



Avaliação do líquido da casca da castanha de caju associado com quitosana, sobre a digestão ruminal *in vitro* de dietas com diferentes proporções de volumoso: concentrado

Resumo: O líquido da casca da castanha de caju é extraído do mesocarpo esponjoso da castanha do caju, considerado uma fonte melhor e mais barata de fenóis insaturados, possui na sua composição cardol, cardanol e ácido anacárdico que desempenham importante atividade antibactericida. A quitosana é um polissacarídeo natural, não tóxico, renovável, obtido a partir da desacetilação da quitina do exoesqueleto de insetos e crustáceos, algas, parede celular de fungos entre outros. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da adição da quitosana e/ou líquido da casca da castanha de caju na digestibilidade de nutrientes como aditivos para ruminantes. Os aditivos foram adicionados nas proporções: 500mg/kg de MS do líquido da casca da castanha de caju; 500 mg/kg de MS de quitosana; 200 mg/kg de MS de monensina; e associação da quitosana com o líquido da casca da castanha de caju (500 mg/kg de MS cada). Os tratamentos foram distribuídos aleatoriamente em delineamento inteiramente casualizado. O líquido da casca da castanha de caju associado ou não a quitosana afetou linearmente a digestibilidade da MS e a digestibilidade da MO. A quitosana reduziu a digestão da fibra em detergente neutro e proteína bruta. Foi observada interação entre relação V:C e o aditivo sobre a DIVFDN. A inclusão do líquido da casca da castanha de caju associado com a quitosana não proporcionaram efeito satisfatórios sobre a digestibilidade dos nutrientes. A redução na digestibilidade pode estar relacionado a quantidade da dose e/ou a atividade de inibição destes compostos. Desta forma, é necessário que novos estudos sejam realizados para identificar a dose ótima da associação destes dois aditivos na alimentação de bovinos.

Palavras-chave: aditivo, antibactericida, digestibilidade *in vitro*, fermentação ruminal

Introdução

O líquido extraído da casca da castanha de caju (LCCC) é um óleo funcional, fonte natural de lipídios fenólicos, que contém ácido anacárdico, cardol e cardanol, que possui atividade antimicrobiana e antioxidante (BENCHAAAR et al., 2008). O uso do LCCC tem sido estudado *in vitro* como aditivo modulador da fermentação ruminal por melhorar a digestibilidade dos nutrientes e selecionar bactérias Gram-negativas em detrimento das Gram-positivas (SHINKAI et al., 2012).

A quitosana é um polissacarídeo natural, não tóxico, biodegradável que pode ser utilizado como aditivo modulador da fermentação ruminal por possuir potencial antimicrobiano, demonstrando resultados satisfatórios nos processos digestivos dos ruminantes (GOIRI et al., 2009). É obtida pelo processo de desacetilação da quitina do exoesqueleto de insetos, crustáceos, da parede de fungos, algas entre outros (SENEL et al., 2004).

Apesar do líquido da casca da castanha de caju e a quitosana já terem demonstrado resultados satisfatórios sobre a alimentação de ruminantes ainda há poucos trabalhos sobre este assunto. Assim, este trabalho foi delineado para avaliar a inclusão do líquido da casca da castanha de caju, quitosana e, associação dos dois componentes como aditivos moduladores da fermentação ruminal sobre a digestibilidade *in vitro* dos nutrientes do líquido ruminal contendo diferentes proporções volumoso: concentrado.

Material e Métodos



O estudo foi realizado durante o período de agosto a novembro de 2015, no Laboratório de Avaliação de Coprodutos, do Instituto de Pesquisa em Agroenergia e Conservação Ambiental (IMPAC) e Laboratório de Nutrição Animal (LANA) da Universidade Federal da Grande Dourados, campus Universitário Dourados. Foram utilizadas cinco relações volumoso com concentrado (100:00, 65:35; 50:50; 35:65 e 20:80) e quatro tipos de aditivos: monensina (controle positivo); líquido da casca da castanha de caju (LCCC); quitosana em pó (solúvel) (Q); e líquido da casca da castanha de caju e quitosana (LCCCQ). A monensina foi utilizada na proporção de 200 mg/kg de MS. O LCCC foi utilizado na dose de 500 mg/kg de MS composto de ácido anarcádio (10,03 mg/g); cardanol (102,34%) e 2-metilcardol (19, 17%). A dose utilizada da quitosana foi de 500 mg/kg de MS. A quitosana continha grau de desacetilação > 86,30 (Polymar Indústria e Com. Imp. e Exp. LTDA, Fortaleza, Ceará, Brasil). As dietas formuladas foram compostas de feno de Tifton 85 (*Cynodon spp*) como volumoso e, milho (49,72%), farelo de soja (40,05%) e suplemento mineral (10,23%) como concentrado. Os mesmos ingredientes foram fornecidos em todas as relações V:C. Determinou a digestibilidade *in vitro* dos da matéria seca (DIVMS), digestibilidade *in vitro* matéria orgânica (DIVMO), digestibilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro (DIVFDN), digestibilidade *in vitro* da fibra em detergente ácido (DIVFDA), digestibilidade *in vitro* proteína bruta (DIVPB) e digestibilidade *in vitro* da hemicelulose (DHCEL) utilizando o rúmen artificial (incubador *in vitro* TE – 150 - Tecnal®) de acordo com a metodologia descrita por Tilley & Terry (1963) e adaptada por Holden et al. (1999). O simulador do rúmen é composto por quatro frascos de incubação, em constante rotação, dentro de uma incubadora a 39°C. As amostras de 0,5 gramas são pesadas e acondicionadas em saquinhos F57 da ANKON® selados. Como doadores de inóculo ruminal foram utilizados dois bovinos mestiços provenientes do cruzamento entre raças de aptidão leiteira, castrados, com peso médio de 350 kg±25 kg, providos de cânula ruminal, alimentados com capim *U. brizantha* cv Marandu e recebendo suplementação. O líquido foi coletado via fístula e acondicionamento em garrafa térmica. O líquido foi filtrado, mantido sob fluxo constante de CO₂ e em banho maria (39°C) até ser inserido aos frascos de incubação do simulador de rúmen, juntamente a solução tampão previamente preparada e aquecida (39°C). Após 48 horas de incubação foram adicionados o ácido clorídrico 6 N e a pepsina para simulação da digestão química por 24 horas. Após esse período os saquinhos foram lavados, secos em estufa a 105°C por 12 horas e pesados. A DIVMS, DIVPB, DIVFDN, DIVFDA, DIVPB, DIVMO, DHCEL foi obtida pela diferença no peso antes e depois da incubação. No procedimento estatístico utilizou-se o delineamento experimental inteiramente ao acaso. Os dados foram submetidos a análises exploratórias preliminares, para eliminar dados discrepantes ("outliers") e obedecer às premissas básicas da análise de variância (linearidade, homoscedasticidade e normalidade dos erros). As análises preliminares, o processamento e análise dos dados experimentais foram realizados com o auxílio do software estatístico SAS University Edition® (SAS INSTITUTE, 2015). Inicialmente, para os dados de digestibilidade *in vitro* da MS, FDN, FDA, PB e HCEL aplicou-se teste de Dunnet com o auxílio do Proc GLM com a finalidade de comparar o tratamento testemunha (controle positivo, Monensina) com os demais aditivados, ao nível de 5% de probabilidade.

Resultados e Discussão

Os resultados demonstram que independente da relação volumoso com concentrado na dieta, a inclusão da quitosana associada ou não ao líquido da casca de caju aumentou a DIVMO. A quitosana aumentou a DIVMS. A quitosana associada ou não ao líquido da castanha de caju apresentou maior DIVPB em relação ao tratamento utilizando apenas o líquido da casca da castanha de caju. Esse resultado pode ser explicado pelas alterações nos padrões de fermentação ruminal, em que a utilização da quitosana (>85% de desacetilação) tende a reduzir a atividade dos protozoários em até 56%, o que favorece a produção das bactérias no rúmen e, conseqüentemente, a digestão dos



nutrientes (BELANCHER et al., 2015). A inclusão do LCCC associado ou não com a quitosana, proporcionou redução da DIVMS. Contudo, a adição do LCCC e o aumento do volumoso na dieta proporcionaram maior DIVFDN quando comparada a dieta controle, disponibilizando maior quantidade de energia para o animal. Quando avaliado sobre a DIVPB, o líquido da casca de castanha de caju apresentou menor DIVPB. A redução da DIVPB promove maior retenção do nitrogênio e aumenta a quantidade de aminoácidos no intestino delgado, resultando em maiores quantidades de aminoácidos para reprodução, músculo e a proteína do leite (VAN DER WERF et al., 1996). Foi verificado aumentos na digestibilidade da fibra com o uso do LCCC e LCCCQ. Desta forma, parecem estar relacionados à melhor atividade das bactérias celulolíticas.

Tabela 1. Coeficiente de digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS), matéria orgânica (DIVMO) e proteína bruta (DIVPB) das diferentes dietas experimentais.

| Rel. V:C | Aditivos | | | | Média | EPM | P-valores | | |
|---------------------------------|----------|--------|--------|--------|-------|--------|-----------|----------|-----------|
| | CONT | Q | LCCC | LCCCQ | | | Aditivo | Rel. V:C | Interação |
| DIVMS (g/kg de MS) ¹ | | | | | | | | | |
| 20 | 0,762 | 0,775 | 0,686 | 0,716 | 0,735 | 0,008 | <0,0001 | <0,0001 | 0,8025 |
| 35 | 0,684 | 0,736 | 0,654 | 0,650 | 0,681 | | | | |
| 50 | 0,618 | 0,667 | 0,605 | 0,580 | 0,618 | | | | |
| 65 | 0,541 | 0,616 | 0,533 | 0,541 | 0,571 | | | | |
| 100 | 0,413 | 0,475 | 0,357 | 0,358 | 0,401 | | | | |
| Média | 0,604B | 0,654A | 0,567C | 0,569C | | | | | |
| DIVMO (g/kg de MS) ² | | | | | | | | | |
| 20 | 0,859 | 0,842 | 0,759 | 0,785 | 0,809 | 0,0172 | 0,0024 | <0,001 | 0,1436 |
| 35 | 0,759 | 0,828 | 0,687 | 0,727 | 0,751 | | | | |
| 50 | 0,744 | 0,746 | 0,625 | 0,668 | 0,695 | | | | |
| 65 | 0,595 | 0,662 | 0,547 | 0,599 | 0,589 | | | | |
| 100 | 0,433 | 0,479 | 0,385 | 0,629 | 0,482 | | | | |
| Média | 0,666AB | 0,712A | 0,601B | 0,682A | | | | | |
| DIVPB (g/kg de MS) ³ | | | | | | | | | |
| 20 | 0,756 | 0,693 | 0,489 | 0,876 | 0,704 | 0,016 | 0,0024 | <0,001 | 0,1436 |
| 35 | 0,750 | 0,714 | 0,671 | 0,729 | 0,716 | | | | |
| 50 | 0,814 | 0,759 | 0,695 | 0,818 | 0,771 | | | | |
| 65 | 0,758 | 0,754 | 0,655 | 0,825 | 0,748 | | | | |
| 100 | 0,698 | 0,625 | 0,366 | 0,758 | 0,612 | | | | |
| Média | 0,755AB | 0,709B | 0,575C | 0,801A | | | | | |

Médias com letras diferentes dentro da mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05). Regressão relativas aos níveis de volumoso com concentrado: $^1\hat{Y}=0,893552-0,00422977x$ ($R^2=0,98$) (P<0,001); $^2\hat{Y}=0,825427-0,004159x$ ($R^2=0,99$) (P<0,001); $^3\hat{Y}=0,589255+0,00647997x-0,00006240x^2$ ($R^2=0,94$) (P=0,00061).

Tabela 2. Coeficiente de digestibilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro (DIVFDN), das diferentes dietas experimentais.

| Rel. V:C | Aditivos | | | | Média | EPM | P-valores | | |
|----------|---------------------|---------|-------------------|--------------------|-------|----------|-----------|----------|-----------|
| | CONT ¹ | Q | LCCC ² | LCCCQ ³ | | | Aditivo | Rel. V:C | Interação |
| | DIVFDN (g/kg de MS) | | | | | | | | |
| 20 | 0,323B | 0,399AB | 0,404A | 0,417A | 0,386 | 0,008302 | 0,1518 | <0,0001 | <0,0001 |



| | | | | | |
|-------|---------|--------|---------|---------|-------|
| 35 | 0,389AB | 0,345B | 0,338B | 0,423A | 0,374 |
| 50 | 0,289C | 0,370B | 0,459A | 0,421AB | 0,385 |
| 65 | 0,604A | 0,387B | 0,451B | 0,433B | 0,469 |
| 100 | 0,346B | 0,425A | 0,403AB | 0,341B | 0,379 |
| Média | 0,391 | 0,385 | 0,411 | 0,407 | |

Médias com letras diferentes dentro da mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Regressão relativa aos níveis de Volumoso com concentrado: $^1\hat{Y} = 0,11489426 + 0,01052664x - 0,00007975x^2$ ($R^2 = 0,28$) ($P < 0,001$); $^2\hat{Y} = 0,30751073 + 0,00383294x - 0,00002819x^2$ ($R^2 = 0,26$) ($P = 0,0394$); $^3\hat{Y} = 0,37046957 + 0,00267497x - 0,00002945x^2$ ($R^2 = 0,94$); $^4\hat{Y} = -0,06826875 + 0,01347575x - 0,00011094x^2$ ($R^2 = 0,34$) ($P < 0,001$); $^5\hat{Y} = 0,14727944 + 0,00162799x$ ($R^2 = 0,63$) ($P = 0,00083$); $^6\hat{Y} = -0,08783743 + 0,01692518x - 0,00014497x^2$ ($R^2 = 0,86$) ($P < 0,001$); $^7\hat{Y} = -0,13774682 + 0,01746953x - 0,00012498x^2$ ($R^2 = 0,98$) ($P = 0,00003$); $^8\hat{Y} = -0,01593519 + 0,01116731x - 0,00005741x^2$ ($R^2 = 0,97$) ($P = 0,044$); $^9\hat{Y} = 0,17114725 + 0,00318893x$ ($R^2 = 0,91$) ($P = 0,00003$).

Conclusões

O líquido da casca da castanha de caju e quitosana, isoladamente, adicionados a dieta de ruminantes como aditivos moduladores da fermentação ruminal favorecem o aproveitamento dos nutrientes da dieta e resulta em efeitos positivos na digestibilidade dos nutrientes, possibilitando substituir os antibióticos ionóforos. No entanto, quando trabalhado em conjunto reduz a digestibilidade, podendo comprometer o desempenho dos animais. Desta forma, é necessário que novos estudos sejam realizados para identificar a dose ótima da associação destes dois aditivos na alimentação de bovinos.

Referências

- BENCHAAR, C.; CALSAMIGLIA, S.; CHAVES, A.V.; FRASER, G. R.; COLOMBATTO, D.; MC ALLISTER, T. A.; BEAUCHEMIN, K. A. A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Animal Feed Science Technology*, v. 145, p.209–228, 2008.
- SHINKAI, T.; ENISHI, O.; MITSUMORI, M.; Higuchi K, Kobayashi Y, Takenaka A, Nagashima K, Mochizuki M, Kobayashi Y. Mitigation of methane production from cattle by feeding cashew nut shell liquid. *Journal of Dairy Science*, v. 95, p 5308–531, 2012.
- 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. *Journal Animal Feed Science and Technology*, v.151, p. 215-227, may.2009.
- SENEL, S.; MCCLURE, S. J. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. *Advanced Drug Delivery Review*, v. 56, p. 1467-1480, 2004.
- VAN DER WERF, H. M.G.; MATHIJSEN, E, W.J.M.; HAVERKORT, A.J. The potencial of hemp (*Cannabis sativa* L.) For sustainable fibre production: a crop physiological appraisal. *Ann. Appl. Biol.*, 129, p. 109-123, 1996.
- TERRY, R.A. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *Journal British Grassland Society*, v.18, p.104-111, 1963.
- BELANCHER, 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.