses crescentes de quitosana (0, 50, 100 e 150 mg/kg de peso corporal), e observou que houve um aumento na digestibilidade da proteína bruta. Goiri et al. (2009^a; 2009^b) também observaram aumento na digestibilidade da proteína bruta da dieta, que possivelmente seja um mecanismo de ação da quitosana no intestino no animal.

Estudos indicam que o uso de quitosana na suplementação animal faz com que se eleve a razão propionato:acetato, tornando as rotas de fermentação ruminal mais eficientes e disponibilizando mais glicose ao animal. Além da diminuição da perda de energia na forma de gás, já que a produção de metano cai, e conseqüentemente reduz a concentração de poluentes eliminada pelos ruminantes (RENNÓ, et al., 2011; PAIVA, 2015).

1. 3 Líquido da casca da castanha de caju

O Brasil é o segundo maior produtor de caju (*Anacardium occidentale* L.), ficando atrás apenas da Índia. Sua produção está concentrada no nordeste brasileiro, gerando emprego e renda para a região (GUANZIROLI et al., 2009). Do cajueiro é obtido o mesocarpo e a castanha (que contém a amêndoa), da onde é retirado um líquido, chamado de líquido da Casca da Castanha de Caju (LCC). O LCC é de cor escura, aspecto viscoso e cáustico (BRUCE et al., 1990; WASSSERMAN et al., 1948). As principais aplicações do LCC são em tintas, vernizes, resinas, materiais elétricos, isolantes, adesivos, lubrificantes, aditivos, antissépticos, vermífugos (Wallace, 2004; LUBI & THACHIL, 2000), inseticidas, fungicidas, antioxidantes, cosméticos e medicamentos (ANDRADE et al., 2011).

Para se obter o LCC é preciso realizar uma extração mecânica, logo depois é aquecido a 140°C, com agitação, sofrendo descarboxilação e retirando o CO₂ e água (LUBI & THACHIL, 2000). Esse conteúdo é filtrado, armazenado e passa a ser chamado LCC térmico, que por sua vez, não possui cheiro forte, é atóxico e tem baixa volatilização (AMORATI et al., 2001; MAZZETTO et al., 2009).

O LCC é descrito como óleo funcional, que além de suas propriedades energéticas pode apresentar outras funções, como anti-inflamatório, antioxidante ou antimicrobiano (CHAO, 2000; AMORATTI et al., 2001). Ele se destaca principalmente pela sua ação antimicrobiana, podendo ser um possível substituto aos antibióticos ionóforos. Nas últimas décadas ele vem sendo utilizado na alimentação animal (BEES et al., 2012).

A sua ação antimicrobiana é principalmente em bactérias gram-positivas, do mesmo modo que a quitosana, visto que as bactérias gram-negativas possuem uma proteção extra, uma camada de lipossacarídeos que formam uma superfície hidrofílica, diminuindo a permeabilidade a substâncias hidrofóbicas como o LCC (BURT, 2004).

Estudos *in vitro* realizado por Parasa et al., (2011) sobre a ação antimicrobiana do LCC confirmam que bactérias gram-positivas como *Staphylococcus aureus* e *Propionibacterium acnes* são afetadas mais facilmente do que as bactérias gram-negativas.

Com a redução das bactérias gram-positivas pode acontecer o crescimento, mesmo que indiretamente, de bactérias gram-negativas (*Succinivibriodextrinosolvens*, *Selenomonas ruminantium* e *Megasphaera elsdenii*), essas bactérias são produtoras de propionato, fazendo com que seus níveis aumentem e assim ocorra a diminuição da metanogênese (WATANABE et al., 2010). McGinn et al. (2004) realizaram um estudo onde foi observado 22% de redução na emissão de gás metano em novilhas que receberam o LCC.

Estudos apontam que a utilização de óleos funcionais como o LCC levam a melhorias na nutrição, modulação ruminal e melhora no desempenho de bovinos de corte e leite, ovinos e caprinos (YANG et al., 2010; GERACI et al., 2012; ANASSORI et al., 2011; TAGER & KRAUSE, 2011; TEKIPPE et al., 2011), e isso ocorre devido a sua composição: ácido anacárdico (30%), que tem atividade antimicrobiana e age da mesma forma que os ionóforos monovalentes, o cardanol (50%) que atua como anti-inflamatório e antioxidante e o cardol (10%) (CORREIA et al., 2006; WATANABE et al., 2010).

Segundo Platel & Srinivassan (1996), os óleos funcionais podem levar ao aumento de secreção salivar, suco gástrico e pancreático. Ele pode ser oferecido

para ruminantes como aditivo tranquilamente, pois é considerado uma substância segura e que não causa danos à saúde do homem, sendo aprovado pela *Food and Drug Administration* (BAKKALI et al., 2008). Porém, uma precaução a ser tomada é na quantidade que é oferecido ao animal, pois em doses altas ele vai reduzir a digestibilidade de nutrientes e a produção de ácidos graxos de cadeia curta (BEAUCHEMIN & MCGINN, 2006; YANG et al., 2010), e isso pode levar ao efeito contrário do esperado.

1.4 Ambiente ruminal

Segundo Kozloski (2002), o rúmen é um ambiente diverso e único, onde vivem três tipos de microrganismos, as bactérias, que constituem de 60 a 90% de toda população microbiana (cerca de 200 espécies), os protozoários e os fungos. Esses microrganismos agem fermentando partes ou componentes dos alimentos, que geram subprodutos como ácidos graxos voláteis (AGV), proteínas e vitaminas. Lima et al. (2008) afirmam que a quantidade de subprodutos formada no rúmen depende do alimento ingerido pelo ruminante, da forma como ele é oferecido na alimentação, além de se levar em conta a fisiologia ruminal (temperatura, anaerobiose, pH) de cada animal.

Além disso, no rúmen também são formados subprodutos que não são aproveitados pelos animais, como o metano (CH₄) e o gás carbônico (CO₂), que são perdidos via eructação, levando a uma perda energética (VAN SOEST, 1994). Segundo Johnson & Johnson (1995), é a digestibilidade quem determina o tipo de produto gerado na fermentação microbiana.

1.5. pH Ruminal

Na busca de ruminantes de alto rendimento, que precisam de mais nutrientes para se manter e sustentar os elevados índices de produção, a alimentação se baseia em maiores teores de concentrado em relação ao volumoso. Visto que, o volumoso manifesta menor concentração de nutrientes e menor taxa de degradação, o que diminui a ingestão de alimentos (JUNG & ALLEN, 1995).

Porém, os elevados teores de concentrado na dieta animal podem levar ao surgimento de disfunções digestivas, que diminuem a produção e causam o comprometimento da saúde animal, podendo em casos mais graves levar a morte (MERTENS, 1997). O pH do rúmen é fortemente influenciado pela variedade de alimento consumido, e quem é responsável por estabilizar o pH no rúmen e evitar algumas disfunções digestivas é a saliva, que age como um tamponante (OWENS e GOETSCH, 1988; VAN SOEST, 1994).

O aumento na produção de saliva acontece depois de estímulos causados principalmente por partículas de alimentos fibrosos que chegam a parede do rúmen, pela mastigação e pela ruminação (HARFOOT, 1981; HOOVER e STOKES, 1991). Outra forma de estabilizar o pH é a absorção de ácidos graxos voláteis no rúmen e a produção de sais a base de carbonato (VAN SOEST, 1982).

Segundo Ørskov (1986), a queda do pH acontece logo após a rápida digestão do alimento, e pode atingir o seu valor mais baixo entre 30 minutos e 4 horas após a alimentação. Com os elevados índices de concentrado na alimentação, os ruminantes podem expressar alguns problemas, como a dificuldade na secreção de saliva para manter o pH ótimo (entre 6 e 7).

Com a queda do pH também ocorre a diminuição na digestão de proteína, celulose, hemicelulose, pectina e em menor quantidade do amido (HOOVER & STOKES, 1991). Além da diminuição da síntese de proteína microbiana em pH menor que 6 (STROBEL & RUSSELL, 1986). Ørskov (1988), afirmou que, casos em que o pH chega a 6,2, ocorre uma diminuição na digestão de fibra, causada pela sensibilidade das bactérias fibrolíticas que “trabalham” melhor em condições de pH entre 6,7 e 7,1. Quando o pH fica menor que 6, há um aumento no tempo de colonização das bactérias na fibra do alimento e conseqüente diminuição na degradação da fibra (VAN SOEST, 1994).

Todos os microrganismos que vivem no rúmen precisam de uma faixa ideal de pH para sua sobrevivência. Devido a anatomia do trato digestivo dos ruminantes e a simbiose dos microrganismos, eles conseguem aproveitar de melhor forma os nutrientes presentes na alimentação. A simbiose da microbiota ruminal é mantida pelo pH. Para que o rúmen tenha uma boa fermentação, e uma alta eficiência microbiana, é preciso disponibilidade de proteína, energia, temperatura e pH. Além disso, outras razões como o tipo de alimento, relação concentrado:volumoso, quantidade de tratos durante o dia e temperatura da água consumida, podem alterar o pH ruminal e diminuir a eficiência microbiana em aproveitar os alimentos (MOULD & ORSKOV, 1983).

1.6. Amônia e Nitrogênio Amoniacal (N-NH₃)

De grande importância para o ambiente ruminal, o N-NH₃ é consumido pelos microrganismos ruminais como fonte de nitrogênio para a síntese proteica. A amônia é a principal fonte de nitrogênio na síntese proteica de bactérias fermentadoras de carboidratos estruturais (RIBEIRO et al., 2001). A quantidade de N-NH₃ presente no rúmen varia conforme a taxa de degradação do alimento ingerido, da fonte proteica e do seu aproveitamento por parte dos microrganismos que vivem no rúmen (MANELLA et al., 2003).

Segundo Firkins (1996) é fundamental que exista um equilíbrio no rúmen entre a quantidade de nitrogênio e energia para que ele consiga maximizar a produção de proteína. E também, as bactérias conseguem utilizar os aminoácidos para síntese de proteína microbiana e do mesmo modo fermentá-los para serem consumidos como fonte de energia (RIBEIRO et al., 2001). Além do mais, a disponibilidade de proteína e energia no rúmen é de enorme relevância para a síntese microbiana, já que as bactérias possuem em média 50% de proteína, 20% de RNA, 18% de carboidratos, 9% de lipídeos e 3% de DNA (NOCEK e RUSSELL, 1988).

O tipo de alimento consumido tem influência na concentração de nitrogênio amoniacal, quando esses alimentos apresentam maiores quantidades de nitrogênio

não proteico ou proteínas solúveis, os níveis de amônia e aminoácidos no líquido ruminal aumentam (RUSSEL et al., 1992; SILVEIRA et al., 2006). Forrageiras de inverno apresentam maior digestibilidade e elevados teores de nitrogênio degradável, que conseqüentemente aumentam a disponibilidade de nitrogênio do rúmen (SILVEIRA et al. (2006). Por outro lado, as forrageiras tropicais apresentam menores quantidades de proteína (<7%) e conseqüentemente é menor a quantidade de amônia presente no rúmen após a ingestão delas (KABEYA et al., 2002).

Para que se consiga a manutenção basal do rúmen é preciso no mínimo 5 mg/dL de nitrogênio amoniacal (SATTER & SLYTER, 1974) e para a máxima eficiência é preciso 23 mg/dL de nitrogênio amoniacal (MEHREZ et al, 1977).

Manella et al., (2003) realizaram estudos em bovinos na fase de recria, recebendo pastagem de *Brachiaria brizantha*, ou suplementação proteica ou acesso a bancos de proteína (*Leucaena leucocephala*), para observar as características da fermentação ruminal, ele observou maiores concentrações de N-NH₃ nos tratamentos em que os animais foram suplementados com proteína (7,4 mg/dL), do que os tratamentos em que os animais foram mantidos somente em pastejo (2,0 mg/dL) ou o tratamento em que o animal tinha acesso ao banco de proteína (1,3 mg/dL).

Carvalho et al. (1997b), sugere que as quantidades necessárias de amônia são diferentes, em casos de digestão de fibras ingeridas na dieta é preciso maiores quantidades, comparado aos casos de crescimento bacteriano, que não precisam de grandes quantidades de amônia para se chegar a sua elevada eficiência. Nrc (1996), comenta que para a síntese de proteína é necessário a mesma quantidade de proteína degradada no rúmen, indicando que a reciclagem e a absorção de amônia podem ser diminuídas se a dieta estiver balanceada.

1.7. Gás Metano (CH₄)

Segundo Valadares filho & Pina (2006) a concentração de CH₄ no rúmen pode chegar a 40% e a de CO₂ pode chegar a 60%. A produção de metano sofre

influência da quantidade de bactérias, nicotinamida adenosina difosfato (NADH) e H₂ que se encontram no rúmen, além de ser influenciada pela alimentação.

Dietas com maior teor de fibras favorecem o desenvolvimento de bactérias fibrolíticas, que elevam a produção de acetato e butirato, causando a liberação de maiores quantidades de H₂, que ficam disponíveis para as bactérias metanogênicas produzirem gás metano (NUSSIO et al., 2006).

Alguns aditivos, como a quitosana e o LCC se mostram bastante promissores na diminuição da perda de energia na forma de gás, já que eles diminuem a produção de metano e a concentração de poluentes que são eliminados pelos ruminantes (RENNÓ, et al., 2011; PAIVA, 2015).

1.8. Técnica de Avaliação de Digestibilidade

Com o objetivo de maximizar a qualidade da suplementação, diminuir os custos, e analisar novos possíveis aditivos na alimentação de ruminantes, as indústrias de nutrição, assim como as entidades de pesquisa e universidades, fazem o uso de técnicas de avaliação de alimentos.

Para se analisar alimentos é preciso o uso de técnicas eficientes e seguras, que ajudem a trazer dados coerentes, confiáveis e facilite a pesquisa (MERTENS, 2005). Na avaliação de digestibilidade é bastante comum se fazer uso da técnica *in vitro*:

1.8.1. Técnica Digestibilidade *in vitro*

É considerado o método padrão de digestibilidade *in vitro* o proposto por Tilley e Terry (1963), essa técnica é composta de duas etapas: 1ª Incubação de amostras individuais do conteúdo ruminal e solução tampão, e a 2ª após 48 horas de incubação do resíduo é adicionado pepsina para que aconteça a digestão em meio ácido (TILLEY & TERRY, 1963). Para realização dessa técnica é necessário um

bovino fistulado provido de cânula ruminal, que será o animal doador de líquido ruminal.

A técnica consiste em deixar os saquinhos de TNT (tecido não tecido – 100g/m²) contendo as amostras dos alimentos que serão analisados em contato com o líquido ruminal (inócuo), reproduzindo o processo de fermentação ruminal que ocorre no animal *in vivo* (temperatura, pH, solução tampão, anaerobiose e microrganismos), durante 48 horas (SILVA & QUEIROS, 2002).

Segundo Mizubuti et al., (2009), a técnica de digestibilidade *in vitro* de matéria seca traz resultados bastante específicos, visto que ela simula um meio anaeróbico idêntico ao rúmen, onde ocorre degradação de nutrientes e ação enzimática de forma bastante parecida com a que ocorre *in vivo*.

Porém, alguns fatores devem ser levados em consideração para que não afetem os resultados esperados, como a fibra fornecida ao animal doador de líquido ruminal, o tamanho da partículas de amostras e o pH do inócuo, já que os microrganismos são sensíveis a pequenas variações de pH (CHERNEY et al., 1993).

2. OBJETIVO DA PESQUISA

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a inclusão do líquido da castanha de caju e da quitosana isoladamente ou em associação sobre a digestibilidade *in vitro* de nutrientes de diferentes dietas.

2.2. Objetivos Específicos

Avaliar a Digestibilidade *in vitro* da matéria seca e de nutrientes de diferentes dietas com a adição de quitosana.

Avaliar a Digestibilidade *in vitro* da matéria seca e de nutrientes de diferentes dietas com a adição de líquido da casca de castanha de caju.

Avaliar a Digestibilidade *in vitro* da matéria seca e de nutrientes de diferentes dietas com a associação de quitosana e líquido da casca da castanha de caju.

Avaliar o pH e a concentração de nitrogênio amoniacal do líquido ruminal *in vitro* de diferentes dietas com a adição de quitosana e LCC como moduladores da fermentação ruminal

Observar se a associação da quitosana e do líquido da casca de castanha de caju poderá trazer benefícios para a nutrição animal.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Realização do Experimento

O experimento foi realizado em duas partes, que foram conduzidas nas dependências do laboratório de Avaliação de Co-Produtos de Oleaginosas (LACO – IMPAC 2 – FINEP/UFGD) e no Laboratório de Nutrição Animal (LANA) da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, Estado de Mato Grosso do Sul. Conforme normas da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), pertencente à Universidade Federal da Grande Dourados, protocolo nº 023/2015 – CEUA/UFGD.

No laboratório continham duas incubadoras *in vitro* TE – 150 (Tecnal®) com capacidade para 4 jarros cada (Figura 1), além de todos os outros materiais necessários como: balança analítica, termômetro, pHmetro, CO₂ e garrafas térmicas.

Como doadores de líquido ruminal foram utilizados 2 bovinos adultos, machos, castrados, mestiços, com peso médio de 350 kg, providos de cânula ruminal, mantidos em baia individual (3x6m). Os tratamentos eram constituídos de 4 dietas associadas com 4 aditivos, totalizando 16 tratamentos (4X4=16). As dosagens do tratamento utilizadas foram: Controle (sem adição de aditivos), LCC (600mg/Kg de MS), Quitosana (900mg/Kg de MS), e o LCCQ (600mg/Kg de MS de LCC + 900mg/Kg de MS de quitosana).



Figura 1: Incubadora *in vitro* TE – 150 (Tecnal®) com capacidade para 4 jarros (Fonte: Acervo da autora, 2018).

Como volumoso utilizou-se feno de Tifton 85 e como concentrado utilizou-se milho (60%) e farelo de soja (40%), em 4 relações volumoso:concentrado (100:0, 50:50, 40:60 e 20:80) (Tabela 1). Realizou-se a análise bromatológica dos alimentos utilizados no experimento (Tabela 2).

Tabela 1. Relação Volumoso:Concentrado

Relação V:C	Feno	Milho	Soja
100:0	0,50g	0g	0g
50:50	0,25g	0,15g	0,10g
40:60	0,20g	0,18g	0,12g
20:80	0,10g	0,24g	0,16g

Tabela 2. Composição química dos alimentos utilizados nas dietas experimentais

Alimento	MS	CZ (%MS)	PB (%MS)	FDN (%MS)	FDA (%MS)	EE (%MS)
Feno	86,81	10,13	13,03	86,21	25,33	2,86
Milho	74,74	2,74	10,50	71,14	5,87	30,07
Farelo de Soja	77,60	7,74	40,16	48,27	17,18	17,28

MS = Matéria Seca, CZ = Cinzas, PB = Proteína Bruta, FDN = Fibra em Detergente Neutro, FDA = Fibra em Detergente Ácido e EE = Extrato Etéreo.

Foi utilizada a metodologia descrita por Tilley & Terry (1963) modificada por Holden *et al.* (1999) para determinar a digestibilidade *in vitro* de matéria seca (DIVMS), onde é manipulado um rúmen artificial (incubadora *in vitro* TE – 150 Tecnal®), baseando-se na técnica de inoculação de substratos em saquinhos de TNT, permitindo a avaliação de grandes quantidades de amostras de uma única vez.

As análises realizadas na primeira parte foram as seguintes: Determinação de matéria seca (método 930.15; AOAC, 2000); proteína bruta utilizando a técnica Kjeldahl de destilação (método 954.01: AOAC, 2000) e fibra detergente neutro (VAN SOEST, 1963; 1991). Na segunda parte foram realizados a mensuração do pH com a utilização do pHmetro digital e coleta de material para análise de nitrogênio amoniacal ruminal (NAR) pela técnica de micro-Kjeldahl, com a adição de hidróxido de potássio, segundo metodologia descrita por Detmann *et al.* (2012). Para a coleta das amostras foi realizado nas tampas dos jarros incubados uma adaptação com válvulas e um sistema de três vias, tipo Bussen, que permitia a liberação dos gases produzidos durante a fermentação (DIAZ, 2013), e com uma seringa de 20mL eram puxados 10mL do inócuo que seguiam para potes contendo 1mL de ácido clorídrico.

A confecção de saquinhos de tecido não tecido (TNT – 100g/m²) foi realizada conforme descrito por Casali *et al.* (2008), onde eles eram cortados e selados no tamanho de 5,0 x 5,0 cm, depois eram pré lavados em acetona durante 3 a 5 minutos para remover um surfactante que possa dificultar a digestão microbiana, então eram secos completamente e pesados em balança analítica. Em seguida a balança era zerada (tara) e era pesado 0,5g de amostra, moída em peneira de crivo de 2mm, respeitando a relação V:C (100:0, 50:50, 40:60 e 20:80) (Figura 2). Todos

os saquinhos eram selados e identificados, para serem colocados nos jarros de digestão da incubadora in vitro TE – 150 (Tecnal®).



Figura 2: Balança analítica utilizada para pesar as amostras de alimentos utilizados no experimento (Fonte: Acervo da autora, 2018).

3.1.1. Parte I do experimento

3.1.1.1 Preparo dos equipamentos

Utilizou-se o delineamento em blocos ao acaso em arranjo fatorial 4X4 (4 dietas X 4 aditivos) na parte I do experimento e na parte II o arranjo de parcelas subdivididas (onde a parcela é a dieta e a subdivisão são os tempos de coleta).

As duas incubadoras eram ligadas previamente (temperatura e rotação) para que mantivessem a estabilidade de temperatura dos jarros de digestão (39°C – 41°C). As soluções tampão também foram mantidas na temperatura de 39°C no banho-maria e as garrafas térmicas e os beakers também foram pré-aquecidos a uma temperatura próxima a 39°C para a coleta de líquido ruminal.

Para as incubações utilizaram-se as soluções tampão de Kansas (MARTEN & BARNES, 1980; SILVA & QUEIROZ, 2002), que foram preparadas da seguinte forma: Solução A (gramas/L): 10,0g KH_2P_0_4 ; 0,5 g $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5 g NaCl; 0,1 g $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,5 g ureia, e a solução B (gramas/100mL): 15,0 g Na_2CO_3 ; 1,0 g $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$. Antes da incubação a solução B era misturada na solução A na relação 1:5 até a solução A atingir o pH de 6,8 e sempre na temperatura constante de 39°C.

3.1.1.2 Coleta do material

Foram coletados dois litros de líquido ruminal por animal, sempre no período da manhã, antes da primeira refeição, via cânula ruminal, com o Becker. Logo em seguida ele era filtrado em quatro camadas de gaze e despejado em uma garrafa térmica previamente aquecida, purgada com CO_2 para manter o ambiente anaeróbico durante o transporte e fechada hermeticamente (Figura 3). No laboratório o material coletado foi homogeneizado para ser utilizado nas incubações.



Figura 3: Material para a coleta de líquido ruminal: Garrafa térmica aquecida e com CO_2 , botijão de CO_2 , becker coletor de líquido ruminal e gaze para filtrar o líquido ruminal (Fonte: Acervo da autora, 2018).

3.1.1.3 Digestibilidade *in vitro* de matéria seca

Para iniciar a incubação foi retirado da incubadora um jarro por vez, onde foram colocados 16 saquinhos de tecido não tecido (TNT – 100g/m²), sendo 4 saquinhos de cada relação volumoso:concentrado, distribuídos de forma aleatória nos dois lados da divisória do jarro, foram colocados também mais 2 saquinhos sem amostras (branco), em seguida foram adicionados a solução tampão (1600ml) e o líquido ruminal (400ml), aplicando o CO₂ durante trinta segundos e fechando a tampa do jarro, que voltava para a incubadora.

Cada jarro continha todas as relações V:C, em quatro repetições e em cada um foi aplicado um tratamento, o primeiro jarro era o controle (C), neste não continha nenhum aditivo, no segundo foi adicionado 0,11g de quitosana (Q), no terceiro 0,08g de líquido da casca da castanha de caju (LCC) e no quarto jarro foi adicionado 0,11g de quitosana e 0,08g de líquido da casca da castanha de caju (Q+LCC) (Figura 4).

A quitosana utilizada tinha grau de desacetilação >850g/kg, 0,32g/ml de densidade, pH 7,90, <200cPs de viscosidade, cinza total de 1,35g/100g e perda na secagem de 9,3g/100g. Ela foi adquirida da empresa Polymar[®], Fortaleza, Ceará, Brasil.

O líquido da casca da castanha de caju utilizado apresentou a seguinte composição, cardanol (73,3%), cardol (16,4%) e 2-metilcardol (3,0%) e foi fornecido pela empresa Usibras, situada na cidade de Aquiraz, estado do Ceará, Brasil.

A incubação foi realizada em dois estágios, sendo o primeiro descrito como fase fermentativa, onde ocorreu a digestão ruminal, com a duração de 48 horas sob temperatura (39°C – 41°C) e rotação contínua. Logo após, se iniciou a segunda fase, chamada de fase química, simulando a digestão no abomaso (em meio ácido), onde cada jarro foi retirado da incubadora e adicionado 40 mL de ácido clorídrico (HCL 6N) e 8 gramas de pepsina (Sigma 1:10000) e logo em seguida voltavam para a incubação, esse procedimento se repetiu em todos os jarros, conforme descrito por Holden (1999). A incubação continuou por mais 24 horas sob temperatura e agitação contínua. Ao fim da incubação, todos os saquinhos foram retirados dos jarros e

lavados em água corrente, e seguiam para a secagem em estufa (55°C), e depois de 12 horas foram pesados.

Para se obter a digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS), foi utilizado o cálculo da diferença da quantidade de nutrientes da amostra antes e depois da incubação, assim como foi feito também para a fibra detergente neutro (DIVFDN) e proteína bruta (DIVPB).



Figura 4: Jarros incubados na incubadora *in vitro* TE-150, nos jarros contém as amostras de alimento, inócuo, solução tampão e os tratamentos: controle(1), quitosana(2), líquido da casca da castanha de caju(3) e quitosana + líquido da casca da castanha de caju(4) (Fonte: Acervo da autora, 2018).

O cálculo para DIVMS é utilizando o resíduo final da incubação, pela seguinte fórmula (ANKON, 2017):

$$DIVMS = \frac{A - (B - Br) \times 100}{A}$$

Onde: A é a matéria seca inicial = peso da amostra x 2ªMS/100; B: é a matéria seca residual = peso do saquinho com resíduo seco – peso do saquinho – Br; e Br é o branco, que consiste em saquinhos vazios.

3.1.1.4 Determinação de fibra detergente neutro

A fibra é um componente estrutural, que forma a parede celular de plantas e apresenta alta resistência e baixa solubilidade em meio aquoso. É ela quem auxilia no processo de ruminação, mantendo as funções normais dos ruminantes. Para determinação de fibra detergente neutro foi utilizado uma solução detergente neutra que dissolve as substâncias mais facilmente digeridas e o conteúdo celular das plantas, como as proteínas, carboidratos e lipídios, restando apenas o resíduo fibroso (parede celular) que é constituído de celulose, hemicelulose, lignina e proteína lignificada.

Após a determinação de DIVMS parte dos saquinhos foram para a determinação de FDN, no determinador de fibra TE – 149 (Tecnal®). Utilizou-se metade dos saquinhos, 8 saquinhos de cada jarro, sendo 2 saquinhos de cada relação V:C de cada tratamento (C, Q, LCC e Q+LCC).

As amostras passaram por uma lavagem, ficando imersos em uma solução de detergente neutro aquecida a 95°C durante uma hora. Os saquinhos foram então lavados duas vezes com água destilada quente e uma vez com acetona, esperou-se a secagem dos saquinhos em temperatura ambiente até a evaporação da acetona e

logo depois seguiram para a estufa a 105°C por 12 horas, para se determinar DIVFDN através da diferença dos pesos do saquinho.

3.1.1.5 Determinação de proteína bruta

Para a determinação de proteína bruta foi utilizada a outra metade dos saquinhos (oito de cada jarro), que foram abertos e seu conteúdo foi transferido para os tubos de digestão e submetidos ao método de Kjeldahl (digestão, destilação e titulação). Este método determina o nitrogênio presente na matéria orgânica da amostra, incluindo o nitrogênio proteico propriamente dito e outros compostos nitrogenados não proteicos. Ele se fundamenta numa digestão ácida, onde o nitrogênio da amostra é transformado em amônio (NH_4^+), separado por destilação e por fim é titulado.

Após a transferência das amostras para os tubos de digestão, foi adicionado também 2 gramas de mistura digestora ($\text{K}_2\text{SO}_4 + \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} + \text{Se}$) e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado, os tubos foram levados para a capela de exaustão de gases em placas digestoras e gradativamente alcançaram a temperatura de 350°C. Após a digestão as amostras apresentaram a coloração verde claro, indicando a transformação do nitrogênio em amônio. Logo que saem da placa digestora, as amostras são resfriadas com água destilada e seguiram para a destilação.

O tubo segue para o conjunto de destilação, lá sofre a adição de NaOH (Hidróxido de sódio), que junto com a amostra é destilado em erlenmeyer de 125 mL contendo 20 mL de ácido bórico e vermelho de metila (cor rosa), o volume total do destilado foi de 50 mL em todas as amostras e a coloração dele passou para verde claro. Em seguida o destilado sofre titulação com HCl até a viragem do indicador que acontece quando a mistura de cor verde claro volta para o rosa. O cálculo da % de nitrogênio da amostra é obtido pela fórmula a seguir:

$$\% \text{ de } N = \frac{\text{V. N. f. 14. 100}}{\text{peso da amostra (mg)}}$$

3.1.2. Parte II do experimento

3.1.2.1 Preparação das amostras e incubação

A segunda parte do experimento foi conduzida em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 4x4, em que as relações volumoso:concentrado e os tratamentos foram os mesmos utilizados na parte I.

As incubações *in vitro* foram realizadas de forma isolada, onde cada jarro recebeu uma combinação de volumoso:concentrado (100:0, 50:50, 40:60 e 20:80) juntamente com o aditivo (C, Q, LCC e Q+LCC) para posterior determinação de pH, nitrogênio amoniacal ruminal (NAR) e coleta de material para uma possível análise de ácidos graxos voláteis.

As amostras de cada relação concentrado:volumoso foram colocadas nos jarros juntamente com as doses de aditivos e a solução, que por sua vez, foram calculados com base na quantidade final de amostra coletada ao longo do dia (Figura 5 A e B).

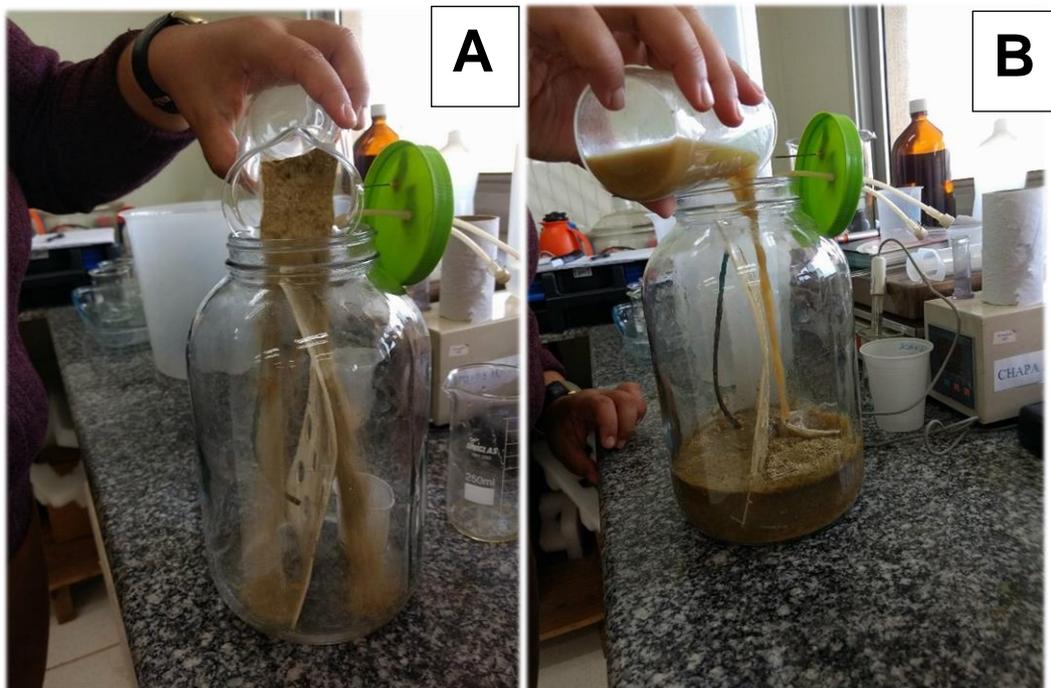


Figura 5: **A:** Amostras dos alimentos utilizados no experimento sendo colocado nos jarros. **B:** Líquido ruminal sendo colocado logo após os alimentos, depois seguem para a incubação *in vitro* (Fonte: Acervo da autora, 2018).

Para a coleta das amostras foi realizado nas tampas dos jarros incubados uma adaptação com válvulas e um sistema de três vias, tipo Bussen, que permitia a liberação dos gases produzidos durante a fermentação (DIAZ, 2013).

Durante a incubação as amostras foram coletadas em intervalos de 2 horas, iniciando no tempo 0 (zero), seguidas do tempo 2, 4, 6 e 8, totalizando 5 coletas ao longo do dia (Figura 6), este procedimento foi realizado em todas as incubações. Em cada coleta foi retirado 30 mL de líquido ruminal tamponado, desses, 10 mL foram utilizados imediatamente após a coleta para mensurar o pH, com a ajuda de um pHmetro digital, outros 10 mL foram colocados em potes plásticos contendo 1 mL de ácido clorídrico (HCL) 1:1, que interrompe a fermentação e reduz pH, evitando a volatilização do NAR. E os últimos 10 mL foram colocados em potes plásticos, refrigerados e posteriormente congelados para uma futura determinação de ácidos graxos voláteis.



Figura 6: Coleta de líquido ruminal que acontecia de 2 em 2 horas através das adaptação nas tampas dos jarros. (Fonte: Acervo da autora, 2018)

3.1.2.2 Avaliação de pH ruminal

Para avaliação do pH ruminal foram coletadas amostras de 10 mL de líquido ruminal nos tempos 0 (logo após a incubação), 2, 4, 6, e 8. O pH era observado imediatamente após a coleta em pHmetro digital (Figura 7).



Figura 7: Fotografia do pHmetro digital utilizado para aferição do pH das amostras (Fonte: Acervo da autora).

3.1.2.3 Avaliação de nitrogênio amoniacal ruminal (NAR)

Para determinação dos teores de NAR, realizada no destilador de nitrogênio modelo SL – 74 (SOLAB®), as amostras sofreram centrifugação prévia a 3.000 r.p.m durante 15 minutos, em duplicata, em seguida foram coletados 2 mL do sobrenadante (Figura 8 A e B) e colocados no tubo de digestão; adicionaram-se 20 mL de água destilada e 5 mL de hidróxido de potássio (KOH) em cada tubo, que

seguiram para o destilador (Figura), o destilado foi recebido no erlenmeyer de 250 ml, contendo 10 ml de ácido bórico 2% e 3 gotas de vermelho de metila, até completar 50 ml e foi realizada a titulação com ácido clorídrico na concentração 0,005 mol/L (Figura 9 A e B).

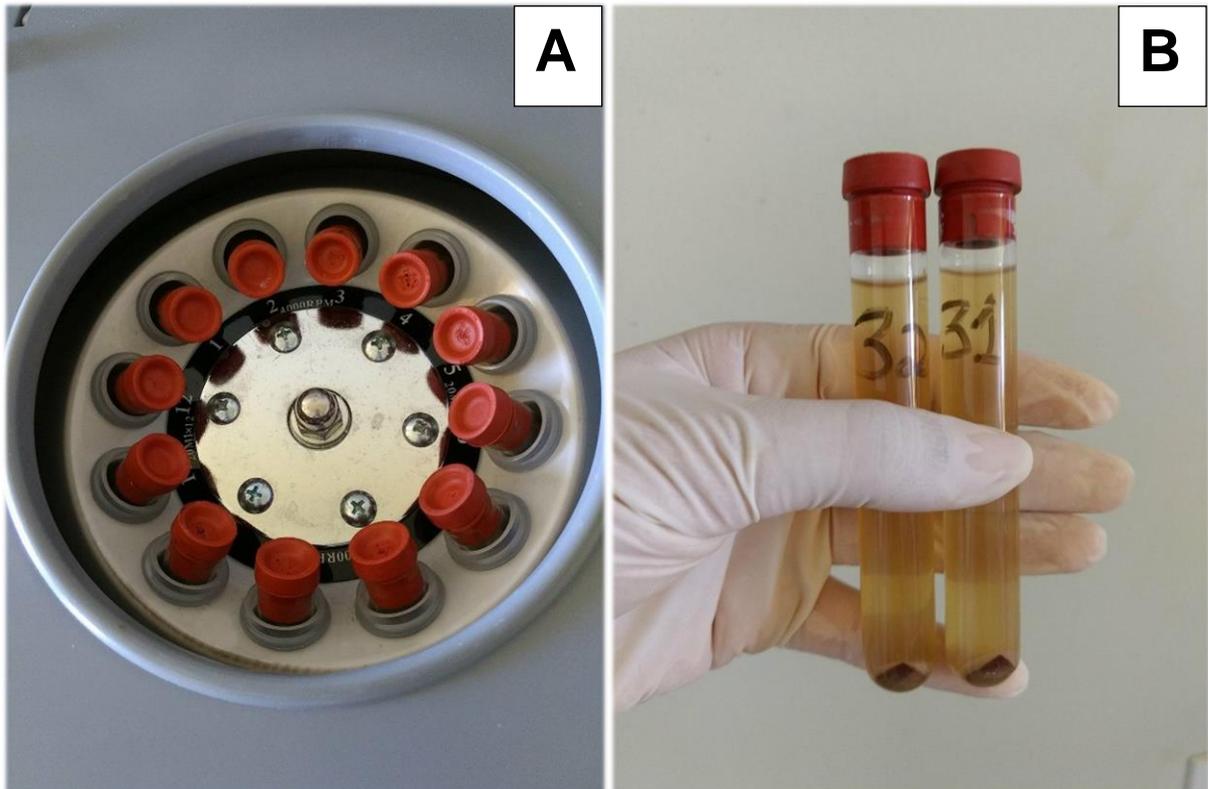


Figura 8: **A:** Amostras de nitrogênio amoniacal ruminal na centrífuga. **B:** Sobrenadante das amostras de nitrogênio amoniacal ruminal que sofrerá a destilação. (Fonte: Acervo da autora, 2018).

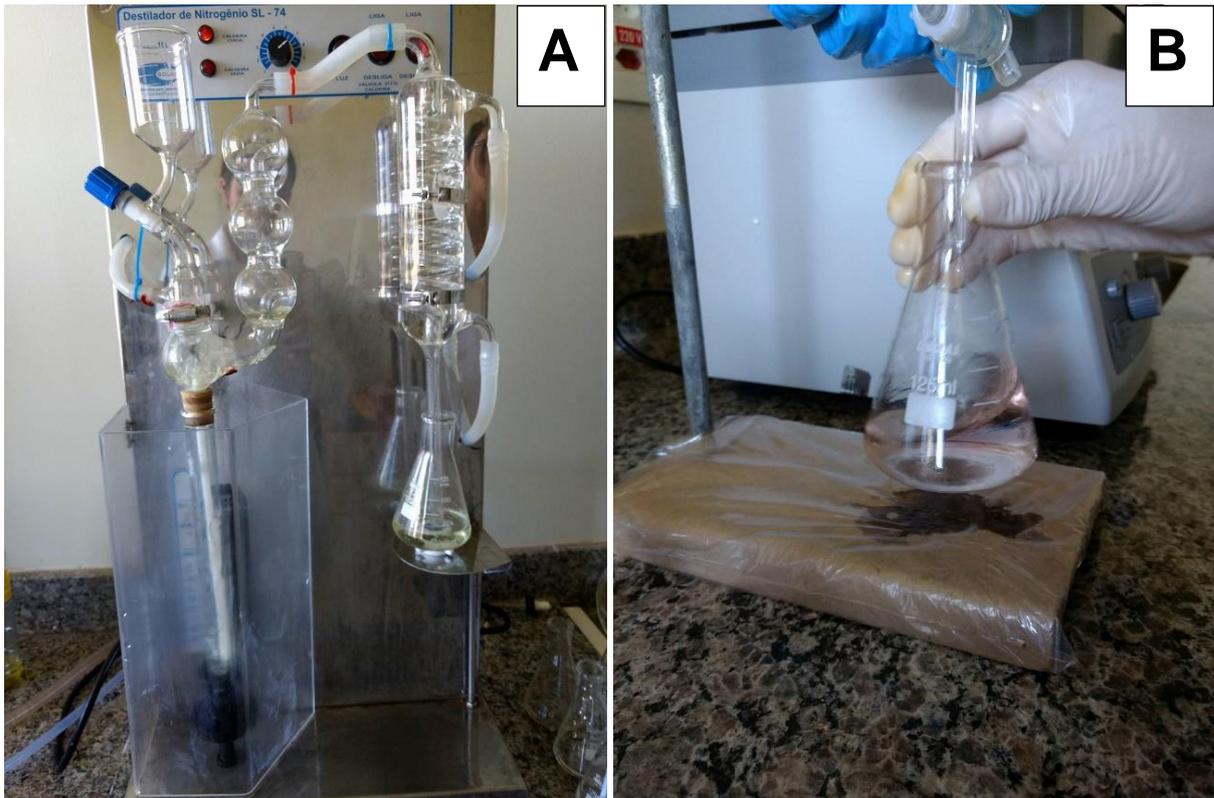


Figura 9: **A:** Amostra no conjunto de destilação do laboratório de nutrição animal. **B:** Titulação com ácido clorídrico de amostras de NAR depois de passarem pela destilação (Fonte: Acervo da autora, 2018).

3.1.3 Análise Estatística

Todas as análises estatísticas foram conduzidas utilizando o programa SAS[®] 9.2 (2009). Os dados coletados das análises foram comparados com o tratamento controle utilizando o teste de Tukey ($\alpha = 0,05$ de probabilidade).

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso, em arranjo fatorial 4x4, com quatro relações volumoso:concentrado (100:0, 50:50, 40:60 e 20:80), e quatro aditivos, sendo o controle (C), quitosana (Q), líquido da casca a castanha de caju (LCC) e quitosana mais líquido da casca de castanha de caju (Q+LCC).

O modelo matemático utilizado foi: $Y_{ij} = \mu + B_k + D_i + L_j + DL_{ij} + e_{ij}$; $Y_{ij} = \mu + D_i + L_j + D_i + e_{ij}$; Em que: k= blocos (variando 1 a 3); i= Dieta (variando de 1 a 4); j= Níveis

de aditivos (variando de 1 a 4); D_i = O efeito da dieta, variando de 1 a 5; L_j = Efeito principal do aditivo; D_{ij} = Efeito da interação da dieta com os aditivos; L_j/D_i = Efeito dos aditivos dentro da dieta, quando significativa à interação; e e_{ijk} = erro.

Utilizou-se também o arranjo de parcelas subdivididas, onde a parcela é a dieta, composta por 4 relações volumoso:concentrado (100:0, 50:50, 40:60 e 20:80) e os aditivos C, Q, LCC e Q+LCC, e a subdivisão são os tempos de coleta de amostras (hora 0, 2, 4, 6 e 8).

O modelo linear para o experimento em parcelas subdivididas no delineamento em blocos ao acaso é dado por: $y_{ijk} = \mu + \tau_i + \gamma_k + (\tau\gamma)_{ik} + \beta_j + (\tau\beta)_{ij} + (\tau\beta\gamma)_{ijk}$; $i = 1, 2, \dots, a$; $j = 1, 2, \dots, b$; $k = 1, 2, \dots, r$. Em que: a) y_{ijk} é o valor observado no i -ésimo tratamento, k -ésimo bloco e j -ésima subparcela; b) μ é uma constante; c) τ_i é o efeito da i -ésima ração; d) γ_k é o efeito do k -ésimo bloco; e) $(\tau\gamma)_{ik}$ é o resíduo da parcela; f) β_j é o efeito do j -ésimo suplemento mineral; g) $(\tau\beta)_{ij}$ é a interação entre a i -ésima ração e o j -ésimo suplemente mineral; h) $(\tau\beta\gamma)_{ijk}$ é o resíduo da subparcela.

Todos os dados coletados foram desdobrados em polinômios ortogonais, onde se permite a análise de variância e regressão pelo comando PROC MIXED do programa Statistical Analysis System versão 9.2 (SAS, 2009), de acordo com suas distribuições. Quando as interações forem significativas elas serão desdobradas, com o estudo de um efeito dentro do outro e, analisadas mediante o modelo de regressão.

4. RESULTADOS E DISCUSSAO

Foi observado efeito para a dieta ($P < 0,001$) na DIVMS, porém, não foi observado efeito na interação ($P = 0,9878$) e na utilização do aditivo ($P = 0,3096$). Na DIVMS (Tabela 3) todas os valores diferiram entre si, onde a maior média foi observada na dieta com relação V:C de 20:80 e a menor média da DIVMS foi a de relação V:C de 100:0 com 27 pontos de diferença entre eles. As médias das dietas

que receberam o tratamento Controle e Q+LCC (0,77 e 0,77) permaneceram estatisticamente iguais, seguidas pelo tratamento LCC (0,78) e Quitosana (0,78). Na figura 10 observamos o aumento linear para DIVMS quando passamos de uma dieta 100% volumoso para uma dieta 20% volumoso e 80% concentrado.

Tabela 3: Digestibilidade *in vitro* de matéria seca das amostras experimentais

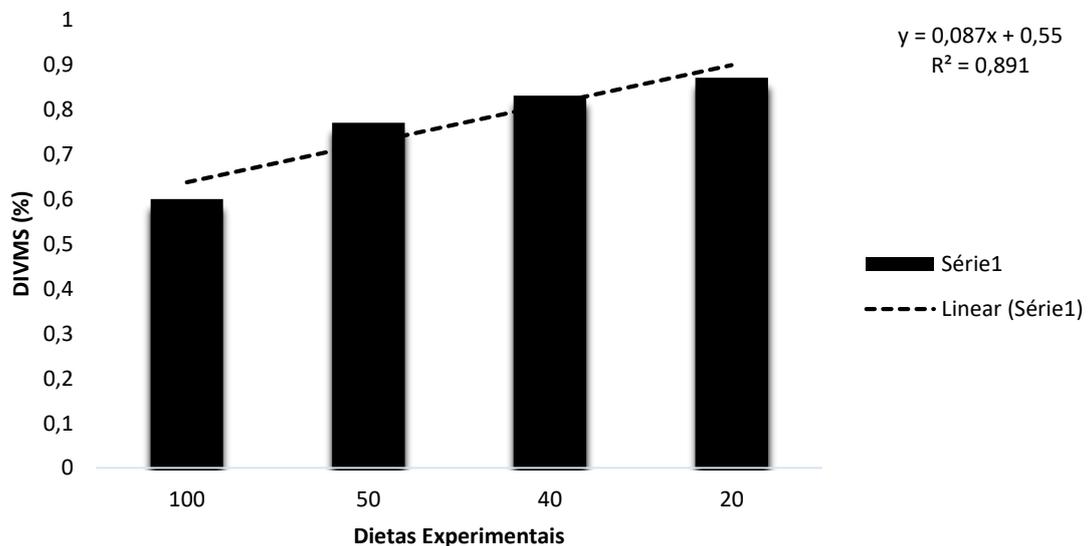
Aditivo	Dietas				Média	EPM	Valor de P		
	100:0	50:50	40:60	20:80			aditivo	dieta	inte
Controle	0,62	0,76	0,83	0,87	0,77	0.7945			
Quitosana	0,62	0,79	0,84	0,89	0,78	0.8012			
LCC	0,60	0,77	0,84	0,88	0,78	0.8078			
Q+LCC	0,58	0,77	0,82	0,87	0,77	0.7945			
Média	0,60d	0,77c	0,83b	0,87a			0,3096	<0.001	0,9878

EPM: Erro padrão da média.

Médias seguidas por letras minúsculas na linha não diferem pelo teste de Tukey.

Médias seguidas por letras maiúsculas na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey.

Figura 10: Digestibilidade *in vitro* de matéria seca das amostras experimentais



No presente trabalho observamos que os valores da DIVMS no tratamento Quitosana coincidem com estudos conduzidos por Wencelová *et al.* (2014), que

relataram que a adição de quitosana diminui a digestibilidade da MS e FDN em dietas com alto teor de volumoso. Jacaúna (2016) em estudos realizados com diferentes níveis de inclusão de quitosana na dieta de ruminantes também sugere que a quitosana afeta negativamente a digestibilidade da MS, e quando comparada com dietas 100% volumoso e dietas que apresentam volumoso e concentrado a quitosana afeta menos a digestibilidade nesta última.

Goiri *et al.* (2009a) e Goiri *et al.* (2009b), observaram que a redução da digestibilidade em dietas que receberam quitosana e eram compostas por volumoso foi menor do que as dietas que receberam quitosana e que foram compostas por volumoso e concentrado. Esse resultado pode ser explicado pelas mudanças na composição da dieta, visto que dietas onde contém concentrado o FDN é menor e a proteína bruta é maior, aumentando a digestibilidade dos nutrientes.

Na DIVFDN (Tabela 4) não houve efeito na dieta ($P=<0,108$), da mesma forma, também não efeito na interação ($P=0,9657$) e na utilização do aditivo ($P=0,8089$). Na DIVFDN é possível observar que a maior média foi percebida na dieta em que o aditivo era a quitosana (0,61), as dietas controle e LCC permaneceram iguais e a dieta Q+LCC foi a menor (0,42).

Tabela 4: Digestibilidade in vitro de fibra detergente neutro das amostras experimentais

Aditivo	Dietas				Média	EPM	Valor de P		
	100:0	50:50	40:60	20:80			aditivo	dieta	inte
Controle	0,59	0,47	0,65	0,55	0,56	0,044			
Quitosana	0,61	0,60	0,64	0,58	0,61	0,046			
LCC	0,61	0,50	0,53	0,62	0,56	0,035			
Q+LCC	0,46	0,35	0,36	0,52	0,42	0,047			
Média	0,57	0,48	0,55	0,57	0,55	0,043	0,8089	<0.108	0,9657

EPM: Erro padrão da média.

Médias seguidas por letras minúsculas na linha não diferem pelo teste de Tukey.

Médias seguidas por letras maiúsculas na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey.

O tratamento que recebeu Q+LCC obteve a menor taxa de DIVMS, assim como, as dietas que receberam o LCC associado ou não a quitosana obtiveram menor taxa de DIVFDN comparada com a dieta que recebeu apenas a quitosana. E

quando comparado com a DIVPB a quitosana apresentou maior taxa de digestibilidade do que o LCC.

Goiri *et al.* (2010) observou em pesquisas com ovinos suplementados com quitosana, que a digestibilidade de FDN sofria uma redução comparada com as dietas que não recebiam suplementação. Esse resultado é explicado pelas alterações nos padrões de fermentação ruminal, onde a aplicação da quitosana (>85% de desacetilação) encaminha-se a redução das atividade dos protozoários em até 56%, melhorando a produção das bactérias no rúmen e minimizando a metanogênese e a matéria orgânica fermentável (BELANCHE *et al.*, 2015).

Se observou (Tabela 5) efeito na dieta ($P < 0,001$) na DIVPB, entretanto, não houve efeito na interação ($P = 0,9567$) e na utilização do aditivo ($P = 0,8809$). Na DIVPB todas as médias das dietas diferem entre si, e é possível observar que a maior média da DIVPB foi percebida na dieta com relação V:C de 20:80 e a menor média da DIVPB foi a de relação V:C de 100:0, com a diferença de 45 pontos entre elas. A média na DIVPB do tratamento com Quitosana foi o mais elevado e a menor média foi observada no tratamento Q+LCC. Na figura 11 observamos o aumento na DIVPB quando passamos de uma dieta 100% volumoso para uma dieta 20% volumoso e 80% concentrado.

Tabela 5: Digestibilidade *in vitro* de proteína bruta das amostras experimentais.

Aditivo	Dietas				Média	EPM	Valor de P		
	100:0	50:50	40:60	20:80			aditivo	dieta	inte
Controle	0.22	0.36	0.50	0.64	0.43	0.0405			
Quitosana	0.20	0.39	0.57	0.76	0.48	0.0379			
LCC	0.18	0.40	0.48	0.69	0.44	0.0389			
Q+LCC	0.20	0.33	0.52	0.52	0.39	0.0389			
Média	0.20	0.37	0.52	0.65			0,8809	<0.001 0,9567	

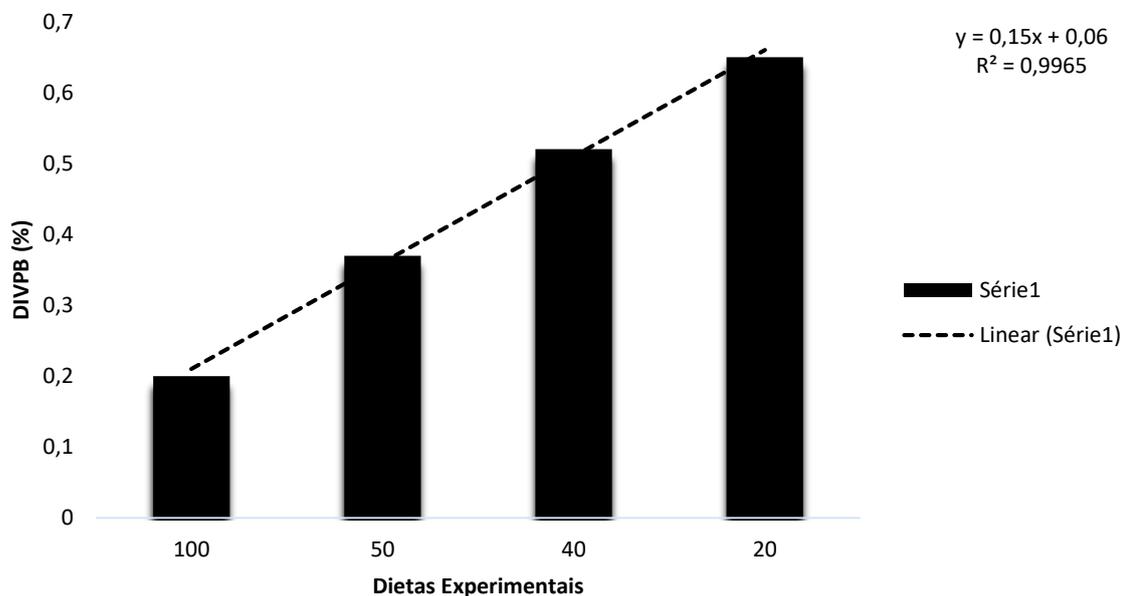
EPM: Erro padrão da média.

Médias seguidas por letras minúsculas na linha não diferem pelo teste de Tukey.

Médias seguidas por letras maiúsculas na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey.

Segundo Van Der Werf *et al.* (1996), quando a taxa de DIVPB é menor há uma melhor manutenção do nitrogênio e elevação dos aminoácidos do intestino delgado, ocasionando em quantidade de aminoácidos maiores para serem utilizados na reprodução, músculos e proteína do leite. Contudo, Díaz (2013), em estudos verificou que o nível de inclusão de até 0,5g/kg de MS de LCC aumentou a DIVMS, e que valores maiores que este levavam a uma queda na DIVMS.

Figura 11: Digestibilidade *in vitro* de proteína bruta das amostras experimentais.



No pH (Tabela 6) se observou efeito na dieta ($P < 0,001$), na interação ($P < 0,001$) e no aditivo ($P < 0,001$). A maior média de pH foi na dieta que recebeu o tratamento Q+LCC (6.70), seguida pelo tratamento Quitosana (6.69), LCC (6.60) e Controle (6.55). Entre as dietas a média mais elevada de pH foi na 100:0 (6.98a), seguida pela 40:60 (6.74b), 50:50 (6.57c) e 20:80 (6.24d). Não se observou variação no efeito linear e efeito quadrático em nenhum dos tratamentos.

Tabela 6: Valores de pH obtidos após coletas nos jarros digestores

Aditivo	Diets				Média	EPM	Valor de P	
	100:0	50:50	40:60	20:80			L	Q
Controle	6.97	6.69	6.68	5.87	6.55d	0,1846	0,0069	0,0050
Quitosana	7.03	6.67	6.71	6.35	6.69b	0,1270	0,0078	0,0249
LCC	7.01	6.44	6.74	6.23	6.60c	0,1516	0,0141	0,0490
Q+LCC	6.95	6.48	6.85	6.52	6.70a	0,1102	0,0675	0,1833
Média	6.98a	6.57c	6.74b	6.24d	6,63	0,1433		

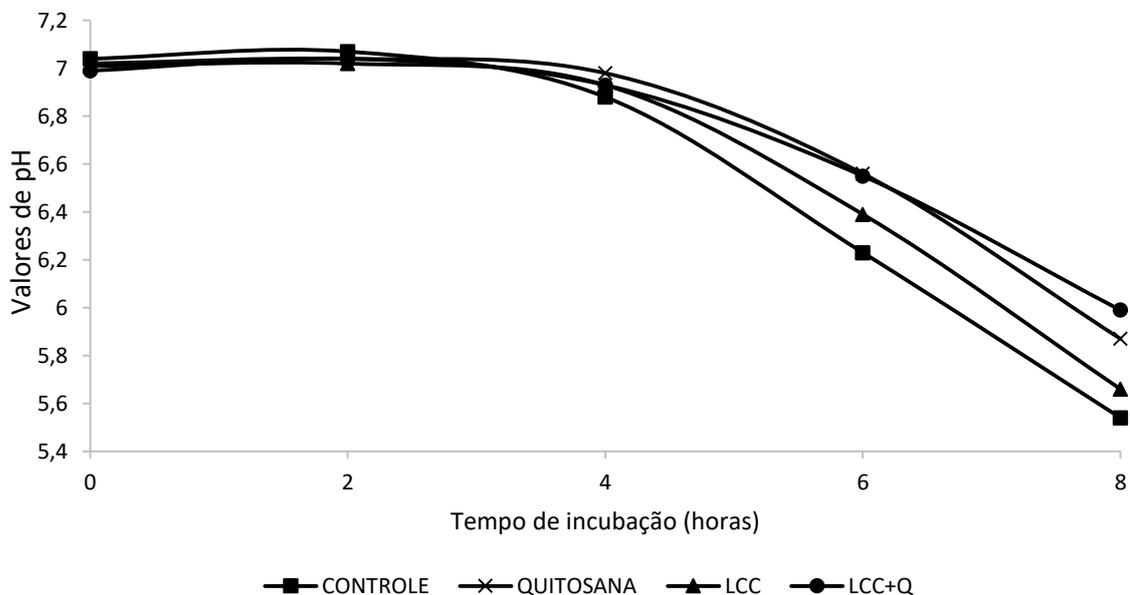
L = efeito linear ; Q = efeito Quadrático

Aditivo (P<0,001); V:C (P<0,001); Interação (P<0,001)

Médias seguidas por letras minúsculas na linha não diferem pelo teste de Tukey.

Médias seguidas por letras maiúsculas na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey.

Na figura 12 foi observado que o pH inicialmente (hora 0) fica em torno de 7.0 em todos os tratamentos, na hora 2 e 4 ele ainda se mantém em 7.0, logo após a hora 4 se observa uma queda acentuada do pH em todos os tratamentos, ficando entre 6.5 e 6.3 na hora 6.

Figura 12: Valores de pH das amostras experimentais obtidos após coletas nos jarros digestores

0: hora zero (primeira coleta); 2: hora dois; 4: horas quatro; 6: hora seis e 8: hora oito (última coleta).

Equações:

Controle: $Y = -0,0339x^2 + 0,0794x + 7,0486$, $r^2 = 0,99$

Lcc: $Y = -0,034x^2 + 0,1092x + 6,9923$, $r^2 = 0,99$

Quitosana: $Y = -0,0318x^2 + 0,1153x + 6,9957$, $r^2 = 0,98$

lccQ: $Y = -0,0266x^2 + 0,0884x + 6,9851$, $r^2 = 0,99$

Na hora 8 o pH se manteve caindo, o tratamento que recebeu Q+LCC foi o único que se manteve no 6,0, que é o limite da faixa ótima da atividade dos microrganismos, os tratamentos Quitosana e LCC ficaram entre 5,9 e 5,6 respectivamente e o tratamento Controle foi o mais baixo, ficando em 5,5.

Segundo os autores Strobel & Russel (1986), os valores de pH abaixo de 6,0 podem atrapalhar as atividades de microrganismos ruminais, diminuindo a eficiência da síntese de proteína bruta microbiana. Entretanto, Furlan *et al.*, 2011, comenta que a atuação das bactérias amilolíticas é melhorada em pH mais baixo, menor que 5,8, levando a uma faixa de pH ideal no rúmen entre 5,5 e 7,0. O tratamento Q+LCC manteve a faixa ótima de pH até a hora final do experimento (hora 8). O tratamento Q ficou próximo de 6,0 na hora 8. Com isso, observamos que a quitosana e/ou o LCC atuam como aditivo e desempenham um papel importante na manutenção do pH e do nitrogênio do líquido ruminal de bovinos, podendo então serem substitutos dos antibióticos ionóforos.

No NAR (Tabela 7) se observou efeito na dieta ($P < 0,001$), na interação ($P < 0,001$) e no aditivo ($P < 0,001$). As maiores médias de NAR foram nas dietas que receberam os tratamentos Q+LCC (22.46A) e LCC (22.22A), as duas médias não diferiram estatisticamente. Elas foram seguidas pelo tratamento Quitosana (19.47B) e por fim o tratamento Controle (15.14C). Entre as dietas a média mais elevada de NAR foi a 20:80 (28.92a), seguida pela 40:60 e 50:50 (19.36b e 20.82b respectivamente), as duas médias não diferiram estatisticamente, e por fim a 100:00 (10.20c) que foi a menor média.

Tabela 7: Valores de Nitrogênio Amoniacal Ruminal obtidos após coletas nos jarros digestores

Aditivo	Dietas				Média	EPM	Valor de P	
	100:0	50:50	40:60	20:80			L	Q
Controle	10.05	15.53	10.68	24.32	15.14C	1,5342	0,0001	<0,001
Quitosana	10.24	19.01	21.50	27.17	19.47B	2,7563	0,0002	0,0011
LCC	10.13	22.84	18.43	37.52	22.22A	3,4734	0,0003	0,0005
Q+LCC	10.39	25.94	26.85	26.68	22.46A	3,6776	0,0054	0,0126
Média	10.20c	20.82b	19.36b	28.92a	19,86	2,110		

L = efeito linear ; Q = efeito Quadrático

Aditivo ($P < 0,001$); V:C ($P < 0,001$); Interação ($P < 0,001$)

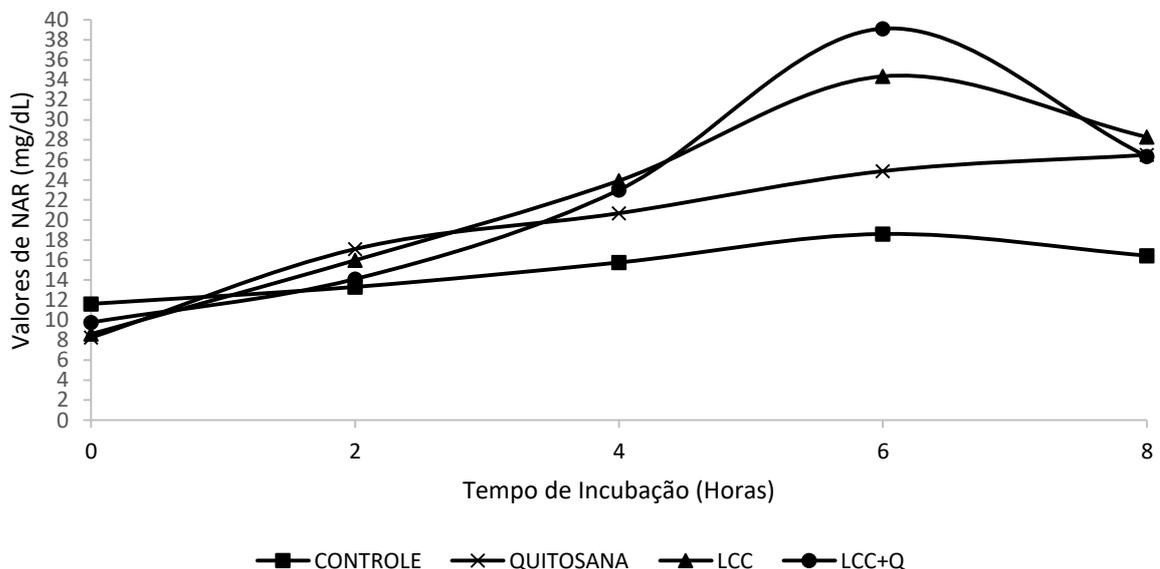
Médias seguidas por letras minúsculas na linha não diferem pelo teste de Tukey.

Médias seguidas por letras maiúsculas na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey.

Se observou variação no efeito linear do tratamento Controle, Quitosana e LCC, no tratamento Q+LCC não se observou variação no efeito linear. No efeito quadrático se observou variação no tratamento Controle e não se observou variação nos tratamentos Quitosana, LCC e Q+LCC.

Na figura 13 observa-se que inicialmente (hora 0) o NAR de todos os tratamentos ficaram em torno de 10mg/dL, na hora 2 o NAR de todos os tratamentos ficaram em torno de 15mg/dL. Na hora 4 o tratamento controle se manteve em 15mg/dL e os demais tratamentos ficaram entre 20mg/dL e 23mg/dL. Na hora 6 o tratamento controle chegou a 18mg/dL, o tratamento Quitosana chegou a 24mg/dL, o tratamento LCC alcançou 34mg/dL e o tratamento Q+LCC obteve o pico mais elevado, 39mg/dL. Na hora 8 os valores de NAR voltaram a cair, o tratamento Controle voltou para 16mg/dL, o tratamento Quitosana foi o único que continuou subindo, foi para 26mg/dL, o tratamento LCC moveu-se para 28mg/dL e o tratamento Q+LCC foi o que teve a maior queda comparando com os outros tratamentos, de 39mg/dL da hora 6 para 26mg/dL na hora 8.

Figura 13: Valores de Nitrogênio Amoniacal Ruminal obtidos após coletas nos jarros digestores



0: hora zero (primeira coleta); 2: hora dois; 4: horas quatro; 6: hora seis e 8: hora oito (última coleta).

Equações:

Controle: $Y = -0,1302x^2 + 1,7879x + 11,17$, $r^2 = 0,87$

Lcc: $Y = -0,4354x^2 + 10,6200x + 7,1944$, $r^2 = 0,91$

Quitosana: $Y = -0,2466x^2 + 4,1847x + 8,6471$, $r^2 = 0,99$

lccQ: $Y = -0,4818x^2 + 6,7353x + 6,9697$, $r^2 = 0,75$

As concentrações de N-NH₃ ficaram acima de 10(mg/dL) durante todo o período do experimento, dentro da faixa ótima de atuação da atividade dos microrganismos (STROBEL & RUSSEL, 1986). Segundo Satter & Slyter, (1974) para que a flora microbiana cresça satisfatoriamente, a concentração de nitrogênio amoniacal no rúmen deve ser no mínimo de 5,0 mg/dL de fluido ruminal. A inclusão da quitosana não mostrou uma variação tão significativa sobre o NAR quando comparada com os outros tratamentos, entretanto, os autores Belanche *et al.*, (2015), comentam que a quitosana eleva a concentração de amônia cerca de 2 horas após a alimentação, efeito que também foi observado neste trabalho.

Beier & Bertilsson (2011), sugerem que é necessária a deaminação da quitosana para que ela possa ser degradada no rumen pelas bactérias ruminais, no entanto a degradação do grupo amina (R-NH₂), em amônia (NH₃), demonstra o porquê das maiores concentrações de amônia nas dietas com quitosana. Belanche *et al.*, (2015), esclarecem que o suprimento extra de nitrogênio disponibilizado pela deaminação da quitosana e a diminuição na retenção de amônia pelos microrganismos ruminais, levam a maiores picos de amônia ruminal, ao invés de aumentar a proteólise dos alimentos.

Para se comparar os valores encontrados de nitrogênio amoniacal se observou a quantidade de amônia comparando com o tempo de coleta, e os maiores valores encontrados foram nas dietas com maior proporção de concentrado, não corroborando com o que Chapaval *et al.* (2008) sugere, que quanto mais concentrado, menor a concentração de amônia no rúmen.

Segundo Goiri *et al.* (2010a), em estudos realizados, também notaram que a quitosana diminui as concentrações de NAR, que provavelmente seja um indicio de uma taxa de deaminação menor da proteína bruta pelos microrganismos ruminais e que portanto se observa maior fluxo de aminoácidos para o intestino delgado e maior emprego do nitrogênio pelos tecidos (SCHELLING, 1984).

Makkar, *et al.* (1995), sugere que as concentrações de amônia possam estar relacionadas à degradação da proteína e a síntese de proteína microbiana, entretanto, Goiri *et al.*, (2010b) ressaltaram a queda na concentração de amônia ruminal é decorrente da menor degradação dos aminoácidos, do que comparado às

propriedades microbianas associadas a quitosana, ou aumento da utilização para síntese de proteína microbiana.

5. CONCLUSÃO

Após avaliação *in vitro* da inclusão de quitosana e líquido da casca da castanha de caju na dieta de ruminantes conclui-se que os mesmos alteram os parâmetros ruminais de DIVMS, DIVFDN e DIVPB de forma positiva quando utilizados isoladamente.

A associação dos aditivos mostrou melhores resultados no pH e no NAR, fazendo com que eles permanecessem elevados até o final do experimento. A indicação é que o uso da associação de quitosana e líquido da casca da castanha de caju traz melhores benefícios para a nutrição animal.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIDER, M. Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: review. **Food Science and Technology**, v.43, n.6, p.837-842, 2010.

AMORATI, R., PEDULLI, G. F., VALGIMIGLI, L., ATTANASI, O. A., FILIPPONE, P., FIORUCCI, C. & SALADINO, R. Absolute rate constants for the reaction of peroxy radicals with cardanol derivatives. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions**. n.2, p.2142-2146, 2001.

ANASSORI, E., DALIR-NAGHADEH, B., PIR MOHAMMADI, R., TAGHIZADEH, A., ASRI-REZAEI, S., MAHAM, M., FARAHMAND-AZAR, S., FARHOOMAND, P. Garlic: a potencial alternative for monensina as rumen modifier. **Livestock Science**, v.142, p.142-276-287, 2011.

ANDRADE, T. J. A. S., ARAÚJO, B. Q., CITÓ, A. M. G. L., SILVA, J., SAFFI, J., RICHTER, M. F. & FERRAZ, A. B. F. Antioxidant properties and chemical composition of technical Cashew Nut Shell Liquid (tCNSL). **FoodChemistry**, n.126, p.1044-1048, 2011

ANKOM, Technology. Method 3: In vitro true digestibility using the DAISYII Incubator. Disponível em: http://www.ankom.com/media/documents/IVDMD_0805_D200.pdf. acesso em: 17/12/2018.

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

AOAC. 'Official methods of analysis.' 17th edn. Association of Official Analytical Chemists: Arlington, VA, 2000.

ASSIS, O. B. G.; SILVA, V. L. Filmes de quitosana processados em diversas concentrações: **Polímeros. Ciência e Tecnologia**, v.13, n.4, p.223-228, 2003.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oil: a review. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, n.2, p.446-75, 2008.

BEAUCHEMIN, K. A., MCGINN, S.M. Methane emissions from beef cattle: effects of fumaric acid, essential oils, and canola oil. **Journal of Animal Science**, v.84, p.1489-1496, 2006.

BEES, F.; FAVERO, A.; VIEIRA, S.I.; TORRENTE, J. The effects of functional oils on broiler diets of varying energy levels. **The Journal of Applied Poultry Research**, v.21, p.567-578, 2012.

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

BRUCE IE, LONG A, PAYNE PB, TYMAN JHP. Preparative HPLC separation of the unsaturated constituents of cardanol and cardol. **J Liquid Chromatog**, v.13, n.10, p.2103-2111, 1990.

BELANCHE, A., RAMOS-MORALES, E., NEWBOLD, C.J., *In vitro* screening of natural feed additives from crustaceans, diatoms, seaweeds and plant extracts to manipulate rumen fermentation. **Journal Science Food Agriculture**, v.96, n.9, p.3069-3078, 2015.

BEZERRA JR P.S., RAYMUNDO D.L., SPANAMBERG A., CORRÊA A.M., BANGEL JR J.J., FERREIRO L. & DRIEMEIER D. Neurotoxicose em bovinos associada ao consumo de bagaço de malte contaminado por *Aspergillus clavatus*. **Pesq. Vet. Bras**, v.28, n.3, p.210-218, 2009b.

BEIER, S., & BERTILSSON, S. Uncoupling of chitinase activity and uptake of hydrolyses products in freshwater bacterioplankton. **Limnol. Oceanogr.** v.56, p.1179–1188, 2011. DOI: 10.4319/lo.2011.56.4.1179

BUR T, S. Essential oils: their antibacterial properties and potencial applications in foods - a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, p.223-253, 2004.

CARVALHO, A.U.; VALADARES FILHO, S.C.; COELHO DA SILVA, J.F. et al. Níveis de concentrado em dietas de zebuínos. 4. Concentrações ruminais de amônia e pH, taxa de passagem da digesta ruminal e degradação *in situ* dos alimentos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.26, n.5, p.1016-1024, 1997b

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

CEPEA. Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada – Esalq/USP. **Boletim do Leite**, jan. 2015. Disponível em: <<http://cepea.esalq.usp.br/>>. Acesso em: 03 de mar. 2018.

CHAO, S.C.; YOUNG, D.G.; OBERJ, C.G. Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. **Journal of Essential Oil Research**, v. 12, n.5, p. 639-649, 2000.

CHAPAVAL, L.; MELOTTI, L.; ROSSI JÚNIOR, P. *et al.* Relação volumoso concentrado sobre as concentrações ruminais de amônia, pH e ácidos graxos voláteis em vacas leiteiras mestiças. **Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.**, v.9, p.18-28, 2008.

CHERNEY, D.J.R.; SICILIANO-JONES, J.; PELL, A.N. Forage *in vitro* dry matter digestibility as influenced by fiber source in the donor cow diet. **Journal of Animal Science**, Lancaster, v.71, p.1335-1338, 1993.

CONSELEITE PARANÁ | Desenvolvido por Sistema FAEP e UFPR – 2017. **UFPR**. Disponível em: <<http://conseleitepr.com.br/>>. Acesso em 17/11/2018.

CORRÊA, I.C.S.; AYUP-ZOUAIN, R.N.; WESCHENFELDER, J.; TOMAZELLI, L.J. 2006. Heavy minerals from south Brazilian continental shelf to north Argentina: distribution and provenance. In: **CONGRESO LATINOAMERICANO DE SEDIMENTOLOGIA**, San Carlos de Bariloche. Resúmenes, Buenos Aires, Asociación Argentina de Sedimentología. v.4, p.79, 2006.

DETMANN, E.; SOUZA, M.A.; VALADARES FILHO, S.C.; QUEIROZ, A.C.; BERCHIELLI, T.T.; SALIBA, E.O.S.; CABRAL, L.S.; PINA, D.S.; LADEIRA, M.M.; AZEVEDO, J.A.G. Métodos para análise de alimentos - INCT - **Ciência Animal. Visconde do Rio Branco**: Suprema, 2012. p.214, 2012.

DIAZ, T.G. Avaliação *in vitro* da inclusão do líquido da casca da castanha do caju em dietas para ruminantes. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – **Universidade Estadual de Maringá, Maringá**. p.60, 2013. Disponível em: <<http://www.ppz.uem.br/trabalhos-de-conclusao/dissertacoes/2013/tatiana-garcia-diaz/view>>. Acesso em: 27/05/2018.

FIRKINS, J.L. Maximizing microbial protein synthesis in the rumen. **Journal of Nutrition**, (supplement), v. 126, p.1347-1354, 1996.

FURLAN, R. L.; MACARI, M.; FARIA FILHO, D. E. Anatomia e Fisiologia do Trato Gastrointestinal. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de Ruminantes**, Jaboticabal, Funep, p.1-23, 2011.

GERACI, J.L., GARCIARENA, A.D., GAGLIO STRO, G.A., BEAUCHEMIN, K.A., COLOMBATTO, D. Plant extracts containing cinnamaldehyde, eugenol and capsicum oleoresin added to feedlot cattle diets: Ruminant environment, short term intake pattern and animal performance. **Animal Feed Science Technology**. v.176, p.123-130, 2012.

GILMOUR J.S., INGLIS D.M., ROBB J. & MACLEAN M. A fodder mycotoxicosis of ruminants caused by contamination of a distillery by-product with *Aspergillus clavatus*. **Vet. Rec.** v.124, p.133-135, 1989.

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

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

GUANZIROLI, C. E., SOUZA FILHO, H., VALENTE JÚNIOR, A. & BASCO, C. A. Entraves ao desenvolvimento da cajucultura no nordeste: margens de comercialização ou aumentos de produtividade e de escala. **Sociedade Brasileira de Economia Administração e Sociologia Rural**, v.18, p.96-122, 2009.

GUSTAFSON R. H., BOWEN R. E. Antibiotic use in animal agriculture. *J. Appl. Microbiol.* v.83, p.531–541, 1997.

HARFOOT, C.G. Anatomy physiology and microbiology of the ruminant digestive tract. In: CHRISTIE, W.W. (Ed.) Lipid metabolism in ruminant animals. **New York:** Pergamon Press Inc. p.1-19, 1981.

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

HOLDEN, L.A. Comparison of methods of in vitro dry matter digestibility for ten feeds. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.82, n.8, p.1791-1794, 1999.

HOOVER, W.H., Stokes, S.R. Balancing carbohydrate and proteins for optimum rumen microbial yield. **Journal of Dairy Science**, v.74, n.10, p.3630-3644, 1991.

HUMPHREYS D.J. Organic compounds, III: Miscellaneous, p.183. In: Humphreys D.J. (Ed.), *Veterinary Toxicology*. 3rd ed. **Baillière Tindall**, London. v.3, p.183-356, 1988.

JACAÚNA, A. G. Avaliação *in vitro* da quitosana como aditivo em dietas para ruminantes. **Dissertação (Mestrado em Zootecnia)** – Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados-MS, p53, 2016.

JOHNSON K. A.; JOHNSON D. E. Methane emissions from cattle. **Journal of Animal Science**, v.73, n.8, p.2483-2492, 1995.

JUNG, H.G., ALLEN, M.S. Characteristics of plant cell walls affecting intake and digestibility of forages by ruminants. **Journal of Animal Science**, v.73, n.7, p.2774-2790, 1995.

KOZLOSKI, G. B. Bioquímica dos ruminantes. Santa Maria: **Universidade Federal de Santa Maria**, p.139, 2002.

KABEYA, K. S.; PAULINO, M. F.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S. C.; CECON, P. R.; QUEIROZ, D. S.; GOMES JÚNIOR, P.; PEREIRA, O. G. Suplementação de Novilhos Mestiços em pastejo na época de transição água-seca: desempenho produtivo, características físicas de carcaça, consumo e parâmetros ruminais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.1, p.213-222, 2002.

KELLERMAN T.S., COETZER J.A.W., NAUDÉ T.W. & BOTHA C.J. Central Nervous System, In: Kellerman T.S., Coetzer J.A.W., Naudé T.W. & Botha C.J. (Eds), Plant Poisonings and Mycotoxicoses of Livestock in Southern Africa. ed. **Oxford University Press**. Cape Town. v.2, p.63-113, 2005.

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

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

LE DUNG, P.; MILAS, M.; RINAUDO, M.; DESBRIÈRES, J. Water soluble derivatives obtained by controlled chemical modifications of chitosan. **Elsevier**, p.209-214, 1994. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0144861794901325>>. Acesso em 22 mai. 2018.

LIMA, M. L. M. Padrão de Fermentação Ruminal de Bovinos Recebendo Produto Homeopático. **Ciência Animal Brasileira**, v.9, n.4, p.969-975, 2008.

LORETTI A.P., COLODEL E.M., DRIEMEIER D., CORRÊA A.M., BANGEL JR. J.J. & FERREIRO L. Neurological disorder in dairy cattle associated with consumption of beer residues contaminated with *Aspergillus clavatus*. **J. Vet. Diagn. Invest.** v.15, p.123-132, 2003.

MANELLA, M. Q.; LOURENÇO, A. J.; LEME, P. R. Recria de bovinos Nelore em pastos de *Brachiaria brizantha* com suplementação protéica ou com acesso a banco de proteína de *Leucaena leucocephala*. Característica de fermentação ruminal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.4, p.1002-1012, 2003.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 13**, de 30 de novembro de 2004. Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo. – Brasília: MAPA/ARC, p.13, 2004.

MAKKAR, H.P.S.; BLÜMEL, M.; BECKER, K. **effect of and interactions between tannins and saponins and fate of tannins in the rumen.** ,v.69, p.481-493,1995.

MARTEN, G.C.; BARNES, R.F. Prediction of energy digestibility of forages with in vitro rumen fermentation and fungal enzyme systems. In: PIGDEN, W.J.; BALCH, C.C.; GRAHAM, M. (Eds.) **Standardization of analytical methodology for feeds.** Ottawa, IDRC, p.61-71, 1980.

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

MARY C. LUBI & EBY THOMAS THACHIL. Review Article. Cashew nut shell liquid (CNSL) - a versatile monomer for polymer synthesis. **Journal - Designed Monomers and Polymers** - Issue 2, v.3, 2000. Acesso: 29/05/2018.

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.M. 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.

MEHREZ, A.Z.; ØRSKOV, E.R.; Mc DONALD, I. Rates of rumen fermentation in relation to ammonia concentration. **British Journal Nutrition**, v.38, n.3, p.437-443, 1977.

MERTENS, D.R. 1997. Creating a system for meeting the fiber requirements of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.80, n.5, p.1463-1481, 1997.

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

MOON, J.S.; KIM, H.K.; KOO, H.C.; JOO, Y.S.; NAM, H.M.; PARK, Y.O.; KANG, M.I. The antibacterial and immunostimulative effect of chitosan-oligosaccharides against infection by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.75, n.5, p.989-998, 2007.

MOULD, F.L.; ORSKOV, E.R. Manipulation of the rumen fluid pH and its influence on cellulosis in sacco, dry matter degradation and the rumen microflora of sheep offered either hay or concentrate. **Animal Feed Science Technology**, v.10, p.1-14, 1983.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. Nutrient requirements of beef cattle. Washington, D.C.: **National academy of Science**. p.242, 1996.

NEWBOLD, C. J.; WALLACE, R. J.; MCINTOSH, F. M. Mode of action of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a feed additive for ruminants. **The British journal of nutrition**, v.76, p.249-261, 1996.

NOCEK, J., 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**, n.71, n.8, p.2070-2107 1988.

NUSSIO, L. G; CAMPOS, F. P; LIMA, M. L. M. Metabolismos de carboidratos estruturais. IN: **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal-SP, 2º Ed, Cap.07, p.183- 223, 2006.

OLIVEIRA, J. S.; ZANINI, A. M.; SANTOS, E. M. Fisiologia, manejo e alimentação de bezerros de corte. Arquivos de Ciências Veterinária e Zootecnia. **Unipar**, Umuarama, v.10, n.1, p.39-48, 2007.

ØRSKOV, E.R. Nutricion proteica de los ruminantes. **Saragoza: Ed. Acribia**. p.178, 1988.

ØRSKOV, E.R. Starch digestion and utilization in ruminants. **Journal of Animal Science**, v.63, n.5, p.1624-1633, 1986.

OWENS, F.N., GOETSCH, A.L. Ruminal fermentation. In: CHURCH, D.C. The ruminant animal digestive physiology and nutrition. **Englewood Cliffs: O. & Books Inc**. p.146-171, 1988.

OWENS, F.N.; ZORRILLA-RIOS, J.; DUBESKI, P. Effects of ionophores on metabolism, growth, body composition and meat quality. In: Pearson, A.M.; Dutson, T.R. **Growth Regulation in Farm Animals: Advances in Meat Research**. London. ELSEVIER, p.321–342, 1991.

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.

PLATEL, K. & SRI NIVASAN, K. Influence of dietary spices or their active principles on digestive enzymes of small intestinal mucosa in rats. **International Journal Food Sciences and Nutrition**, v.47, p.55-59, 1996.

RATCLIFF, J. From farm to fork: issues in food safety. In: WORLD CONFERENCE OF ANIMAL PRODUCTION, REUNIÃO DA ASSOCIAÇÃO LATINOAMERICANA DE PRODUÇÃO ANIMAL, Porto Alegre. [Proceedings...] Porto Alegre: World Association

of Animal Production: Asociacion Latinoamericana de Produccion Animal: Sociedade Brasileira de Zootecnia: **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, v.17, 2003.

RENNÓ, F. P.; ARAÚJO, A. P. C.; VENTURELLI, B. C.; SANTOS, M.C.B.; FREITAS JÚNIOR, J. E.; BARLETTA, R. V.; GANDRA, J.R.; VERDURICO, L. C.; CALOMENI, G.D.; GARDINAL, R.; MINGOTI, R. D.; BETTERO, V. P. **Utilização de quitosana na alimentação de ruminantes**. Pirassununga. Editora: 5D, 2011. Disponível em: <<http://www.producao.usp.br/handle/BDPI/44347>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

RIBEIRO, K. G.; GARCIA, R.; PEREIRA, O. G.; VALADARES FILHO, S. C.; CECON, P. R. Eficiência microbiana, fluxo de compostos nitrogenados no abomaso, amônia e pH ruminais, em bovinos recebendo dietas contendo feno de Capim- Tifton 85 de diferentes idades. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.2, p.581-588, 2001.

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

RUSSELL, J. B.; STROBEL, H. J. Effect of ionophores on ruminal fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.55, n.1, p.1-6, 1989.

RUSSEL, J.B. et. al. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminal fermentation. **Journal of Animal Science**, v.70, p.3551-3561, 1992.

SATTER, L. D.; SLYTER, L. L. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production *in vitro*. **British Journal Nutrition**, v.32, p.199-208, 1974.

SCHELLING, G.T. Monensin mode of action in the rumen. **Journal of Animal Science**, v.58, n.6, p.1518-1527, 1984.

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

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.5308–5310, 2012.

SILVEIRA, M. F.; KOZLOSKI, G. V.; BRONDANI, I. L.; ALVES FILHO, D. C.; RESTLE, J.; LEITE, D. T.; METZ, P. A. M.; SILVEIRA, S. R. L. Ganho de peso vivo e fermentação ruminal em novilhos mantidos em pastagem cultivada de clima temperado e recebendo diferentes suplementos. **Ciência Rural**, v.36, n.3, 2006.

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. Análise de alimentos: Métodos químicos e biológicos. **Viçosa: Editora UFV**, 3ed. p.235, 2002.

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. Análise de alimentos: métodos químicos biológicos. Belo Horizonte: **Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária**, 2ed. 265p, 2002.

STROBEL, H.J., RUSSELL, J.B. Effect of pH and energy spilling on bacterial protein syntheses by carbohydrate limited cultures of mixed rumen bacteria. **Journal of Dairy Science**, v.69, n.10, p.2947-2959, 1986.

TAGER, L.R., KRAUSE, K.M. Effects of essential oils on rumen fermentation, milk production, and feeding behavior in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v.94, p.2455-2464, 2011.

TANG, H.; ZHANG, P.; KIEFT, T. L.; RYAN, S. J.; BAKER, S. M.; WIESMANN, W. P.; ROGELJ, S. Antibacterial action of a novel functionalized chitosan-arginine against gram-negative bacteria. **Acta Biomaterialia**, v.6, p.2562-2571, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2874111/>>. Acesso em: 22 maio de 2018.

TEKIPPE, J.A., HRI STOV, A.N., HEYLER, K.S., CASSIDY, T.W., ZHELJAZKOV, V.D., FERR EIR A, J.F.S., KARNATI, S.K., VARGA, G.A. Rumen fermentation and

protozoal effects of *Origanum vulgare* L. leaves in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.94, p.5065-5079, 2011.

TILLEY, J. M. A.; TERRY, R. A. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. **Journal of the British Grassland Society, Oxford**, v.18, n.2, p.104–111, 1963.

VALADARES FILHO, S. C.; PINA, D. S. Fermentação Ruminal. IN: Nutrição de Ruminantes. **Jaboticabal: Funep**, 583p. 2006.

VAN DER WERF. H. M.G.; MATHIJSSSEN, E, W.J.M.; HAVERKORT, A.J. The potential of hemp (*Cannabis sativa* L.) For sustainable fibre production: a crop physiological appraisal. **Ann. Appl. Biol.**, v.129, p.109-123, 1996.

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

VAN SOEST, P.J. Nutritional ecology of the ruminant. 2.ed. Ithaca: **Cornell University**, Press. 2ed. 476p, 1994.

VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. Corvalis: O. & B. Books, 2 ed. 1982.

VARUM, K. M., SMIDSRØD, O. Structure-property relationships in chitosans, In: **Polysaccharides**. New York: Dumitriu, S, p.625-642, 2005.

WALLACE, R. J. Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.63, p.621-629, 2004.

WASSSERMAN D, DAWSON C. Cashew nut shell liquid III. The Cardol component of Indian Cashew Nut Shell Liquid with reference to the Liquid's Vesicant activity. **Journal Am Chem Soc.** p.3675-3679, 1948.

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.

WENCELOVA M, VARADYOVA Z, MIHALIKOVA K; KIŠIDAYOVÁ, S; JALC, D. Evaluating the effects of chitosan, plant oils, and different diets on rumen metabolism and protozoan population in sheep. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v.38, p.26–33, 2014.

YANG, W.Z., BENCHAAAR, C., AMETAJ, B.N., BEAUCHEMIN, K.A. Dose response to eugenol supplementation in growing beef cattle: Ruminal fermentation and intestinal digestion. **Animal Feed Science and Technology**, v.158, p.57-64, 2010.

ANEXO:

CONFECÇÃO DE SAQUINHOS DE TNT (conforme descrito por Casali *et al*, 2008)

- O TNT (tecido não tecido) deve ser:
- Cortado e selado no tamanho de 5,0 x 5,0 cm;
- Pré lavado em acetona durante 3 a 5 minutos;
- Seco em temperatura ambiente até a evaporação completa da acetona;
- Seco em estufa a 105°C;
- Pesado em balança analítica.

DIGESTIBILIDADE *IN VITRO* DE MATÉRIA SECA (metodologia descrita por Tilley & Terry, 1963, modificada por Holden *et al*, 1999):

- Ligar a incubadora previamente, temperatura (39°C – 41°C) e rotação;
- Soluções tampão também devem ser mantidas na temperatura de 39°C no banho-maria;
- Garrafas térmicas e os beakers também devem ser pré-aquecidos a uma temperatura próxima a 39°C;
- A coleta do líquido ruminal é via cânula ruminal, com o Becker;
- Filtragem do inócuo em quatro camadas de gaze;
- Inócuo filtrado é despejado na garrafa térmica que foi previamente aquecida e com CO₂, e fechada hermeticamente;
- No laboratório o inócuo é homogeneizado.

SOLUÇÃO TAMPÃO DE KANSAS (MARTEN & BARNES, 1980; SILVA & QUEIROZ, 2002):

- Solução A (gramas/L): 10,0g KH₂PO₄; 0,5 g MgSO₄·7H₂O; 0,5 g NaCl; 0,1 g CaCl₂·2H₂O; 0,5 g ureia;
- Solução B (gramas/100mL): 15,0 g Na₂CO₃; 1,0 g Na₂S·9H₂O;

- Antes da incubação a solução B é misturada na solução A na relação 1:5 até a solução A atingir o pH de 6,8 e sempre na temperatura constante de 39°C.

Iniciando a incubação:

- É retirado da incubadora um jarro por vez;
- Adiciona-se nos jarros 16 saquinhos de TNT, sendo 4 saquinhos de cada relação V:C (distribuídos de forma aleatória nos dois lados da divisória dos jarros);
- Adiciona-se 2 saquinhos sem amostras (branco);
- Em seguida a solução tampão (1600ml);
- O líquido ruminal (400ml);
- Aplicar o CO₂ durante trinta segundos;
- Cada jarro recebe o aditivo a ser analisado;
- Fechar a tampa do jarro, que volta para a incubadora.

**A incubação é realizada em dois estágios, o primeiro é descrito como fase fermentativa, onde ocorre a digestão ruminal, e o segundo é a fase química, simulando a digestão no abomaso.*

Fase fermentativa:

- Temperatura (39°C – 41°C) e rotação contínua;
- 48 horas de duração.

Fase química (conforme descrito por Holden,1999):

- Os jarros são retirados da incubadora um por vez;
- É adicionado 40 mL de ácido clorídrico (HCL 6N);
- 8 gramas de pepsina (Sigma 1:10000);
- Incubação continua por mais 24 horas.

**Ao fim da incubação, todos os saquinhos são retirados dos jarros e lavados em água corrente até não ter mais resíduos do inócuo, e seguem para a secagem em estufa (55°C), e depois de 12 horas são pesados em balança analítica.*

DIGESTIBILIDADE *IN VITRO* DE DETERGENTE NEUTRO:

**São utilizados metade dos saquinhos que saíram da estufa depois da DIVMS.*

- No determinador de fibra, os saquinhos ficam imersos em solução detergente neutro;
- 95°C de temperatura;
- Durante 1 hora;
- Lavagem dos saquinhos em água destilada quente (2X);
- Lavagem em acetona (1X);
- Secagem dos saquinhos em ambiente aberto até a evaporação da acetona;
- Estufa a 105°C por 12 horas.

DIGESTIBILIDADE *IN VITRO* DE PROTEINA BRUTA:

**São utilizados metade dos saquinhos que saíram da estufa depois da DIVMS.*

- Os saquinhos são abertos e seu conteúdo é transferido para os tubos de digestão;
- É adicionado nos tubos 2 gramas de mistura digestora ($K_2SO_4=CUSO_4.5H_2O+Se$);
- Também adiciona-se 5 mL de ácido sulfúrico concentrado;
- Os tubos seguem para a capela de exaustão de gases em placas digestoras;
- Gradativamente alcançam a temperatura de 350°C (iniciando em 50°C e a cada 30 minutos é elevado 50°C até chegar em 350°C);
- Quando a coloração das amostras forem verde claro significa que elas sofreram a digestão, indicando a transformação do nitrogênio em amônio;
- Após saírem da placa digestora, as amostras são resfriadas com água destilada;
- O tubo segue para o conjunto de destilação;
- É adicionado NaOH (Hidróxido de sódio), que junto com a amostra é destilado em erlenmeyer de 125 mL contendo 20 mL de ácido bórico e vermelho de metila (cor rosa);

- O volume total do destilado é de 50 mL em todas as amostras;
- A coloração do erlenmeyer que recebe o destilado passa de rosa para verde claro;
- Em seguida o destilado sofre titulação com HCl, até a viragem do indicador, que acontece quando a mistura de cor verde claro volta para o rosa.

NITROGÊNIO AMONIACAL RUMINAL (NAR):

**Foram incubados o inócuo, as amostras e os aditivos da mesma forma e quantidade que na DIVMS.*

**Para a coleta das amostras foi realizado nas tampas dos jarros incubados uma adaptação com válvulas e um sistema de três vias, tipo Bussen, que permitia a liberação dos gases produzidos durante a fermentação (DIAZ, 2013).*

**A coleta das amostras é feito com seringa de 20mL, para que a tampa do jarro não precisasse ser aberta.*

- A coleta das amostras acontece em intervalos de 2 horas, iniciando no tempo 0 (zero), seguidas do tempo 2, 4, 6 e 8, totalizando 5 coletas ao longo do dia;
- É coletado 10mL de amostra em potes contendo 1mL de ácido clorídrico (HCL) 1:1 para análise de NAR;
- As amostras sofrem centrifugação a 3.000 r.p.m durante 15 minutos;
- É coletado 2 mL do sobrenadante que segue para o tubo de digestão;
- Adiciona-se 20 mL de água destilada;
- 5 mL de hidróxido de potássio (KOH);
- O tubo segue para o destilador;
- O destilado é recebido em erlenmeyer de 250 ml, contendo 10 ml de ácido bórico 2% e 3 gotas de vermelho de metila, até completar 50 ml;
- O erlenmeyer segue para a titulação com ácido clorídrico na concentração 0,005 mol/L.

pH:

- Coleta-se amostras de 10 mL de líquido ruminal nos tempos 0 (logo após a incubação), 2, 4, 6, e 8;
- Imediatamente é observado o pH em pHmetro digital.