THIAGO HENRIQUE DA SILVA

Enzima fibrolítica exógena na alimentação de vacas em lactação

Pirassununga

2016

THIAGO HENRIQUE DA SILVA

Enzima fibrolítica exógena na alimentação de vacas em lactação

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Nutrição e Produção Animal

Área de concentração:

Nutrição e Produção Animal

Orientador:

Prof. Dr. Francisco Palma Rennó

De acordo: _____

Orientador

Pirassununga
2016

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.3257
FMVZ

Silva, Thiago Henrique da
Enzima fibrolítica exógena na alimentação de vacas em lactação / Thiago Henrique da Silva. --
2016.
120 f. il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga, 2016.

Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal.

Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Palma Rennó.

1. Consumo. 2. Digestibilidade. 3. Fibra. 4. Leite. 5. Rúmen. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Enzimas Fibrolíticas na Alimentação de Vacas Leiteiras", protocolado sob o CEUA nº 7066120214, sob a responsabilidade de Francisco Palma Rennó e equipe; Thiago Henrique da Silva; Thiago Henrique Da Silva - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUAFMZV) em reunião de 15/10/2014.

We certify that the proposal "título em inglês", utilizing 24 Bovines (24 females), protocol number CEUA 7066120214, under the responsibility of Francisco Palma Rennó and team; Thiago Henrique da Silva; Thiago Henrique Da Silva - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes (or teaching) - it's in accordance with Law 11.794, of October 8 2008, Decree 6899, of July 15, 2009, with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was approved by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of São Paulo University (CEUAFMZV) in the meeting of 10/15/2014.

São Paulo, 01 de julho de 2015

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SILVA, Thiago Henrique

Título: **Enzima fibrolítica exógena na alimentação de vacas em lactação**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico a realização desta obra aos meus pais Antonio Carlos da Silva e Eli Aparecida Pavan da Silva e ao meu irmão Antonio Carlos da Silva Junior.

*A estes dedico este trabalho
como forma de gratidão por tudo o que fizeram por mim.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que me deu condições para que eu pudesse chegar até aqui e realizar este trabalho.

Agradeço aos meus pais Antonio Carlos da Silva e Eli Aparecida Pavan da Silva pela vida, pelo amor, por acreditarem em mim, pela excelente criação mostrando que com humildade e trabalho chegamos onde quisermos e, além disso, nunca mediram esforços para que eu pudesse voar em busca de meus devaneios.

Agradeço meu irmão Antonio Carlos da Silva Júnior pelo incentivo e pelas conversas sábias que me ajudaram a trilhar meu caminho com mais facilidade. Que sejamos sempre companheiros e felizes.

Agradeço com todo amor e carinho a minha namorada Iuli Caetano da Silva Brandão Guimarães, por todo carinho, todo incentivo, toda torcida, por todo amor e por fazer meus dias mais felizes. Agradeço ainda à sua família pela torcida, força e carinho dispensados.

Agradeço ao Prof. Francisco Palma Rennó, pelos ensinamentos, pelo trabalho, pela confiança depositada em mim, pela paciência, pela sua orientação e dedicação, pela oportunidade de realização deste sonho e por me mostrar o verdadeiro papel de um cientista perante a sociedade.

A todos integrantes do grupo de pesquisa do Laboratório de Pesquisa em Bovinos Leiteiros da FMVZ USP, Thiago Vendramini, Caio Takiya, Filipe Zanferari, Pablo Gomes, Gustavo Calomeni, Rodrigo Gardinal, Guilherme Gomes, José Esler Freitas, Gustavo de Almeida, Carlos Eduardo Consentini (Dado), Jéssica Bertoni, Jefferson Gandra, Brenda Fernandes, Tiago Del Valle, Elmeson (Mineiro), Rafael (Bizão), Lenita, Vitor, e todos outros companheiros que já passaram por este laboratório, agradeço pela contribuição, trabalho e convivência.

A todos estagiários e em especial à Maria Angelica, Sebastian Velasquez, Zara Lucia, Ana Maria Cano, Manuela Roldan, que colaboraram neste trabalho.

Aos meus grandes amigos funcionários Carlos Schmidt, Diogo Martinelli, Lucas Santos, Dênis, Leandro, Dona Dalva e Nathália Trevisan entre todos os outros que foram de suma importância para realização deste trabalho.

Aos médicos veterinário João Victor Rocha, Soraya Veiga Barbosa, Guilherme Barbosa, Fabrício Perin, Francisco Luiz do Prado, Alexandre Scanavez e aos Professores, Maurício Scoton, Edmundo Benedetti e Ricarda dos Santos que colaboraram em minha formação.

À Universidade de São Paulo, a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, e Departamento de Nutrição e Produção Animal, incluindo seus professor e funcionários pela formação e realização desta conquista.

A minha segunda casa, que possibilitou o meu crescimento profissional e pessoal, o Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite (LPBL) e por fornecer todas as condições estruturais e financeiras para a realização deste projeto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) processo nº 2014/13202-3, CAPES, CNPq e Alltech[®] pelo apoio financeiro pela concessão de auxílio à pesquisa que possibilitou a realização deste estudo.

Enfim, a todos aqueles que, de alguma forma colaboraram, torceram, incentivaram ou se dedicaram para realização deste trabalho.

Aprender é uma experiência.
Todo o resto é somente informação.

Albert Einstein

Life is not tried, it is merely survived
If you're standing outside the fire.

Garth Brooks

RESUMO

SILVA, T. H. **Enzima fibrolítica exógena na alimentação de vacas em lactação.** [Exogenous fibrolytic enzyme in dairy cows diets]. 2016. 120 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

Objetivou-se avaliar a utilização de doses crescentes de enzima fibrolítica exógena na alimentação de vacas leiteiras e seus efeitos sobre o consumo e digestibilidade aparente total da matéria seca e nutrientes, cinética ruminal, fermentação e síntese de proteína microbiana ruminal, produção e composição do leite, perfil metabólico e balanço de energia e nitrogênio. Foram utilizadas 24 vacas da raça Holandesa, múltiparas, em delineamento Quadrado Latino 4x4, com $646,75 \pm 77,54$ kg de peso corporal, $3,02 \pm 0,56$ de escore de condição corporal, com $176 \pm 82,27$ dias em lactação e produção de leite de $33,72 \pm 7,63$ kg/dia, no início do estudo. Os animais foram distribuídos aleatoriamente para receber os seguintes tratamentos: 1) Controle (0), composta por dieta basal sem a inclusão de enzima fibrolítica; 2) com inclusão de 8 g/vaca/dia de enzima fibrolítica; 3) com inclusão de 16 g/vaca/dia da enzima fibrolítica; 4) com inclusão de 24 g/vaca/dia da enzima fibrolítica (Fibrozyme® - Alltech Inc., Nicholasville, KY). A utilização de enzima fibrolítica nas dietas resultou em aumento linear no consumo de matéria seca, matéria orgânica e da fibra em detergente neutro. Foi detectado aumento linear no consumo de partículas longas com a suplementação de enzima. Houve efeito quadrático na ruminação e na atividade mastigatória. O aumento no consumo de matéria seca refletiu no aumento linear de consumo de energia líquida e no balanço de energia líquida. Houve efeito quadrático na concentração de N-NH₃ ruminal e aumento linear na quantidade de ácido acético, propiônico e butírico com o aumento da dose de enzima suplementada. Houve efeito quadrático na síntese de proteína microbiana com a inclusão de enzima fibrolítica. Não foram observadas diferenças na produção de leite e na produção de seus componentes, entretanto houve aumento linear no ganho de peso corporal com utilização de enzima fibrolítica. Houve efeito quadrático positivo na excreção via urina e efeito quadrático negativo no balanço de nitrogênio mostrando maior retenção de nitrogênio com a suplementação intermediária de enzimas fibrolíticas. Conclui-se que a enzima fibrolítica exógena é efetiva em aumentar o consumo de matéria seca e FDN e também melhorar a eficiência fermentativa de vacas leiteiras melhorando o balanço energético, entretanto não foi

efetiva em aumentar a produção de leite de vacas da raça holandesa no terço médio da lactação.

Palavras-chave: Consumo. Digestibilidade. Fibra. Leite. Rúmen.

ABSTRACT

SILVA, T. H. **Exogenous fibrolytic enzyme in dairy cows diets.** [Enzima fibrolítica exógena na alimentação de vacas em lactação]. 2016. 120 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

The aim of this study was to evaluate the use of exogenous fibrolytic enzyme in lactating cows diets and their effect on intake and total-tract apparent digestibility of dry matter and nutrients, fermentation and synthesis of ruminal microbial protein, milk yield and composition, metabolic profile and energy and nitrogen balance. Twenty-four multiparous Holstein cows were used in 4x4 Latin Square design, with 646.75 ± 77.54 kg of body weight, 3.02 ± 0.56 of body condition score, 176 ± 82.27 days in milk and 33.72 ± 7.63 kg/day of milk yield at the start of the study. Animals were randomized to receive the following treatments: 1) Control (0), comprises basal diet without the addition of fibrolytic enzyme; 2) with addition of 8 g/cow/day of fibrolytic enzyme; 3) with the inclusion of 16 g/cow/day of fibrolytic enzyme; 4) with inclusion of 24 g/cow/day of fibrolytic enzyme (Fibrozyme® - Alltech Inc., Nicholasville, KY). Exogenous fibrolytic enzymes in feed resulted in increased of dry matter, organic matter and neutral detergent fiber intake. Long particles intake increased linearly with fibrolytic enzyme inclusion in the diet. Cows supplemented with fibrolytic enzyme showed quadratic effect on the rumination and chewing activities. The increase in dry matter intake reflected in the linear increase in net energy intake and net energy balance. There was quadratic effect on the concentration of ruminal $\text{NH}_3\text{-N}$ and a linear increase in the amount of acetic, propionic and butyric acids in the rumen. There was quadratic effect in the ruminal microbial synthesis. There were no differences in milk yield and components production. There was a linear increase in the body weight gain with use of fibrolytic enzyme. There was quadratic effect in nitrogen urine excretion with quadratic effect on the nitrogen balance. Thus, exogenous fibrolytic enzyme is effective in increasing dry matter and NDF intake and improve the fermentation efficiency of dairy cows increase energy balance, but was not effective in increase the milk yield of Holstein cows in the third of lactation.

Keywords: Digestibility. Fiber. Intake. Milk. Rumen.

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

AGCC	Ácidos Graxos de Cadeia Curta
AGCR	Ácidos Graxos de Cadeia Ramificada
AST	Aspartato Aminotransferase
BE	Balanco de Energia
CED	Consumo de Energia Digestível
CELI	Consumo de Energia Líquida
CMS	Consumo de Matéria Seca
CNF	Carboidratos Não Fibrosos
ECC	Escore de Condição Corporal
EB	Energia Bruta
ED	Energia Digestível
EE	Extrato Etéreo
EL	Energia Líquida
ELL	Energia Líquida de Lactação
ELM	Energia Líquida de Manutenção
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FDA	Fibra em Detergente Ácido
FDAi	Fibra em Detergente Ácido Indigestível
FDN	Fibra em Detergente Neutro
FDNe	Fibra em Detergente Neutro Efetiva
FDNfe	Fibra em Detergente Neutro Fisicamente Efetiva
FDNi	Fibra em Detergente Neutro Indigestível
FDNpd	Fibra em Detergente Neutro Potencialmente Digestível
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
FZEA	Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
GGT	Gama Glutamiltransferase
LPBL	Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite
MM	Matéria Mineral
MO	Matéria Orgânica
MS	Matéria Seca

N	Nitrogênio
NDT	Nutrientes Digestíveis Totais
N-NH ₃	Nitrogênio Amoniacal
NUS	Nitrogênio Ureico no Soro
PB	Proteína Bruta
PC	Peso Corporal
PDR	Proteína Degradável no Rúmen
pH	Potencial Hidrogeniônico
PIDA	Proteína Insolúvel em Detergente Ácido
PIDN	Proteína Insolúvel em Detergente Neutro
PL	Produção de Leite
PLC	Produção de Leite Corrigida
PNDR	Proteína Não-Degradável no Rúmen
QL	Quadrado Latino
TNT	Tecido Não-Tecido
USP	Universidade de São Paulo

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Proporção dos ingredientes do concentrado e da dieta experimental expresso em % da matéria seca, de vacas em lactação alimentadas com níveis crescentes de enzima fibrolítica exógena na ração total	51
Tabela 2 -	Composição bromatológica dos alimentos utilizados na dieta basal expressos em % da matéria seca, de vacas em lactação alimentadas com níveis crescentes de enzima fibrolítica exógena na ração total	52
Tabela 3 –	Consumo e digestibilidade aparente total da matéria seca e dos nutrientes de vacas em lactação alimentadas com níveis crescentes de inclusão enzima fibrolítica exógena na dieta.....	66
Tabela 4 -	Índice de seleção por tamanho de partículas de vacas em lactação alimentadas com níveis crescentes de inclusão de enzima fibrolítica exógena na dieta	69
Tabela 5 -	Comportamento alimentar de vacas em lactação alimentadas com níveis crescentes de inclusão enzima fibrolítica exógena na dieta.....	71
Tabela 6 -	Dinâmica ruminal de vacas em lactação alimentadas com níveis crescentes de inclusão enzima fibrolítica exógena na dieta	73
Tabela 7 -	Balanço de energia de vacas em lactação suplementadas com níveis crescentes de inclusão de enzima fibrolítica exógena na dieta	76
Tabela 8 -	Fermentação ruminal de vacas em lactação alimentadas com níveis crescentes de inclusão enzima fibrolítica exógena na dieta	78
Tabela 9 -	Síntese de proteína microbiana de vacas em lactação alimentadas com níveis crescentes de inclusão de enzima fibrolítica na dieta	83
Tabela 10 -	Desempenho produtivo de vacas em lactação suplementadas com níveis crescentes de inclusão de enzima fibrolítica exógena na dieta.....	86
Tabela 11 -	Balanço de nitrogênio de vacas em lactação suplementadas com níveis crescentes de inclusão de enzima fibrolítica exógena na dieta.....	90
Tabela 12 -	Metabólitos sanguíneos de vacas leiteiras alimentadas com níveis crescentes de inclusão enzima fibrolítica exógena na dieta	92

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - pH ruminal em diferentes tempos após o fornecimento da alimentação matinal de vacas em lactação suplementadas com doses crescentes de enzima fibrolítica exógena..... 80
- Figura 2 - N-NH₃ ruminal em diferentes tempos após o fornecimento da alimentação matinal de vacas em lactação suplementadas com doses crescentes de enzima fibrolítica exógena..... 80
- Figura 3 - Acetato ruminal em diferentes tempos após o fornecimento da alimentação matinal de vacas em lactação suplementadas com doses crescentes de enzima fibrolítica exógena..... 81
- Figura 4 - Propionato ruminal em diferentes tempos após o fornecimento da alimentação matinal de vacas em lactação suplementadas com doses crescentes de enzima fibrolítica exógena..... 81
- Figura 5 - Butirato ruminal em diferentes tempos após o fornecimento da alimentação matinal de vacas em lactação suplementadas com doses crescentes de enzima fibrolítica exógena..... 82
- Figura 6 - Ácidos graxos de cadeia curta ruminal em diferentes tempos após o fornecimento da alimentação matinal de vacas em lactação suplementadas com doses crescentes de enzima fibrolítica exógena 82

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	HIPÓTESE E OBJETIVOS	20
3	REVISÃO DE LITERATURA	21
3.1	FIBRA NA ALIMENTAÇÃO DE VACAS LEITEIRAS	21
3.2	EXIGÊNCIA DE FIBRA PARA VACAS LEITEIRAS	22
3.3	FATORES QUE AFETAM CONSUMO E DIGESTIBILIDADE DE FORRAGENS.....	24
3.4	PAREDE CELULAR VS. FIBRA	25
3.5	A PAREDE CELULAR VEGETAL	26
3.5.1	Celulose.....	28
3.5.2	Hemicelulose.....	29
3.5.3	Lignina	30
3.6	HIDRÓLISE RUMINAL DA PAREDE CELULAR DE FORRAGENS.....	31
3.6.1	Digestão da celulose	33
3.6.2	Digestão da hemicelulose.....	35
3.6.3	Papel da lignina na indigestibilidade da fibra.....	36
3.6.4	Atividade enzimática ruminal	39
3.7	ENZIMAS FIBROLÍTICAS EXÓGENAS NA ALIMENTAÇÃO DE VACAS LEITEIRAS.....	40
3.7.1	Enzimas Fibrolíticas Exógenas	41
3.7.2	Mecanismo de ação das enzimas fibrolíticas exógenas.....	41
3.7.3	Enzimas fibrolíticas exógenas e desempenho de vacas leiteiras	43
4	MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1	LOCAL, INSTALAÇÕES E ANIMAIS	49
4.2	TRATAMENTO EXPERIMENTAL	50
4.3	CONSUMO DE MATÉRIA SECA E NUTRIENTES	50
4.4	ANÁLISE DE ALIMENTOS	53
4.5	DIGESTIBILIDADE APARENTE TOTAL.....	54
4.6	DINÂMICA RUMINAL	55
4.7	ÍNDICE DE SELEÇÃO DE PARTÍCULAS	56
4.8	COMPORTAMENTO INGESTIVO.....	56

4.9	FERMENTAÇÃO RUMINAL.....	57
4.10	SÍNTESE DE PROTEÍNA MICROBIANA RUMINAL E BALANÇO DE NITROGÊNIO.....	58
4.11	BALANÇO DE ENERGIA	60
4.12	PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE.....	61
4.13	AVALIAÇÃO DO ESCORE DE CONDIÇÃO CORPORAL E PESO CORPORAL	62
4.14	METABÓLITOS SANGUÍNEOS.....	62
4.15	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	63
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	65
5.1	CONSUMO E DIGESTIBILIDADE	65
5.1.1	Índice de seleção.....	69
5.1.2	Comportamento ingestivo	70
5.1.3	Dinâmica ruminal	72
5.2	BALANÇO DE ENERGIA	75
5.3	FERMENTAÇÃO RUMINAL.....	76
5.4	SÍNTESE DE PROTEÍNA MICROBIANA RUMINAL.....	83
5.5	PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE E MUDANÇA DE PESO CORPORAL	85
5.6	BALANÇO DE NITROGÊNIO	88
5.7	METABÓLITOS SANGUÍNEOS.....	91
6	CONCLUSÃO	93
	REFERÊNCIAS.....	94

1 INTRODUÇÃO

O modelo anatômico e a fisiologia digestiva dos ruminantes os possibilitam utilizar material fibroso na composição de sua dieta basal. Estes animais possuem a capacidade de converter fibra, que não seriam utilizadas por monogástricos, em carne e leite, entretanto esta conversão ainda é bastante ineficiente.

A produção de ruminantes, no que diz respeito ao fornecimento de alimentos para o massivo crescimento populacional mundial, consiste em encontrar maneiras de aumentar a eficiência de utilização de nutrientes em suas dietas para maximizar o uso de terras agriculturáveis no mundo. Esta preocupação é trivial, considerando que atualmente há 7,5 bilhões de pessoas e em 2050 a população aumentará para 9,6 bilhões e, para suprir esta demanda, a produção de leite terá que aumentar de 580 milhões de toneladas, no ano 2000, para 1043 milhões de toneladas em 2050.

Na atividade leiteira o custo das forragens vai de 10 a 30% do custo total da alimentação fazendo-se necessário explorar sua eficiência qualitativa, pois a digestão de forragens, ou seja, substratos fibrosos no rúmen, é lenta e incompleta, podendo limitar a produção de leite. As forragens podem compor grande parte da matéria seca de dietas de bovinos leiteiros de diversas categorias e suas características de digestibilidade podem afetar a ingestão de matéria seca e o desempenho dos animais, bem como também define a quantidade e a qualidade dos concentrados nas dietas, agregando alto custo. Isso ainda é mais agravante sabendo que a silagem de milho brasileira possui menor digestibilidade do que as silagens produzidas em climas temperados.

Com o intuito de melhorar a eficiência de uso dos nutrientes fornecidos pelas forragens aos ruminantes, diversas linhas de pesquisas têm buscado alternativas de se alterar e melhorar o padrão de fermentação, bem como a eficiência da síntese de produção de proteína microbiana ruminal. Isto é necessário para que se consiga obter quantidade e qualidade de nutrientes (ácidos graxos de cadeia curta e proteína metabolizável) compatíveis com o nível de produção alcançado pelo progresso genético de vacas leiteiras.

Dentre as diversas alternativas existentes atualmente para aumento na eficiência de utilização de forragens podemos destacar o melhoramento genético de forragens e o uso de aditivos em dietas de ruminantes. O melhoramento genético há tempos vem

sendo estudado na tentativa de aumentar a digestibilidade da parede celular de forragens que possibilitaria melhor eficiência de utilização energética de seus nutrientes aumentando o desempenho dos animais e, conseqüentemente, mitigando os impactos ambientais causado pela excessiva excreção de nutrientes e metano.

Quanto aos aditivos, utilizados na dieta de ruminantes, diversos tipos vêm sendo estudados com o objetivo de potencializar, ou mesmo substituir os convencionais utilizados comumente nos sistemas pecuários, em que os mais utilizados são os promotores de crescimento. Estes promotores são classificados como antibióticos ionóforos pela legislação, fazendo com que seu uso seja cada vez mais criticado pelos consumidores.

Outros aditivos utilizados são os probióticos (microrganismos adicionados aos alimentos), com um apelo de se usar microrganismos vivos ou não, e as culturas fúngicas incluindo seus extratos purificados ou de bactérias, as chamadas *enzimas exógenas*, a qual será estudada mais profundamente neste trabalho. Estas são consideradas extratos naturais que possuem o potencial efeito de melhorar a utilização da fibra e de outros nutrientes na dieta elevando a eficiência produtiva de vacas leiteiras e, além disso, não possuem efeitos nocivos à saúde humana.

2 HIPÓTESE E OBJETIVOS

A hipótese a ser avaliada neste estudo é de que o aumento na dose de inclusão de enzima fibrolítica exógena às dietas de vacas em lactação, com predominante atividade xilanase, aumentará o consumo e a produção de leite.

Objetivou-se avaliar o efeito da inclusão de níveis crescentes de enzima fibrolítica exógena sobre o consumo e digestibilidade aparente total da matéria seca e nutrientes, a cinética ruminal, o índice de seleção, o comportamento ingestivo, a fermentação ruminal, a produção e composição do leite, o ganho de peso e perfil metabólico, a síntese de proteína microbiana ruminal e o balanço de energia e nitrogênio.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 FIBRA NA ALIMENTAÇÃO DE VACAS LEITEIRAS

Os carboidratos compreendem cerca de 70 a 80% das rações fornecidas às vacas leiteiras contribuindo com grande parte da energia e precursores para síntese de componentes do leite (MERTENS et al., 1997; MERTENS, 2007). Forragem pode ser a menos onerosa fonte deste macronutriente para vacas leiteiras (SCHINGOETHE et al., 1999) podendo participar entre 40 a 90% das dietas destes animais (MARTINS et al., 2006).

Burns (2008) em seu estudo envolvendo 100 anos de publicações do *Journal of Animal Science*, relata que desde a década de 30 é reconhecida a necessidade de diminuir a dependência da produção animal por dietas com alta inclusão de concentrados (grãos) devendo-se potencializar o uso de forragens. Entretanto, isso somente será possível quando houver qualidade e eficiência no uso deste ingrediente para os ruminantes.

Consumo de energia é o primeiro limitante de produção para vacas de alto mérito genético e é determinado por fatores intrínsecos do animal e pelo conteúdo de energia fornecido pela dieta (RAYBURN; FOX, 1993; ALLEN, 2000). O potencial de produção de um animal depende de sua genética e varia de acordo com o estágio de lactação, idade e fatores ambientais (NRC, 2001). Assim cada animal produz de acordo com a utilização dos nutrientes, a menos que o consumo de nutrientes esteja comprometido pela capacidade física do rúmen (MERTENS, 2007).

Como existe o fator físico limitante do consumo quando há ingestão de rações com alta proporção de fibra, existe também os fatores negativos da baixa inclusão de fibra nas rações os quais podem levar à acidose ruminal, abscesso hepático, depressão da gordura no leite, entre outros problemas (NOCEK, 1997; NRC, 2001).

3.2 EXIGÊNCIA DE FIBRA PARA VACAS LEITEIRAS

Quantidade e forma física da forragem são importantes para suportar a função normal do rúmen, pois estimula a mastigação e produção de saliva, o que ajuda a tamponar o rúmen contra a severa redução de pH em dietas com alta densidade energética (ALLEN, 1997). Balch (1971) explica que um limite mínimo de tempo de mastigação por dia é correlacionado com adequado fornecimento de fibra física nas dietas e também se correlaciona com a formação da rede ruminal (“mat” ruminal), em que segundo Mertens (1997) o constituinte químico associado a estas duas variáveis é a fibra em detergente neutro (FDN), que é o resíduo da parede celular vegetal insolúvel em detergente neutro.

Quando se particiona os carboidratos em fibrosos e não fibrosos se obtém dois nutrientes com propriedades nutricionais distintas. Fibra pode ser definida nutricionalmente como fração do alimento que é lentamente digestível ou indigestível, que ocupa espaço no trato gastrointestinal (Nussio et al., 2011). Estruturalmente, a fibra é um agregado de compostos da parede celular vegetal e não uma entidade química distinta, portanto, a composição química da fibra é dependente da sua fonte e da metodologia usada na sua determinação laboratorial (MERTENS, 1997). Inicialmente Einhof utilizou um macerado de alimentos que ficaram retidos na peneira como o conceito de fibra (VAN SOEST, 1994). Em seguida surgiu o termo Fibra Bruta (FB) por Meyer e Logfgreen (1959), baseando o método em lavagens do material em ácidos fortes e bases fortes. Entretanto este método retira quantidades significantes de hemicelulose e lignina, estimando o conteúdo da parede celular erroneamente.

Van Soest (1967) e Van Soest e Wine (1967) desenvolveram o hoje conhecido sistema de detergentes para análise da fibra dos alimentos. Neste sistema, o alimento é dividido na fração solúvel, a qual é rapidamente e completamente disponível, e a fração insolúvel, que é lenta e incompletamente disponível. A FDN isola celulose, hemicelulose e lignina, com alguma contaminação de pectina, proteína e cinzas.

O NRC (2001) fornece diretrizes para FDN dietético, FDN vindo de forragem e carboidrato não-fibroso (CNF) e discute sobre formulações de dietas saudáveis usando mínimos níveis de inclusão de forragem, para que não ocorra acidose ruminal sub-aguda. É sugerido que 75% da FDN dietética deva vir de forragens, entretanto, Allen (1997) explana que a efetividade da fibra vinda de sub-produtos e de forragens é

variável, podendo-se obter dietas não muito adequadas quando se usa sub-produtos na formulação de dietas. Este autor encontrou alta relação entre FDN vindo de forragem com pH ruminal, mas baixa relação quanto ao teor de FDN dietético.

Mertens (1997) aponta dois outros tipos de fibra que possam ser um indicador de saúde ruminal, a fibra em detergente neutro efetiva (FDNe) e a fibra em detergente neutro fisicamente efetiva (FDNfe). A primeira infere na capacidade do alimento em manter a gordura do leite quando volumoso é substituído por um outro produto. Já a segunda envolve característica física da fibra (tamanho de partícula) a qual influencia atividade mastigatória, um importante indicador de saúde ruminal (ALLEN, 1996), e a natureza bifásica do conteúdo ruminal (fase sólida e fase líquida). A FDNfe é obtida multiplicando a quantidade de FDN no alimento pela proporção de partículas retidas na peneira de 1,18mm. Neste modelo é assumido que FDN é uniformemente distribuído entre todos os tamanhos de partículas; que a atividade mastigatória é igual para todas as partículas retidas na peneira de 1,18mm; e que a facilidade de redução do tamanho de partículas (fragilidade) não é diferente entre diversas fontes de FDN.

Sugerem ainda, que um mínimo de 22% de FDNfe deva estar contido nas dietas, para que os animais tenham pH ruminal médio de 6,0 ou, o nível de 20% de FDNfe deve ser considerado para que possam ter atividade mastigatória aceitável, sem que haja queda na concentração de gordura no leite inferior a 3,4%.

Zebeli et al. (2012) sugerem que a dieta deva conter 31,2% de FDNfe com partículas acima de 1,18 mm ou 18,5% de partículas acima de 8 mm na dieta, para que a saúde do rúmen seja mantida. Entretanto, também notaram que ter mais do que 14,9% de FDNfe de partículas de 8 mm pode diminuir consumo de matéria seca. Sugerem desta maneira que pesquisas devam desenvolver dietas que aumentem o potencial fermentativo proporcionando maior digestibilidade ou maior densidade energética, sem que seja necessário modular os níveis de fibra fisicamente efetiva.

O desafio para adequada formulação de dietas com adequado fornecimento de fibra é encontrar um método em que possibilite análise simples e que obtenha boa repetibilidade (CACCAMO et al., 2014). Diante disso, Lammers et al. (1996), desenvolveram um equipamento simples, de uso à campo, que estima o tamanho de partículas de forragens e da ração total (Penn State Particle Separator, PSPS) com 2 peneiras sobrepostas verticalmente de 19,0 mm e 8,0 mm. Posteriormente Kononoff et al. (2003) propuseram o uso deste equipamento adicionado de uma terceira peneira com 1,18 mm de tamanho (KONONOFF et al., 2003).

Um guia publicado por Heinrichs e Kononoff (2002) recomenda que adequada mastigação é mantida quando a ração total contém 2 a 8% de material na primeira peneira (19,0 mm), 30 to 50% de material na peneira média (8 mm), 30 a 50% de material na peneira de baixo (1,18 mm), e menos de 20% deve estar retida na caixa do fundo. Esta proposta de Kononoff et al. (2003) é sugerida devido ao fato de partículas de tamanho de 1,18mm também colaborarem na formação da rede ruminal.

Usar uma variável animal para medida de quantidade e qualidade de fibra é adequado na tentativa de complementar as medidas laboratoriais deste nutriente (ARMENTANO; PEREIRA, 1997). Tempo de mastigação do animal é fortemente correlacionado com tamanho de partículas de uma dieta bem como a quantidade de FDN vinda de forragem sendo uma excelente variável de resposta física da fibra em dietas (WOODFORD et al., 1986).

3.3 FATORES QUE AFETAM CONSUMO E DIGESTIBILIDADE DE FORRAGENS

O desaparecimento da FDN no rúmen é resultado do processo competitivo entre digestão e passagem. Embora aumentando o tempo de retenção de alimentos no rúmen aumente a digestibilidade, isto pode entretanto, diminuir o consumo de alimentos (HUHTANEN et al., 2006; KRIZSAN et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2011). Uma unidade percentual de aumento na degradabilidade da FDN de forragem no rúmen tem sido relacionado ao aumento de 0,17 kg/dia no consumo de matéria seca e 0,25 kg/dia de leite corrigido para gordura (OBA; ALLEN, 1999). Da mesma maneira, aumento de 0,12 kg/dia de consumo de matéria seca e 0,14 kg/dia de leite corrigido para gordura, com a mesma elevação no percentual de degradabilidade da FDN são reportados por Jung et al. (2004). Além disso, a degradabilidade da FDN no rúmen estando aumentada, há maior estímulo de síntese de proteína microbiana ruminal (OBA; ALLEN, 2000).

Vários fatores podem interferir na dinâmica de degradação e trânsito pelo trato digestório da FDN entre os quais podem-se relatar: o animal (HUHTANEN et al., 2006) como um fator interno, e fatores externos, como tamanho das partículas, taxa de redução das partículas, proporção das frações potencialmente degradáveis (FDN_{pd}) e indegradáveis (FDN_i), gravidade específica funcional, proporção de forragem vs.

concentrado, tipo de forragem e suas espécies, estágio de maturidade da planta, relação folha: caule (LUND, 2002; KUOPPALA et al., 2009, 2010) e população microbiana ruminal (ALLEN; MERTENS, 1988).

O fator ambiental tem forte influência na qualidade das forragens de modo que quando há alta humidade e alta temperatura (período de safra em países tropicais como Brasil) durante o estágio vegetativo de crescimento, a digestibilidade das plantas é menor do que quando há restrição destes fatores (VAN SOEST et al., 1978).

Muitas estratégias foram desenvolvidas na tentativa de melhorar a qualidade da forragem para os ruminantes aumentando sua digestibilidade, como por exemplo tratamento físicos com vapor, calor, e com pressão; tratamentos químicos com ácidos, bases, NH_3 e ozônio; e biológicos com utilização de fungos bem como via melhoramento genético. Mas devido ao custo, dificuldade de obtenção e perdas excessivas de matéria seca, estes métodos não têm sido utilizados amplamente no cenário pecuário (LYNCH et al., 2013). Atualmente esforços têm sido concentrados nos estudos com enzimas fibrolíticas exógenas (EFE) no intuito de melhorar a digestibilidade das forragens e, conseqüentemente, aumentar a produtividade animal (MEALE et al. 2014).

3.4 PAREDE CELULAR VS. FIBRA

Frequentemente cientistas que trabalham com agricultura e produção animal usam os termos parede celular e fibra indistintamente, quando se discute qualidade de forragens. Parede celular é um termo histológico para definir um conjunto de compostos (polissacarídeos, proteínas) que formam a estrutura de uma célula vegetal. Ou seja, este termo “agronômico” indica os componentes presentes na célula vegetal que são biossintetizadas por genes da célula vegetal (IIYAMA et al., 1993). Entretanto, fibra é uma entidade meramente nutricional que revelam os componentes do alimento que possuem baixa solubilidade em sistemas de solventes específicos obtendo menos digestibilidade relativa aos carboidratos não fibrosos (JUNG; ALLEN, 1995). Sua definição está ligada ao método laboratorial utilizado para sua obtenção (MERTENS, 1997).

Em algumas circunstâncias o conteúdo de parede celular pode ser semelhante ao de FDN, por exemplo quando a quantidade de parede celular de uma gramínea com maturidade avançada é comparada à sua quantidade de fibra (FDN). Como gramíneas tem pouca quantidade de pectina, componente este solúvel em solução de FDN, possuirá grande quantidade de parede celular insolúvel em solução de FDN, obtendo valores semelhantes ao de parede celular. Já as leguminosas por possuírem grande proporção de pectina, obterá quantidade de parede celular maior do que a de fibra (JUNG; ALLEN, 1995). Embora a pectina esteja contida na parede celular das plantas vegetais, seu comportamento ruminal não é semelhante às fibras, ou seja, ela é rapidamente degradada na fermentação ruminal, não sendo recuperada pelo sistema de FDN de Van Soest (GOES et al., 2004).

Como a composição da fibra consiste principalmente de celulose, hemicelulose e lignina, será discorrido nesta revisão sobre estes compostos para que se conheça suas estruturas e como se interagem alterando desta forma a digestão das forragens pelos ruminantes.

3.5 A PAREDE CELULAR VEGETAL

Tecidos de plantas diferem enormemente quanto ao seu tamanho e organização. Alguns tipos de células, por exemplo as do mesófilo, tem fina parede celular com pequenas quantidades de lignina, sendo facilmente degradadas por enzimas que hidrolisam polissacarídeos. Já outras células, como as do esclerênquima, têm parede celulares espessas como a lamela média altamente lignificada, as quais podem modular a taxa e a direção de adesão de microrganismos que às degradam (LYND et al., 2002).

A principal característica da célula vegetal é possuir uma fina e muito resistente parede celular (TAIZ; ZEIGER, 2002). Embora toda a parede celular das plantas possua uma conformação básica similar, existem importantes diferenças entre os maiores grupos taxonômicos de forragens quanto a sua composição e estrutura química. Por exemplo, folhas de leguminosas contém muito menos parede celular do que folhas de gramíneas, em que a primeira não apresenta aumento na concentração de parede celular

com a maturação da planta, diferentemente das gramíneas (WILMAN; ALTIMIMI, 1984).

A parede celular das plantas é dividida em dois tipos básicos: parede primária e secundária. A parede primária é a parte mais externa da célula vegetal e responsável pela divisão e consequente crescimento das plantas, conformando a parte macia das células do parênquima paliçada das folhas bem como de toda a estrutura da planta. Os polissacarídeos que a compõe conferem entre 80-90%, podendo variar em suas proporções, e 10-20% é composta de proteína (MOHNEN et al., 2008).

A parede primária é uma estrutura polimérica heterogênea e dinâmica composta por compostos interligados entre si os quais pode-se citar a celulose que tem a função de suportar altas mudanças de tensão de turgor e alongação, a hemicelulose heterogênea (xilanas, mananase e xiloglicanas) que tem a função de ligar-se a celulose e manter suas microfibrilas separadas, a pectina sendo responsável pela adesão entre células (GILBERT, 2010), sendo que as duas últimas conferem maior viscoelasticidade da matrix da parede celular (CHANLIAUD et al., 2002) e por fim, o ácido fenólico, mas sem a deposição de lignina (JUNG; ALLEN, 1995).

A parede secundária é mais interna e é fundamental para o suporte mecânico da planta bem como provê habilidade para transportar solutos, o que foi indispensável para a evolucionária invasão terrestre das plantas (DIDI et al., 2015). É composta por células especializadas na sustentação da planta, dentre elas as células do xilema do feixe vascular. Quando o alongamento da célula vegetal cessa, a parede secundária deposita-se sobre a parede primária, se espessando progressivamente em direção ao centro da célula (BACIC et al., 1988) com material rico em celulose. Neste momento ainda há deposição de xilana, mas a celulose supera esta deposição (JUNG, 1997). A parede secundária é composta principalmente por celulose, hemicelulose (β -1,4-xilana, que é mais rígida) e lignina (MOHNEN et al., 2008) que começa a se depositar na célula com o início da formação da parede secundária.

A dinâmica de formação da parede celular secundária é principalmente relacionada às células do tecido vascular, como o esclerênquima (WILSON, 1993). Células do mesófilo e do parênquima acumulam muito pouca parede celular secundária e lignina, desta forma a digestibilidade, composição e concentração dos compostos da parede celular dos tecidos de plantas diferem drasticamente.

Embora seja possível analisar os parâmetros estruturais relacionados a cada composto da parede celular, os procedimentos laboratoriais para isolamento de cada um

deles são onerosos, deste modo a composição média da parede celular é analisada originando o termo fibra, a qual pode ter impacto significativo sobre a eficiência produtiva dos ruminantes quando tem baixa digestibilidade (JUNG, 1997).

3.5.1 Celulose

A celulose é um polímero de cadeia longa semelhante a fios formada pela união de β -glicoses que são tipicamente compostos por forças de Van der Waals e pontes de hidrogênio na estrutura cristalina. Estas estruturas cristalinas contém cerca de 500 a 14.000 β -1,4-ligações de moléculas de glicose e formam a fibrila elementar que a compõe (protofibrilas). As junções dessas protofibrilas formam as microfibrilas (BIDLACK et al., 1992; LYND et al., 2002). É o carboidrato mais abundante da parede celular e tem um papel central em sua formação, pois estudos demonstraram que uma deficiência da célula em produzi-la pode alterar a organização espacial de polissacarídeos não-celulósicos e da lignina (GIGER-REVERDIN, 1995; TURNER; SOMERVILLE, 1997).

Quando a celulose é isolada de células de forragens, ela contém cerca de 15% de pentoses (principalmente xilose e alguma arabinose), sílica e cutina. Estes compostos são considerados contaminantes da recuperação da celulose, mas se forem retirados, junto com eles saem resíduos de celulose, destruindo-a. Entretanto o isolamento da celulose na tentativa de se estudar ela purificada não é de grande importância, pois sua ocorrência na natureza é mínima, pois geralmente está combinada com hemicelulose e lignina (VAN SOEST, 1994).

A digestibilidade da celulose varia de totalmente indigestível para completamente digestível dependendo da amplitude de sua lignificação e outros fatores que afetam sua disponibilidade (VAN SOEST, 1994). Entretanto, a existência de dois tipos de celulose, a disponível e a indisponível, mostra a desuniformidade da sua digestibilidade mesmo quando se estuda frações de celulose não lignificadas.

A qualidade nutritiva da celulose se mostra totalmente independente da lignificação quando se trabalha com frações não lignificadas, podendo apresentar duas regiões distintas, como a cristalizada e a amorfa. A cristalização das microfibrilas formam cristais de celulose de alta pureza que são altamente resistentes e impedem a

penetração de enzimas e pequenas moléculas, como por exemplo a água (LYND et al., 2002; SAMIR et al., 2005). Conseguem diminuir a taxa de degradação por diminuir a área de contato entre elas, quando comparada a celulose contida em uma mistura de hemicelulose e lignina, mas relativamente sua digestão ainda é maior (VAN SOEST, 1973). Já as regiões amorfas são ricas em hemicelulose e lignina, sendo menos digestível pela malha complexa que formam (VAN SOEST, 1994).

3.5.2 Hemicelulose

A hemicelulose é um conjunto heterogêneo de polissacarídeos amorfos com grau de polimerização muito inferior ao da celulose (50 a 250) que variam enormemente entre diferentes plantas (VAN SOEST, 1994). Existem evidências de que, em média, o número de polissacarídeos diferentes, caracterizados como hemicelulose nas espécies vegetais, não excede a três ou quatro (SILVA et al., 1998). É composto por pentoses (xilanas - D-xiloses ligadas por ligações β 1-4 - e arabinose - derivado de ácido urônico), hexoses (manose, glicose, galactose) e açúcar ácido (acético) (SAHA, 2003). São classificados de acordo com o açúcar principal encontrado na cadeia principal e na ramificação lateral as quais interagem facilmente com a celulose, dando estabilidade e flexibilidade à molécula (RAMOS, 2003).

Devido a heterogeneidade encontrada na composição das hemiceluloses, não existem provavelmente cadeias químicas entre celulose e hemicelulose mas sim uma adesão mútua que é fornecida por ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals. No entanto, diferentemente da celulose, as hemiceluloses apresentam grande variedade de açúcares nas ramificações, o que impede a formação de grandes regiões cristalinas. Assim sendo, são mais susceptíveis ao ataque enzimático. No entanto, suas ramificações bloqueiam a clivagem em determinados locais fazendo-a uma estrutura mais complexa de ser degradada do que a celulose (JOVANOVIĆ et al., 2009).

As principais hemiceluloses encontradas em plantas são os xiloglucanos (XyG), os glucuronoarabinoxilanos (GAX) e os mananos (MN). Em todos os casos, há uma cadeia principal de monossacarídeos de glicose, xilose e manose, respectivamente, que podem ser ramificadas com diferentes monossacarídeos sendo os GAX's mais

encontrados nas paredes celulares das gramíneas (família Poaceae – planta de milho) (BUCKERIDGE, 2010).

As xilanas são encontradas entre as moléculas de lignina e as fibras de celulose complexadas e covalentemente ligadas em vários pontos de sobreposição das bainhas de lignina, produzindo uma capa ao redor, interpondo os fios de celulose por pontes de hidrogênio. Este complexo é importante para manter a integridade da celulose protegendo-a contra o ataque das celulasas (FILHO, 1994).

A digestibilidade da hemicelulose é diretamente ligada à quantidade de celulose na planta, entretanto, é inversamente correlacionada com o grau de lignificação. Além disso, é o composto que mais se liga intimamente à lignina (SULLIVAN, 1966). A digestão da hemicelulose em não-ruminantes é relativamente maior do que a celulose, diferentemente dos ruminantes que digerem ambos de maneira semelhante (VAN SOEST, 1994) mas a digestão ocorre mais rapidamente quando a proporção de hemicelulose é maior, principalmente em gramíneas (SMITH et al., 1972). A digestão ruminal de hemicelulose, entretanto, pode ser limitada, escapando para o intestino grosso onde é digerida, ocorrendo devido a limitação da celulose ligando a hemicelulose, ou pelo fato de as xilanas não poderem ser atacadas enquanto existe o grupo arabinosil em sua cadeia (FRANCIS et al., 1978). Este grupo arabinosil pode ser sensível ao ácido gástrico disponibilizando-o para o trato digestório inferior (VAN SOEST, 1994).

3.5.3 Lignina

A lignina é um polímero de hidroxicinamóil álcool em que ácidos fenólicos ou não-fenólicos podem se ligar por uma reação de radicais livres direcionando-a assim à polimerização (JUNG; ALLEN, 1995) a qual enrijece os feixes de bainhas presentes no parênquima em torno de cada feixe vascular (WILSON, 1993).

A lignina está ligada com os polissacarídeos, por ligações diretas glicosídicas, por ligações ésteres ou por ligações do tipo éter (LAM et al., 1992). É o composto que mais afeta a disponibilidade do material da parede celular vegetal para a taxa de digestão anaeróbica (JUNG; DEETZ, 1993; VAN SOEST, 1994; SEWALT et al., 1997) e sua extensão, que depende da composição desta lignina (BUXTON; BRASCHE, 1991). Assim, lignina reduz a proporção da fibra em detergente neutro potencialmente

digestível das forragens pela blindagem exercida sobre os polissacarídeos da parede celular (JUNG; ALLEN, 1995).

Sua exata influência nos tecidos das plantas ainda é debatida (REEVES, 1993) sendo este fato a base para o conhecimento biológico desta entidade indegradável que está envolvida na proteção física das plantas contra o ataque de herbívoros (VAN SOEST, 1994).

A deposição da lignina inicia-se da lamela média (parede primária) em direção à parede secundária (TERASHIMA et al., 1993), mostrando assim, o porquê de os microrganismos degradar as células das plantas do lúmen em direção à parede primária (ENGELS, 1989). Ela atua como barreira física para ação das enzimas microbianas que digerem polissacarídeos fazendo com que diminua a taxa de degradação da celulose e hemicelulose, limitando a energia digestível para os ruminantes (JUNG; VOGEL, 1986; JUNG; ALLEN, 1995).

3.6 HIDRÓLISE RUMINAL DA PAREDE CELULAR DE FORRAGENS

O rúmen é um ecossistema microbiano diverso e único. Seu meio é anaeróbico, com mínimo de oxigênio tolerável. Sua temperatura fica em torno de 39 a 42°C, com pH variando entre 6,0 e 7,0 o qual é regulado pela constante extração de ácidos pelo epitélio ruminal e pelo sistema de tamponamento gerado pela saliva. Há presença constante de substratos em seu interior bem como de atividade fermentativa. Estes fatores favorecem a presença de três tipos de microrganismos ativos que vivem em uma relação simbiótica com o hospedeiro, que são as bactérias, protozoários e fungos (VAN SOEST, 1994).

Quase a totalidade dos nutrientes ingeridos pelos animais ruminantes são moléculas complexas de alto peso molecular, o que as tornam indisponíveis às células microbianas que colonizam o rúmen. Para que as bactérias consigam suprir suas necessidades nutricionais uma degradação prévia dessas complexas moléculas em unidades monoméricas é necessária no ambiente extracelular, em que o amido e a celulose são degradados até mono ou dissacarídeos e, as proteínas até aminoácidos ou pequenos peptídeos (KOZLOSKY, 2009).

Os microrganismos rapidamente associam e aderem às partículas de alimentos ingeridas (CHENG et al., 1984) na forma de biofilmes, ou seja, formas compactas de populações bacterianas aderidas entre si e à superfície das partículas alimentares. Ali se protegem do engolfamento de protozoários e não ficam dispersas no fluido ruminal, diminuindo sua taxa de passagem e aumentando sua sobrevivência no rúmen (MACALLISTER et al., 1994). Esses microrganismos são adaptados a microambientes específicos no trato digestório, no fluido ruminal e na superfície das partículas alimentares (MACALLISTER et al., 1994; NUSSIO et al., 2011).

Esse mecanismo de degradação é preferencialmente por hidrólise catalisada, permitindo assim a aproximação das enzimas a seus substratos tendo um importante papel na competição por nutrientes entre as espécies bacterianas (KOZLOSKY, 2009). Sabe-se que 70 a 80% da massa microbiana do rúmen é composta por microrganismos que estão levemente ou fortemente associada às partículas de alimento (CRAIG et al., 1987), as quais são responsáveis por 80% da atividade endoglucanase intraruminal (MACALLISTER et al., 1994).

Para que os microrganismos consigam digerir partículas de alimentos, é necessário que as enzimas digestivas microbianas se justaponham a seus substratos específicos, e assim concentrem a atividade em pequena área na fase sólida, recebendo grande proporção de nutrientes. Isto foi demonstrado observando que baixa concentração de metilcelulose bloqueia a adesão de bactérias e fungos à celulose diminuindo sua digestão (NUSSIO et al., 2011). Diferente dos microrganismos de fase sólida, os de fase líquida devem buscar continuamente novas fontes de substratos o que é evidenciado em animais com restrição alimentar, pois, não há substratos solúveis para esta classe de bactérias em certo período do ciclo alimentar (JOHNSON et al., 1976).

Existem três populações microbianas distintas que interagem com partículas de alimentos: 1) aqueles associados ao fluido ruminal; 2) os que estão levemente aderidos às partículas de alimento; e 3) aqueles firmemente aderidos às partículas de alimento (MACALLISTER et al., 1994).

As fases de adesão bacteriana às partículas de alimento podem ocorrer em 24 horas e didaticamente podem ser divididas em quatro fases, de acordo com Koslozky (2009): Fase 1- acontece com poucos minutos após a ingestão de alimentos, e consiste do contato aleatório das populações bacterianas no fluido ruminal com a partícula recém-ingrida; Fase 2- ocorre adesão não-específica, por meio de moléculas chamadas glicocálix que fazem ligações iônicas, hidrofóbicas e forças de Van Der Waals; Fase 3-

interação específica de moléculas presentes na superfície externa bacteriana (adesinas) reconhecendo receptores na partícula; Fase 4- proliferação celular (biofilmes) nas áreas expostas que podem ser digestíveis.

A energia proveniente de carboidratos consumida pelos ruminantes geralmente está na forma de polissacarídeos presentes na parede das células vegetais como: carboidratos fibrosos – celulose, hemicelulose e pectina - ou na forma de polissacarídeos de reserva das plantas como: carboidratos não-fibrosos – principalmente amido (BERGMAN et al., 1990). Para que se consiga degradar os polissacarídeos no rúmen, sistemas enzimáticos associados às membranas dos microrganismos ou livres atuam para que disponibilizem monômeros de carboidratos (como glicose extracelular e piruvato intracelular) para seu uso (VAN SOEST, 1994).

3.6.1 Digestão da celulose

O modelo de degradação da celulose é baseado principalmente nos sistemas enzimáticos encontrados em fungos aeróbios, no qual dados cinéticos ou relacionados à especificidade enzimática são as diretrizes (BANSAL et al., 2009).

Este modelo de digestão exibido pelos fungos mostra ser de importante função na digestão da fibra no ambiente ruminal (ERIKSSON et al., 1990). Desde a década de 70 é reconhecida a existência de fungos no ambiente ruminal, os quais eram confundidos com protozoários flagelados. Estes fungos possuem baixa taxa de renovação ruminal o que pode ser um problema para animais com altas taxas de passagem de nutrientes, pelo trato digestório, pois o ciclo de vida dos fungos pode ser comprometido e sua efetiva ação no substrato pode não acontecer completamente (VAN SOEST, 1994).

Os fungos possuem contribuição na massa total microbiana relativamente pequena em relação às bactérias, mas seus rizóides podem penetrar nos locais mais difíceis das junções entre celulosas cristalizadas da parede celular e liberar celulasas livres com ou sem módulos de ligação aos carboidratos, disponibilizando assim nutrientes que são transportados para nutrir seus esporângios (VANSOEST, 1994).

Como citado acima, os sistemas enzimáticos podem estar ou não complexados a módulos de ligação à carboidratos (MLC) que aumentam o potencial de degradação da

celulose. Estes MLC's são placas proteicas, aderidas às moléculas de enzimas ou à membranas de microrganismos, em que é observada regiões catalíticas e não catalíticas em sua composição e, tem como função aumentar o potencial catalítico das enzimas bem como eficiência de assimilação de nutrientes por microrganismos (BORASTON et al., 2004)

As enzimas produzidas por bactérias e fungos filamentosos, com ou sem MLC's, são amplamente estudadas por dominarem a aplicação nas indústrias de produção de etanol (NIEVES et al., 1998; GILBERT, 2007). As bactérias anaeróbicas, principalmente do gênero *Clostridium*, possuem MLC's complexados à sua membrana, os chamados celulosomas que também são muito estudados. Como há alta competição por nutrientes e falta de disponibilidade de ATP e pelo fato destas bactérias não possuírem a capacidade efetiva de penetração da parede celular, como os fungos, elas desenvolveram este recurso para obter acesso aos produtos da hidrólise (WILSON, 2008). O celulosoma é um sistema que tem se tornado bastante conhecido devido a necessidade de se encontrar diferentes formas de degradação de compostos ligno-celulósicos na indústria (RINCON et al., 2005).

Eficiente hidrólise da celulose exige a ação coordenada de três tipos de celulasas que serão discutidos a seguir (LIU et al., 2013). Os celulosomas (endoglucanases - EC 3.2.1.4) são constituídos de subunidades catalíticas (celulasas, glicosidades e xilanases) e não catalíticas (adesinas), responsáveis pela ligação do complexo enzimático ao substrato (BAYER et al., 1998). Estes fatores de adesão junto ao complexo multienzimático ficam aderidos à uma placa proteica que os organiza elevando, deste modo, o potencial de degradação da celulose por concentrá-los efetivamente em uma região específica do substrato quando há competição entre microrganismos (LEVY; SHOSEYOV, 2002).

Estes complexos enzimáticos são responsáveis pelo posicionamento e quebra das regiões cristalizadas da celulose, as quais são de difícil acesso pelos microrganismos criando, desta maneira, uma região amorfa. Além da ação das endoglucanases (1,4-D-glucano-4-glucanohidrolases (EC 3.2.1.4), existe a ação das exoglucanases (1,4-D-glucano glucanohidrolases - celodextranases - EC 3.2.1.74; 1,4-D-glucano celobiohidrolase- celobiohidrolases- EC 3.2.1.91) as quais removem unidades de celobiose do fim não redutor da cadeia da celulose. As celobioses, então formadas, são disponibilizadas para as β -glicosidases (EC 3.2.1.21) as quais hidrolisam as ligações β -

1,4 no interior e no final da cadeia das celobioses produzindo glicose como produto final, além de celodextrina e celobios (LIANG et al., 2011).

A região de adesão, por ser fisicamente limitada, pode criar uma competição entre células de microrganismos velhas e jovens, tornando esta zona na partícula com intenso metabolismo e consequente síntese celular (VANSOEST, 1994). O complexo enzimático tem sido encontrado com função mais efetiva na degradação de substratos ricos em celulose (BAYER et al., 1998) sendo que a retirada dessas MLC's das moléculas de celulase livres, ou da placa encontrada nos celulosomas, diminuiu drasticamente a degradação enzimática da celulose (CARRARD; LINDER, 1999).

3.6.2 Digestão da hemicelulose

As hemicelulases são compostas por uma miríade de atividades enzimáticas, com múltiplas enzimas envolvidas levando à maior atividade enzimática quando comparada às celulasas. Elas despolimerizam arabinoxilanos, bem como outros tipos de hemicelulose ricos em xilanas (SHALLOM; SHOHAM, 2003) e além disso, despolimerizam a cadeia principal da xilana devido a atividade das endoxilanases e β -xilosidases entre outras, como descrito a seguir por Rozanov et al. (2015).

Hemicelulasas incluem as seguintes atividades:

- **4-xilanohidrolase β -D-xilano - endoxilanase EC 3.2.1.8** - são glicosidases que catalisam a endohidrólise de ligações 1,4- β -D-xilosídica em xilanos e produzem xilooligômeros (SHALLOM; SHOHAM, 2003);
- **Xilohidrolase-4- β D-xilano - β -xilosidase EC 3.2.1.37** - β xilosidases são do tipo exo- β -glicosidases que catalisam a hidrólise de 1,4- β -D-xilanos (xilooligossacarídeos e xilobiose), e remove os resíduos sucessivos de D-xilose a partir da extremidade não redutora (BRENDA, 2013);
- **α -L-arabinofuranósido, extremidade não redutora; α -arabinosidase - EC 3.2.1.55** - são α -arabinosidases que catalisam a hidrólise de resíduos terminais não redutores α -L-arabinofuranósido em α -L-arabinofuranosídeos, arabinanos, arabinoxilanos e arabinogalactanos, liberando arabinose (POUTANEN, 1988);

- **α -Glucosiduronase; α -glucuronidase - EC 3.2.1.139** - Os α -glucuronidases catalisam a hidrólise de α - D-glucuronosídeo em um álcool e D-glucuronato (EXPLORENZ, 2015);
- **Acetilxilana esterase - EC 3.1.1.72** - catalisam a desacetilação de xilanos e xilo-oligossacáridos (HUMBERSTONE; BRIGGS, 2000);
- **4-Hidroxi-3-metoxicinamoil-açúcar hidrolase; ácido ferúlico esterase e ácido p-cumárico ácido esterase - EC 3.1.1.73** – as quais catalisam a hidrólise de feruloil de polissacarídeos esterificados para liberar ferulato (EXPLORENZ, 2015).

Além destas também existem a **manana endo-1,4-mananase (EC 3.2.1.78)**; - **1,4-manosidase (EC 3.2.1.25)**, e **endo-arabinanos- 1,5-l-arabinosidase (EC 3.2.1.99)** como citado por Rozanov et al. (2015).

Esterases ácido ferúlico e p-cumárico (composto fenólicos) tem sido recentemente o foco dos esforços para usá-las como potenciadores das enzimas fibrolíticas exógenas utilizado na alimentação de ruminantes (BEAUCHEMIN et al., 2004; KRUEGER et al., 2008a). Isto ocorre porque o éster de ligações entre ácido ferúlico e arabinose e p-cumárico limitam a digestibilidade da hemicelulose por microrganismos ruminais (FAULDS; WILLIAMSON, 1994). Embora as concentrações elevadas de ácidos fenólicos foram anteriormente consideradas tóxicas, Jung e Allen (1995) demonstraram que eles podem ser degradados por micróbios ruminais.

3.6.3 Papel da lignina na indigestibilidade da fibra

Geralmente ligninas são classificadas como guaiacil (formada predominantemente de álcool coniferil), guaiacil-seringil (copolímeros dos álcoois coniferil e sinapil) ou lignina guaiacil-siringil-p-hidroxifenil (formado pelos três monômeros), sendo de origem de plantas gimnosperma, angiospermas e gramíneas (EVERT, 2006). Ácido ferúlico e ácido p-cumárico formam pontes de éster e éter com lignina, mas somente ligações ésteres estão presente entre a lignina e a cadeia de polissacarídeos (RALPH; HELM, 1993). Ácido p-cumárico é esterificado ou eterificado para a lignina, mas não forma ligações cruzadas com os polissacarídeos por ligações ésteres e éter em gramíneas. Em contraste com o ácido ferúlico, o qual pode estar

envolvido nas ligações entre a lignina e arabinose (LAM et al., 1992). Ambos, ferulato e diferulato tem um papel importante na formação das ligações entre lignina e polissacarídeos, levando-os a diminuição na taxa e possivelmente a extensão de sua degradação (GRABBER et al., 1998; HATFIELD et al., 1999). Grabber (2005) mencionou que uma unidade de aumento na concentração de lignina deprime em duas unidades percentuais a digestibilidade do milho (*Zea mays*).

Como a lignina está ligada covalentemente à hemicelulose, e não à celulose, esperar-se-ia que os efeitos negativos afetassem somente a primeira (JUNG, 1989). Entretanto, a redução na digestibilidade da celulose pode acontecer, tanto quanto a redução da digestibilidade da hemicelulose (MORRISON, 1983) como resultado da ação limitada das celulasas sobre a celulose pois, os feixes de celulose se apresentam dispersos em uma matriz de hemicelulose e lignina (BRITO et al., 2003). O perfil da digestão da parede celular vegetal é ainda mais complexo e envolve além da quantidade de lignina presente, também a sua composição (DESCHAMPS, 1999), pois Jung e Deetz (1993) explanam que os vários tipos de lignina afetam diferentemente a digestibilidade da parede celular vegetal.

O efeito quantitativo da lignina em relação a digestibilidade da parede celular refere-se à blindagem ocorrida nos polissacarídeos impedindo assim a ação das polissacaridasas microbianas diminuindo a extensão, mas não a taxa da digestão (SMITH et al., 1972). Alguns estudos (KAMSTRA et al., 1958; TERRY; TILLEY, 1964; NASCIMENTO JR., 1974; JUNG; VOGEL, 1986; REEVES, 1987; HATFIELD, 1993; BURNS et al., 1997; DESCHAMPS, 1999) relatam que a quantidade de lignina na planta prejudica a digestibilidade, entretanto a maioria destes estudos quantificam dados de plantas inteiras com vários estádios de maturidade, desta maneira diminuindo a proporção de folha:caule mostrando aumento da lignificação (JUNG; ALLEN, 1995), fazem comparação de plantas com morfologias distintas devido à sua maturidade.

A mudança do clima durante estágios de crescimento da planta interfere com a quantidade de lignina despositada em seus tecidos. Isto foi demonstrado por Boon et al. (2008) quem estudaram dois cultivares de milho em dois anos diferentes. Concluíram que a temperatura elevada durante os estágios iniciais de crescimento da planta influencia a quantidade de lignina depositada em seus tecidos diminuindo assim a digestibilidade da planta.

Nutricionalmente a quantidade de lignina é relevante podendo indicar a qualidade da forragem a ser utilizada pelos animais, mas quanto ao perfil de lignina nos

tecidos de plantas de mesma maturidade este fato pode não ser válido (JUNG; ALLEN, 1995).

A composição da lignina, mudando de principalmente do tipo guaiacil para o tipo siringilo, altera com a mudança do estado de vegetativo para o reprodutivo, fazendo assim com que a parede celular das forragens diminua com a maturidade (TU et al., 2010). Isto revela a influência da composição da lignina na digestibilidade da parede celular de forragens (DESCHAMPS; RAMOS, 2002).

Há muita dificuldade em relatar qual real efeito da composição da lignina sobre a digestibilidade, pois os híbridos “Brown Mid-Rib” (BMR) possuem além de menor quantidade de lignina um aumento na proporção de lignina do tipo guaiacil. Deste modo pesquisadores julgam que o potencial aumento na digestibilidade deste material é a soma destes dois fatores (JUNG; ALLEN, 1995).

Ainda em relação à composição da lignina Deschamps e Ramos (2002) mostraram que gramíneas possuem maior quantidade de ácido fenólico, o qual poderia ter um efeito na taxa, mas não na extensão da digestão, devido aos microrganismos possuírem o efeito da ácido fenólico esterase tardio. Entretanto, o efeito oposto é observado, ou seja, a extensão da digestão é mais prejudicada do que sua taxa, por causa da estrutura das ligações ésteres e éter da molécula de ferulato à cadeia de arabinoxilanas e lignina.

Com a degradação das ligações ésteres, pela ácido fenólico esterase, acontece a proximidade da cadeia das moléculas de ferulato à cadeia principal, devido a ligação éter, não deixando, desta maneira, que a enzima esterase atue, diminuindo a extensão e não a taxa da digestão dos polissacarídeos (JUNG; DEETZ, 1993). Ou seja, com a digestão ocorrendo, aumenta-se a dificuldade em se digerir este complexo em que a lignina se liga aos polissacarídeos por causa das ligações éteres, as quais são degradadas com a presença de O_2 , o que não é o caso do ambiente ruminal (JUNG; ALLEN, 1995). Éteres de p-cumarato não estão ligados aos polissacarídeos, o que não afetam a digestão diretamente.

3.6.4 Atividade enzimática ruminal

A hidrólise da parede celular de plantas envolve inúmeras ações enzimáticas, entretanto os sistemas enzimáticos não são simplesmente uma aglomeração de enzimas, pois atuam de maneira coordenada e sinérgica para que a hidrólise ocorra eficientemente.

Enzimas são moléculas protéicas que catalisam reações químicas específicas nos sistemas biológicos e são produzidas pelas células animais e vegetais (LEHNINGER, 2007). São essenciais aos ruminantes porque estão envolvidas na hidrólise dos alimentos complexos em suas moléculas orgânicas mais simples, como glicose, celobiose, xilose, aminoácidos, ácidos graxos, que são então usadas pelos microrganismos do rúmen e/ou pelo animal (KOZLOSKY, 2009).

Há descrito 4 tipos de sinergia quanto às celulases: 1) endo-exo sinergia entre endoglucanases e exoglucanases; 2) exo-exo sinergia entre exoglucanases; 3) sinergia entre exoglucanases e β -glucosidases, e 4) sinergia intramolecular entre os domínios catalíticos e de adesão à celulose (LYND et al., 2002). Já quanto às hemicelulases existem descritas dois tipos de ações sinérgicas: a homeosinergia e a heterosinergia, em que a primeira ocorre entre enzimas acessórias ou entre enzimas de cadeias principais, já a segunda sinergia ocorre entre principais e acessórias (COUGHLAN et al., 1993).

Para que ocorra a digestão da fibra, os polissacarídeos da parede celular vegetal não são degradados isoladamente, devendo haver um sinergismo entre celulases e hemicelulases. As hemiceluloses são mais concentradas na superfície externa da parede celular vegetal, mas também difundem entre as fibrilas de celulose, agindo como uma barreira física limitando as celulases agirem sobre a celulose. As xilanases aliviam este problema deixando a celulose mais acessível às suas enzimas (HU et al., 2011).

É mostrado então que a digestão da parede celular vegetal envolve inúmeros fatores relacionados à qualidade da forragem a ser consumida pelo animal. Mas, além disso, envolve também complexos enzimáticos produzidos pelos microrganismos que agem de forma sinérgica para a degradação da fibra, liberando nutrientes para os microrganismos e consequentemente ao hospedeiro.

Como a maioria das enzimas, o produto de suas hidrólises pode inibir sua ação. Esta informação é muito importante na discussão de suplementação de enzimas comerciais para ruminantes, mostrando que há um desafio para os pesquisadores em

formular produtos com proporções ideais de cada tipo de enzima (celulases e hemicelulases, por exemplo) para que a inibição do produto não ocorra, assegurando desta maneira, a eficácia da enzima suplementada (WOOD; MCCRAE, 1986; BHAT et al., 1989; BHAT; HAZLEWOOD, 2001).

3.7 ENZIMAS FIBROLÍTICAS EXÓGENAS NA ALIMENTAÇÃO DE VACAS LEITEIRAS

A suposta ineficiência da microbiota ruminal em produzir enzimas para digerir a fração fibrosa de dietas, além de fatores intrínsecos ao alimento e à produtividade animal, são as principais propostas para pesquisadores desenvolverem recursos que melhorem o perfil fermentativo do rúmen (KRAUSE et al., 2003).

Na tentativa de melhorar o valor nutritivo dos alimentos tem sido usados vários tipos de suplementação de enzimas exógenas, tanto para não ruminantes como para ruminantes (FENG et al., 1996). O mercado de enzimas direcionado ao uso em ruminantes está começando a se desenvolver e fica abaixo do mercado da aquacultura, que ainda é pequeno, e também é relativamente desprezível quanto ao mercado de suínos e aves (BARLETTA, 2011).

O objetivo principal do uso de enzimas na dieta de ruminantes é diminuir o custo de produção de carne e leite. O custo de forragens e grão cereais tem se elevado no cenário mundial, e como consequência, produtores estão procurando alternativas para melhorar a eficiência de conversão alimentar. Muitas das pesquisas em ruminantes, estão focando no estudo de enzimas fibrolíticas exógenas na tentativa de melhorar a digestibilidade da fibra, elevando assim o consumo de energia digestível aumentando a produtividade dos animais (BEAUCHEMIN et al., 2003a; BEAUCHEMIN; HOLTSHAUSEN, 2011).

Na década de 60 o uso de enzimas exógenas foi investigado por alguns pesquisadores, mas os resultados variados, o alto custo de produção das mesmas e talvez o baixo apelo científico para a época, desestimulou esta linha de pesquisa (BEAUCHEMIN; RODE, 1996). Na última década o interesse pelo uso de enzimas exógenas nas dietas de ruminantes tem sido demonstrado por alguns grupos de

pesquisas, provavelmente pelo aumento no preço dos alimentos e o baixo preço de produção das enzimas de melhor qualidade (BEAUCHEMIN et al., 2003a).

3.7.1 Enzimas Fibrolíticas Exógenas

Enzimas com atividade xilanase são produzidas e secretadas por diversos microrganismos como bactérias, algas e fungos, sendo quase exclusivamente simples subunidades proteicas. Comercialmente são utilizadas cepas clássicas ou geneticamente modificadas para produzi-las em que o fungo filamentoso *Trichoderma* spp. é um dos mais bem conhecidos sistemas de produção industriais (PALOHEIMO et al., 2011).

Estes microrganismos produzem grande quantidade destas enzimas, são não-patogênicos e são facilmente cultiváveis. A cepa clássica produz, além de uma mistura de enzimas desuniforme, uma grande quantidade de toxinas e ácidos que prejudicam a produção delas mesmas. Deste modo, a engenharia genética tem um importante papel na melhoria da eficiência de produção de enzimas por direcionar a produção de um componente principal desejado pela manipulação dos genes (PALOHEIMO et al., 2011).

Outro fator que direciona a produção da enzima desejada é o substrato em que o microrganismo é mantido durante a produção, pois se é colocado grande concentração de celulose a enzima predominantemente produzida é a celulase, mas se é mantido grande quantidade de xilana no meio, maior concentração de xilanase é observada (KULKARNI et al., 1999).

3.7.2 Mecanismo de ação das enzimas fibrolíticas exógenas

Nem todos os sítios ativos dos substratos estão ocupados pela atuação microbiana, deste modo, o aumento na concentração de enzimas fibrolíticas exógenas pode proporcionar aumento na taxa de digestão de alimentos fibrosos, potencializando a intensa atividade microbiana ruminal (DEHORITY; TIRABASSO, 1998) melhorando a degradabilidade da fibra e elevando o consumo de matéria seca (BEAUCHEMIN;

HOLTSHAUSEN, 2011) em função de diminuir o efeito de enchimento ruminal (DADO; ALLEN, 1995).

O mecanismo de ação das enzimas exógenas adicionadas em dietas de ruminantes não é totalmente conhecido (BEAUCHEMIN; HOLTSHAUSEN, 2011; NUSSIO et al., 2011). Cheng (1995) sugere que o ganho de produtividade observado em alguns estudos pode ser devido ao aumento da digestibilidade da fibra. Isto ocorre possivelmente devido ao fato da melhora na colonização das partículas alimentares, como mostrado pelo trabalho de Martins et al. (2007), os quais observaram aumento na colonização da fibra com a adição de enzimas fibrolíticas aos substratos, quando avaliaram imagens de microscopia de varredura. Outra hipótese é de que as enzimas poderiam estimular a atividade enzimática endógena ruminal, ou seja, aumentam o potencial de hidrólise na fermentação ruminal (MORGAVI et al., 2000).

Com a exposição prévia do alimento às enzimas pode-se aumentar o ataque sobre as fibras das plantas com consequente solubilização da FDN e FDA e liberação de açúcares redutores. Esta liberação de açúcares redutores pode aumentar o crescimento microbiano encurtando o tempo para início da colonização dos substratos (BEAUCHEMIN et al., 2003a).

Após a alimentação a redução do pH e menor atividade proteolítica ajuda aumentar a estabilidade das enzimas (MORGAVI et al., 2001). Geralmente as enzimas exógenas atuam mais eficientemente no ambiente ruminal com pH em torno de 5,5-6,8. Entretanto, enzimas de *Trichoderma* spp., podem atuar eficientemente com pH menores e temperaturas maiores do que são encontrados tipicamente (BEAUCHEMIN; HOLTSHAUSEN, 2011).

Beauchemin et al. (2003a) afirmaram que as enzimas fibrolíticas exógenas só degradam substratos que seriam naturalmente digeridos pelos microrganismos ruminais, pois, não são vistos melhoras na extensão da digestão da fibra, provendo efeitos significativos na taxa de degradação.

A suplementação de enzimas fibrolíticas exógenas pode aumentar a atividade enzimática no rúmen como visto por Beauchemin e Rode (1996) que obtiveram aumento de 15% na atividade da celulase, e Wallace (2001) que obteve aumento de 5% da atividade xilanase. Mas este efeito é dependente da quantidade de enzimas que são inseridas nas dietas. Morgavi et al. (2000) demonstraram significativa sinergia entre enzimas exógenas e enzimas microbianas, em que uma potencializa a ação da outra. Estes autores combinaram enzimas de *Trichoderma longibrachiatum* com extrato de

enzimas ruminais de bovinos recebendo dietas com alta concentração de fibra ou alta concentração de concentrado. Observaram que a hidrólise da celulose e da xilana aumentaram 35 e 100%, respectivamente. Além disso, a hidrólise da silagem de milho aumentou 40%.

O efeito pós-ruminal de enzimas fibrolíticas exógenas é ainda pouco conhecido. Em animais não ruminantes, enzimas exógenas agem diminuindo a viscosidade da digesta intestinal. A viscosidade de carboidratos não amiláceos no intestino é a hidratação de polissacarídeos não-amiláceos que altera o trânsito intestinal, modifica a mucosa intestinal com diminuição da ação de enzimas o que leva à consequente mudanças homeorréticas devido à diferentes taxas de absorção de nutrientes.

O animal não-ruminante possui viscosidade de >400 cPoise e o ruminante possui viscosidade de 1 a 2 cPoise, dificultando a compreensão de como as enzimas conseguem declinar a viscosidade do intestino de ruminantes (BEAUCHEMIN et al., 2003a). Quando Hristov et al. (1998) suplementaram celulase e amilase diretamente no abomaso não viram diferença na concentração delas no intestino, provavelmente, por causa da baixa resistência ao baixo pH e à proteólise pela pepsina. Entretanto, a infusão de xilanase aumentou 12 a 30 vezes sua concentração no intestino, diminuindo a viscosidade, potencialmente aumentando a absorção de nutrientes, mas sem interferência na digestibilidade do trato total (MORGAVI et al., 2001).

3.7.3 Enzimas fibrolíticas exógenas e desempenho de vacas leiteiras

É difícil chegar a uma compilação de dados que confirmem como se dá a atuação das enzimas no desempenho de vacas leiteiras, pois há grande interferência do tempo nos produtos enzimáticos, ou seja, a enzima que foi usada em um experimento na década de 90 é, ou pode ser, muito diferente da qual é usada atualmente, pois os produtos comerciais utilizados comumente são um conjunto de celulasas e xilanasas, alterando seu perfil e sua atividade significativamente entre os estudos (BEAUCHEMIN et al., 2003).

Além disso, fatores como tipo de animais (ovinos, caprinos, bovinos), estágio produtivo (começo, meio, final de lactação), tipo de forragem (gramíneas, leguminosas) e forma de fornecimento da enzima (direto no rúmen, no alimento), ajudam a aumentar

o confundimento na interpretação dos dados (BEAUCHEMIM; HOLTSHAUSEN, 2011).

Beauchemim et al. (2003), em excelente revisão sobre suplementação de enzimas fibrolíticas exógenas, compilaram dados de 20 estudos que englobam de 1995 até o ano 2001, em vacas leiteiras lactantes, e demonstraram que houve aumento de $1,0 \pm 1,3$ kg/dia no consumo de matéria seca, levando a um aumento de produção de $1,1 \pm 1,5$ kg/dia (3,4% de gordura). Entretanto, foi observada alta variabilidade nos produtos enzimáticos utilizados e na forma de fornecimento entre os experimentos.

Lewis et al. (1999) aplicando enzimas em forragens contendo solução de celulases e xilanases, previamente ao fornecimento, constataram maior produção de leite (27,2 vs. 25,9 kg/dia) e maior digestão da matéria seca por dia (16,7 vs. 15,6 kg/dia), quando forneceram dietas contendo 19,1 % de feno de alfafa e 20,9% silagem de alfafa como forragens às vacas no terço médio da lactação.

Holtshausen et al. (2011) trabalharam com dois níveis de enzimas com atividade celulase e xilanase na dieta (0,5 e 1,0 ml de enzima/kg de matéria seca da ração total) de vacas leiteiras, encontraram melhoria de 11,3% na produção de leite corrigida para 3,5% de gordura (1,67 vs. 1,5 kg de leite corrigido/kg matéria seca consumida) na dieta com 1,0 ml de enzima/kg de matéria seca da ração total. Especulam que estes resultados possam ser devido ao aumento da digestibilidade da FDN da dieta.

Rode et al. (1999) avaliaram 20 vacas multíparas no início da lactação para investigar o efeito da adição de 1,3 g/kg de enzima fibrolítica (com atividade celulase e xilanase) por kg de matéria seca da ração total, e avaliaram o consumo de matéria seca, digestibilidade e produção de leite. A ração total continha 24% de silagem de milho, 15% de feno de alfafa e 61% de concentrado. Não foi encontrado efeito no consumo de matéria seca pelo tratamento com a enzima, entretanto a digestibilidade aparente total da matéria seca, fibra em detergente neutro, fibra em detergente ácido, proteína bruta aumentaram. A produção de leite tendeu a aumentar (35,9 vs. 39,5 kg/dia). Concluindo, a eficiência de produção de leite poderia ser melhorada neste experimento, mas não foi analisada.

Assim como no estudo anterior, Kung et al. (2002) avaliaram a inclusão de diferentes combinações de enzimas fibrolíticas com atividade celulase e xilanase na dieta de vacas lactantes durante 12 semanas (93 ± 47 dias em lactação, com média de 40 kg leite/dia), adicionando-a ao volumoso no momento da mistura com o concentrado (proporção de 45% de volumoso e 55% de concentrado). Encontraram tendência de

aumento de 2,5 kg/leite/dia na produção de leite corrigido para 3,5% de gordura das vacas tratadas com enzimas com relação às dietas sem enzimas. O consumo de matéria seca, produção e composição do leite não foram influenciados pelas dietas experimentais.

No estudo de Schingoethe et al. (1999) em que vacas foram alimentadas com dietas contendo 55% de volumoso e 45% de concentrado ou 45% de volumoso e 55% de concentrado, e fornecidas enzimas fibrolíticas com atividade celulase e xilanase momentos antes do fornecimento da dieta, não foi observado efeito na produção e na composição do leite de vacas com média de 121 dias em lactação. Entretanto, quando avaliaram vacas durante 12 semanas de pós-parto (média de 64 dias em lactação), conferiram aumento na produção de leite com a adição de enzima fibrolítica. O consumo de matéria seca não foi alterado em nenhuma das avaliações.

A adição de enzimas nos alimentos, um período antes do fornecimento aos animais, tem mostrado melhor eficácia quando comparado dados de animais que receberam a enzima diretamente no rúmen, via cânula (FORSBERG et al., 1981), porém, Yang et al. (1999) mostraram em seu estudo que o desempenho de vacas leiteiras, com 74 ± 30 dias em lactação, alimentadas com dietas contendo 10% de silagem de cevada e 45 % de feno de alfafa é beneficiado (24,2 vs. 22,4 kg/dia, leite corrigido para 4% de gordura) pela adição de altas quantidades de enzimas fibrolíticas com atividade celulase e xilanase, no concentrado ou somente no feno, duas semanas antes da alimentação.

Estes autores esclarecem que a melhora não é causada pelo aumento no consumo, mas sim pelo aumento na digestibilidade dos alimentos (67,0 vs. 64,4% digestibilidade da matéria orgânica no trato digestório total; e 38,8 vs. 42,4% de digestibilidade da FDN no trato digestório total). Justificam os resultados alcançados pela quantidade fornecida e não pela forma de fornecimento, no concentrado ou no feno. Em adição, Treacher et al. (1997) especulam sobre as formas de fornecimentos das enzimas: diluída na água e pulverizada sobre os alimentos, ou diretamente no rúmen via cânula.

Para explicar tal fenômeno pode-se atentar que quando a enzima é diluída em água e aplicada antes da alimentação ela tem maior capacidade de aderir aos seus sítios de digestão no alimento (WANG et al., 2001), diferentemente de quando é adicionada via cânula no rúmen, pois, as bactérias ruminais já estão colonizando seus sítios de ligações o que leva a impossibilidade da ação das enzimas em seus substratos. Outra

hipótese é de que as enzimas proteolíticas dentro do rúmen produzidas pelos microrganismos às inativam.

Yang et al. (2000) testaram as formas de fornecimento de enzimas fibrolíticas com baixa atividade celulase e alta atividade xilanase no concentrado ou misturada diretamente no cocho como ração total. Quando forneceram a enzima misturada ao concentrado encontraram maior digestibilidade da matéria seca no trato total (66,6 % vs. 63,9%) quando comparadas às dietas controle, o que levou, consequentemente, ao aumento da produção de leite (37,4 vs. 35,3 kg leite/dia). Quando foi comparado o tratamento, cuja a enzima foi misturada na ração total, com a dieta controle (sem enzima), houve somente aumento na digestibilidade aparente total (65,7 % vs. 63,9%) da matéria seca, sem efeito na produção de leite (35,2 vs. 35,3 kg leite/dia), bem como no consumo de matéria seca.

É clara a variabilidade de resultados encontrados na literatura quanto ao uso de enzimas fibrolíticas exógenas na dieta de ruminantes, pois os métodos de fornecimento, quantidades fornecidas, tipo de enzimas são os mais variados possíveis. No intuito de esclarecer quanto ao método de fornecimento pode influenciar os resultados, Bowman et al. (2002) realizaram estudo em que testaram o fornecimento aos animais das seguintes maneiras: 1) dieta controle (sem enzima); 2) enzima foi aplicada no concentrado (45% da dieta); 3) enzima foi aplicada no suplemento mineral (4% da dieta) e 4) a enzima foi aplicada no núcleo mineral (0,2% da dieta). As dietas que continham enzima fibrolítica forneceram cerca de 1 g de enzima/animal/dia e as enzimas possuíam atividade celulase e xilanase, principalmente.

Neste estudo os resultados foram muito interessantes, mostrando que quando a enzima é fornecida no concentrado a produção de leite aumenta devido ao aumento na digestibilidade aparente da matéria seca consumida, pois não houve aumento no consumo de matéria seca. Todas as dietas com enzima aumentaram a digestibilidade da matéria orgânica, fibra em detergente neutro e fibra em detergente ácido, mas quando a enzima foi aplicada em porções reduzidas da dieta (núcleo mineral) e não pelo concentrado (45% da dieta) não foi mostrado o mesmo aumento quando comparadas à dieta controle.

A relação volumoso:concentrado na dieta de vacas leiteiras pode influenciar nos resultados obtidos quando se adiciona enzimas fibrolíticas na ração, como mostrado por Arriola et al. (2011), trabalhando com dois níveis de concentrado nas dietas de vacas leiteiras - 48% ou 33%. Estes autores observaram que a eficiência de produção de leite

corrigida para 3,5% de gordura foi melhor para a dieta com baixa quantidade de concentrado tratada com enzima fibrolítica, com atividade celulase, xilanase e esterase, do que a dieta com alta quantidade de concentrado sem o fornecimento de enzima fibrolítica, que pode ser explicado pela melhor digestibilidade da dieta melhorando, assim, a disponibilidade de energia para o animal que estava possivelmente limitada pela quantidade excessiva de volumoso.

Giraldo et al. (2007) em estudo *in vitro* encontraram efeito da adição de enzima exógena fibrolítica, com atividade celulase e xilanase, à substratos com 60% de feno de capim e 40% de concentrado, identificando aumento na produção de acetato, butirato e metano. Também, foi encontrado aumento na taxa de desaparecimento da matéria seca e da fibra com 6 e 48h de incubação, assim como o fluxo de nitrogênio microbiano, e a colonização microbiana que foram aumentados com 6h de incubação.

Chung et al. (2012) avaliaram 5 vacas multíparas e 4 primíparas canuladas no rúmen com dietas com proporção de 48% de forragem e 52% concentrado com os seguintes tratamentos: controle, com baixa e com alta concentração de enzima exógena fibrolítica com atividade celulase e xilanase (0,0; 0,5 e 1,0 mL de enzima/kg matéria seca da dieta total, respectivamente), e não encontraram efeito na produção de leite entre os tratamentos, bem como na produção de ácidos graxos de cadeia curta no rúmen, pH e N-NH₃. A produção de metano foi aumentada com a adição de enzima fibrolítica neste estudo, o que pode ser devido ao aumento na digestão ruminal dos alimentos (não avaliadas neste estudo).

De forma similar, Peters et al. (2010) trabalharam com 6 vacas da raça Holandesa, multíparas e canuladas no rúmen e no duodeno, com 98±30 dias em lactação, e forneceram dieta com proporção na matéria seca de 50% de volumoso (30% silagem de milho e 20% de silagem de capim) e 50% de concentrado, em delineamento *cross-over*, com a dieta controle (sem enzima) ou tratada (com enzima fibrolítica, com atividade celulase e xilanase, à 6,7 ml/kg matéria seca na ração total). Nenhum efeito foi encontrado com a adição da enzima na dieta quando foram avaliados o pH, concentração de N-NH₃, concentração e proporção de ácidos graxos de cadeia curta no rúmen, fluxo de nitrogênio microbiano para o duodeno, bem como a eficiência de síntese de produção de proteína microbiana. Do mesmo modo, não foi encontrado efeito da adição de enzimas fibrolíticas na produção e composição do leite, e também, nas digestibilidades aparente ruminal e total da matéria seca, matéria orgânica, FDN e FDA.

Knowlton et al. (2002) estudando vacas em início e final de lactação também não encontraram efeito da adição de enzima fibrolítica, com predominante atividade celulase, na produção de leite e sua composição, mas encontraram que há efeito na partição de nutrientes da dieta, o que fez com que as vacas ganhassem peso mais rápido quando se fornecia a enzima.

Uma ampla faixa de efeitos tem sido reportada na literatura com alta variabilidade da atividade enzimática principal. Alguns experimentos resultaram em aumento no consumo de matéria (LEWIS et al., 1999; YANG et al., 1999; BEAUCHEMIN et al., 2000; KUNG et al., 2000; YANG et al., 2000; BOWMAN et al., 2002; PINOS-RODRIGUEZ et al., 2002; GADO et al., 2009; HOLTSHAUSEN et al., 2011), aumento na digestibilidade *in vivo* (FENG et al., 1996; KRAUSE et al., 1998; RODE et al., 1999; YANG et al., 1999; BEAUCHEMIN et al., 2000; KUNG et al., 2000; BOWMAN et al., 2002; PINOS-RODRIGUEZ et al., 2002; KREUGER et al., 2008; GADO et al., 2009) e *in vitro* ou *in situ* (NAKASHIMA et al., 1988; FENG et al., 1996; HRISTOV et al., 1996; YANG et al., 1999; COLOMBATTO et al., 2000; COLOMBATTO et al., 2002; KRUEGER et al., 2008b; LLEWELLYN et al., 2010), aumento na produção de leite (LEWIS et al., 1999; RODE et al., 1999; SCHINGOETHE et al., 1999; YANG et al., 2000; ADESOGAN et al., 2007; GADO et al., 2009) e melhor eficiência alimentar (ADESOGAN et al., 2007; ARRIOLA et al., 2011). Entretanto outros estudos não verificaram efeito na adição de enzimas na produção de leite (KUNG et al., 2000; KNOWLTON et al., 2002; KUNG et al., 2002; PETERS, 2010; CHUNG et al., 2012) e no consumo de matéria seca (RODE et al., 1999; SCHINGOETHE et al., 1999; KUNG et al., 2002).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAL, INSTALAÇÕES E ANIMAIS

Todos os procedimentos experimentais aplicados neste estudo, incluindo o procedimento cirúrgico, seguiram os "Princípios Éticos na Experimentação Animal" recomendados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, de acordo com o protocolo de nº 7072050214.

O experimento foi conduzido nas dependências do Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite (LPBL) do Departamento de Nutrição e Produção Animal (VNP) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), em Pirassununga, no período de 05 de junho a 1º de setembro de 2014. A localização geográfica do LPBL é 21° 57' 28'' de latitude sul, 47° 27' 21'' de longitude oeste com altitude de 635 metros. A região possui clima tropical, com temperatura média durante o experimento de 18,94° C, com umidade relativa do ar médio de 70,07% e velocidade média do vento de 1,01 km/h.

As análises bromatológicas e de composição do leite foram realizadas no Laboratório de Bromatologia do LPBL. As demais análises foram realizadas nas dependências do Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Animal do VNP.

Foram utilizadas 24 vacas da raça Holandesa, multíparas, com peso corporal (PC) médio de $646,75 \pm 77,54$ kg, escore de condição corporal (ECC) médio de $3,02 \pm 0,56$, (escala de 0 a 5) com dias em lactação (DEL) médio de $176 \pm 82,27$ e produção de leite (PL) média de $33,72 \pm 7,63$ kg/dia, no início do fornecimento das dietas experimentais. Destes animais, oito vacas eram portadoras de cânulas ruminais. Os animais foram alojados em estábulo tipo "free-stall", com ventilação forçada, em baias individuais de 17,5m² de área provida de camas de areia, sendo ordenhados mecanicamente duas vezes ao dia, às 6h00min e às 16h00min.

4.2 TRATAMENTO EXPERIMENTAL

Os animais foram distribuídos em seis quadrados latinos (QL) 4x4, balanceados e contemporâneos, sendo dois QL compostos por vacas canuladas no rúmen (8 vacas) e 4 QL de vacas não canuladas (16 vacas). A produção de leite, dias em lactação e peso corporal, no início do experimento, foram utilizados para alocar os animais aos quadrados latinos, buscando reduzir a variabilidade dentro de cada QL. Para as variáveis ruminais foram utilizadas apenas as vacas canuladas no rúmen, as quais foram alocadas em dois quadrados latinos.

O experimento foi constituído por quatro períodos, com duração de 21 dias cada, sendo os 14 primeiros dias de adaptação aos tratamentos e os demais para mensuração de variáveis e coleta de amostras. A dieta basal foi formulada de forma a atender as exigências nutricionais de uma vaca em lactação com aproximadamente 640 kg de peso corporal, com produção diária de leite de 35,0 kg e com 3,5% de gordura e 150 dias em lactação, conforme recomendações do NRC (2001). A proporção volumoso:concentrado utilizada foi de 50:50.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente para receber os seguintes tratamentos experimentais: 1) Controle (0), composta por dieta basal sem a inclusão de enzima fibrolítica; 2) com inclusão de 8 g/vaca/dia de enzima fibrolítica; 3) com inclusão de 16 g/vaca/dia da enzima fibrolítica; 4) com inclusão de 24 g/vaca/dia da enzima fibrolítica. A dose diária da enzima fibrolítica exógena (Fibrozyme®, Alltech Inc., Nicholasville, KY), que é um conjunto de extratos isolados da fermentação do *Trichoderma longibarachiatum* com atividade xilanase mínima de 100 UX/g, foi adicionada ao concentrado, diariamente, e fornecidos na alimentação da manhã e da tarde. Água foi fornecida “*ad libitum*” durante todo período experimental. Silagem de milho foi a fonte de forragem utilizada.

4.3 CONSUMO DE MATÉRIA SECA E NUTRIENTES

Diariamente foram feitas pesagens das quantidades dos volumosos e concentrados fornecidos e das sobras de cada tratamento, para estimativa do consumo voluntário

individual. As dietas foram oferecidas duas vezes ao dia, as 7h00 e as 13h00, de acordo com o consumo de matéria seca do dia anterior, de forma a ser mantido um percentual de sobras entre 5 e 10% do fornecido para não haver limitação de consumo.

Os alimentos foram homogeneizados no cocho e fornecidos na forma de dieta completa. Do 15º ao 21º dia de cada período experimental, amostras de sobras e ingredientes fornecidos foram coletadas, após o período de adaptação aos tratamentos, perfazendo uma amostra composta dos diferentes dias, as quais eram armazenadas a - 20º C. Posteriormente foram realizadas análises químico-bromatológicas nas amostras armazenadas. A proporção dos ingredientes, assim como a respectiva composição bromatológica da dieta basal e ingredientes, encontram-se nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1 - Proporção dos ingredientes do concentrado e da dieta experimental expresso em % da matéria seca, de vacas em lactação alimentadas com níveis crescentes de enzima fibrolítica exógena na ração total

Ingredientes	Concentrado	Dieta basal
Silagem de Milho	-	50,00
Milho moído	55,58	27,79
Grão de soja	10,29	5,15
Farelo de soja	28,82	14,41
Ureia	0,26	0,13
Sulfato de amônia	0,26	0,13
Calcáreo	1,48	0,74
Mistura Mineral ¹	3,23	1,62
Sal Comum	0,08	0,04

¹Composição por kg de mistura mineral: 88g de Ca; 42g de P; 18g de S; 45g de Mg; 20g de K; 123g de Na; 14mg de Co; 500mg de Cu; 20mg de Cr; 1050mg de Fe; 28mg de I; 1400mg de Mn; 18 de Se; 2800mg de Zn; 80mg de Biotina; 200000 UI de Vitamina A; 40000 UI de vitamina D3; 1200 UI de Vitamina E; 420 mg de F.

Tabela 2 - Composição bromatológica dos alimentos utilizados na dieta basal expressos em % da matéria seca, de vacas em lactação alimentadas com níveis crescentes de enzima fibrolítica exógena na ração total

Itens	Silagem					Dieta Experimental ¹
	de Milho	Milho Moído	Grão de Soja	Farelo de Soja	Concentrado	
Matéria Seca	33,34	88,76	92,23	90,45	90,02	61,70
Matéria Orgânica (% MN)	95,68	97,92	94,69	93,26	91,22	93,45
Matéria Mineral	4,32	2,08	5,31	6,74	8,78	6,55
Proteína Bruta	7,06	10,71	43,14	49,12	25,80	16,42
PIDN ²	1,48	1,33	3,36	1,70	1,57	1,53
PIDA ³	1,00	0,57	1,41	1,08	0,77	0,89
Extrato Etéreo	3,50	4,11	18,06	3,58	5,12	4,65
CNF ⁴	36,38	70,39	15,87	22,74	47,84	41,61
FDN ⁵	48,07	12,71	18,30	17,81	14,05	31,06
FDNi ⁶	12,60	1,38	1,10	1,28	1,25	6,92
FDA ⁷	27,52	3,71	7,61	7,46	5,00	16,26
FDAi ⁸	8,48	0,64	0,44	0,44	0,53	4,51
Lignina	5,82	2,20	2,29	2,50	2,17	4,00
NDT ^{9,11}	67,65	77,75	97,62	79,01	75,78	71,72
Ell (Mcal/kg MS) ^{10,11}	1,54	1,78	2,27	1,82	1,74	1,64

*Fração de tamanho de partícula, %
retida da MO¹²*

>19 mm	-	-	-	-	-	7,11
8-19 mm	-	-	-	-	-	44,13
1,18-8 mm	-	-	-	-	-	14,71
<1,18 mm	-	-	-	-	-	34,05

¹ 0, 8, 16 e 24 g/vaca/dia de enzima fibrolítica na dieta experimental; ²Proteína insolúvel em detergente neutro; ³Proteína insolúvel em detergente ácido; ⁴Carboidratos não fibrosos; ⁵Fibra em detergente neutro; ⁶Fibra em detergente neutro indigestível; ⁷Fibra em detergente ácido; ⁸Fibra em detergente ácido indigestível; ⁹Nutrientes digestíveis totais; ¹⁰Energia líquida de lactação; ¹¹Estimados de acordo com NRC (2001); ¹²Determinado com a Penn State Particle Separator (Heinrichs and Kononoff, 2002).

4.4 ANÁLISE DE ALIMENTOS

As amostras de silagem, sobras, fezes e digesta de rúmen foram secas em estufa de ventilação forçada à 55°C por 72h, moídas em moinho de facas tipo Willey (MARCONI® - MOD - 0.48) de crivo de 1 e 2 mm para posterior análises.

Os procedimentos analíticos utilizados para avaliação dos ingredientes, sobras e fezes foram: a matéria seca (MS; 930.15; AOAC, 2006); o teor de cinza foi obtido pela queima em forno mufla a 600°C por quatro horas (MM, 942.05; AOAC, 2006); a fibra em detergente neutro (FDN) foi determinada pelo método de Van Soest (1991) utilizando-se α -amilase termoestável sem adição de sulfito de sódio de acordo com Mertens (2002), em Sistema Ankon®; a fibra em detergente ácido foi determinado de acordo com AOAC (FDA; 973.18; AOAC, 2006) e o teor de proteína bruta pela decomposição das proteínas e outros componentes nitrogenados na presença de H₂SO₄ concentrado a quente multiplicando o teor de nitrogênio total por 6,25, segundo o método Semi-micro Kjeldahl (PB; N x 6,25; 984.13; AOAC, 2006); o extrato etéreo segundo AOAC (EE; 920.39; AOAC, 2006) em Sistema Ankon®; a energia bruta (EB) foi determinada pela oxidação completa de amostras em bomba calorimétrica adiabática - tipo Parr (SILVA; QUEIROZ, 2002). Nas amostras de alimentos fornecidos e nas sobras também foram avaliados o nitrogênio insolúvel em detergente neutro e nitrogênio insolúvel em detergente ácido, de acordo com as metodologias descritas por AOAC (1990). Lignina foi determinada de acordo com Robertson e Van Soest (1981).

Os teores de carboidratos não-fibrosos (CNF) foram calculados como proposto por Hall (2000) onde: $CNF = 100 - [(\%PB + \%EE + \%MM + \%FDN)]$.

Os nutrientes digestíveis totais (NDT) foram calculados segundo Weiss (1999), conforme metodologia descrita no NRC (2001), em que $NDT = CNFd + PBd + (AGd * 2,25) + FDNd - 7$, onde CNFd, PBd, AGd, FDNd representam o total destes nutrientes digestíveis. O teor de energia líquida (EL) foi estimado através da equação estabelecida pelo NRC (2001), em que $EL (Mcal/kg) = 0,0245 * NDT (\%) - 0,12$.

Foram avaliados o consumo de matéria seca, proteína bruta, FDN, extrato etéreo, carboidratos não-fibrosos, NDT e energia líquida. Por meio da avaliação do consumo de nutrientes, e da estimativa das exigências nutricionais foi calculado o balanço de energia segundo Harvatine e Allen (2006).

4.5 DIGESTIBILIDADE APARENTE TOTAL

A digestibilidade aparente total da matéria seca e dos nutrientes e a quantidade total de matéria seca fecal excretada foram estimadas pela concentração de fibra em detergente ácido indigestível (FDAi). As amostras de fezes (500g) foram coletadas a cada 9 horas nos dias 18º, 19º e 20º do período experimental totalizando 8 amostras de fezes por vaca/período, sendo acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas em freezer à -20°C, e ao final do período de coleta foi feita à amostra composta por animal com base no peso seco ao ar. O objetivo foi à formação do *pool* representativo de intervalo de 3 horas de um período de 24 horas para retirar o efeito da variação diária na excreção.

A excreção total de fezes de cada animal foi estimada a partir da concentração do indicador interno FDAi. Para obtenção do teor de FDAi nas amostras, utilizou-se 4 repetições de cada amostra pré-seca de alimentos, sobras e fezes as quais foram acondicionadas em sacos de tecido não-tecido (TNT-100g/m²), com dimensões de 4 x 5 cm. As alíquotas foram acondicionadas em todos os sacos, segundo a relação de 20 mg de matéria seca por centímetro quadrado de superfície (NOCEK, 1988).

Antes da incubação das amostras, duas vacas da raça Holandesa foram adaptadas durante 7 dias com dieta a base silagem de milho como forragem e concentrado à base de milho moído e farelo de soja na proporção de 80:20, com base na MS. Posteriormente ao período de adaptação dos animais, as amostras foram incubadas no rúmen por período de 12 dias ou 288 horas, segundo adaptação de técnica descrita por Casali (2008).

Posteriormente, os sacos foram submetidos ao tratamento com detergente ácido (MERTENS, 2002) por uma hora, em equipamento analisador de fibra Ankon[®]. Após este período foram lavados com água quente e acetona, sendo secos em estufa não-ventilada por 105°C por 45 minutos e pesados conforme (DETMANN et al., 2001). Ao final deste tratamento, foi obtida a fibra em detergente ácido indigestível (FDAi).

Para a determinação da excreção total de fezes (ETF) foi utilizada a seguinte equação: $ETF = Oferta\ de\ FDAi - FDAi\ das\ sobras / Concentração\ de\ FDAi\ nas\ fezes$.

4.6 DINÂMICA RUMINAL

A taxa de renovação ruminal, taxa de passagem pelo rúmen, e a taxa de digestão ruminal de cada componente foi calculada de acordo com Oba e Allen (2003). Durante a retirada do conteúdo ruminal, por meio de esvaziamento 4 horas antes e 4 horas após a alimentação da manhã em dias alternados para retirar o efeito de tamanho da massa ruminal durante o dia, alíquotas de 10% da digesta foram separadas para permitir amostragem acurada. As alíquotas foram filtradas em peneira de náilon com 1,0 mm de porosidade para separação do conteúdo sólido do líquido. As frações de amostras do conteúdo ruminal nas fases sólida e líquida, foram pré-secados e corrigidos para matéria seca original, e acondicionadas em congelador à -20 °C, até a realização das análises (HAVERTINE; ALLEN, 2006b).

Os métodos de Dado e Allen (1995), que se baseiam no tamanho da massa ruminal de FDNi, foi usado para estimar a cinética da digestão da FDN. Neste procedimento é considerado um único compartimento e a mesma taxa de entrada do nutriente é considerada na taxa de saída do órgão. Massa ruminal de FDN e FDNi foi calculada com a média da quantidade de matéria seca multiplicada pela concentração dos nutrientes nas amostras de digesta ruminal. Estes autores assumem que o consumo de FDNi deva ser igual ao fluxo de FDNi duodenal.

Para analisar a taxa de passagem do FDNi usou-se a equação: $\text{FDNi } k_p \text{ (h}^{-1}\text{)} = (\text{consumo de FDNi} / \text{massa ruminal de FDNi}) / 24$. Foi assumido que a taxa de passagem da FDNpd pode ser aproximada à taxa de passagem da FDNi, podendo-se utilizar a equação a seguir para a taxa de digestão da FDNpd: $\text{FDNpd } k_d \text{ (h}^{-1}\text{)} = [(\text{consumo de FDNpd}/24)/\text{massa ruminal de FDNpd}] - \text{FDNpd } k_p$. Por fim, consegue-se obter a equação para calcular a digestibilidade aparente ruminal como se segue: $\text{Digestibilidade aparente ruminal (\%)} = (\text{Massa ruminal de FDNpd} / \text{Massa ruminal de FDN}) * [(k_d/(k_d+k_p))] * 100$.

4.7 ÍNDICE DE SELEÇÃO DE PARTÍCULAS

A ração total bem como as sobras foram analisadas para a distribuição do tamanho de partículas usando um sistema separador de partículas com peneiras estratificadoras (Penn State Particle Separator – Nasco, Fort Atkinson, WI) como descrito por Kononoff et al. (2003). O separador de partículas utilizado apresentava 4 bandejas sobrepostas (P1 a P4) com orifícios: P1 = retenção de partículas maiores do que 19 mm; P2 = retenção de partículas entre 19 e 8 mm; P3 = retenção de partículas entre 8 e 1,18 mm e P4 = com fundo fechado, a qual retém partículas com diâmetro inferiores a 1,18 mm.

O índice de seleção foi calculado como o consumo efetuado pelos animais correspondentes a cada peneira (P1 a P4) expresso pela porcentagem do consumo total predito, onde o consumo predito da fração P_i é igual ao quociente entre a matéria original ingerida e a matéria original da fração da P_i da ração total, de acordo com as equações 1, 2 e 3:

- (1) Consumo predito = % retenção de Y_x oferecido * consumido
- (2) Consumo observado = (% retenção de Y_x * oferecido) – (%retenção de Y_x nas sobras)
- (3) Índice de Seleção = (consumo observado / consumo predito) em que;

Desta forma, valores menores do que 1 indicam rejeição de alimentos, maiores que 1 consumo preferencial, e igual a 1 quando não houve seleção (LEONARDI; ARMENTANO, 2003).

4.8 COMPORTAMENTO INGESTIVO

Os dados de comportamento ingestivo foram coletados no 14º, 15º e 16º do período experimental. Os animais foram observados durante 72 horas, em intervalos de 5 minutos, utilizando-se cronômetros. No período noturno foi mantido baixa intensidade

luminosa dentro do free-stall para que os observadores pudessem visualizar os animais nas baias, sem interferir no comportamento natural dos animais.

Dentre as atividades observadas, estão os períodos de: alimentação, ócio deitada ou em pé, ruminando em pé ou deitada, bebendo água e outros (inclusive tempo na ordenha). De acordo com estas variáveis, foram estabelecidos parâmetros que indicam a influência da quantidade e qualidade da dieta na atividade mastigatória dos animais, os quais são: tempo total de mastigação (soma de tempo mastigando com tempo ruminando), tempo total de ruminação, tempo total de ócio. Após compilados os dados, eles foram usados em duas equações (4 e 5) que demonstram o tempo total mastigação por quilograma de matéria seca ingerida e tempo total mastigando por quilograma de FDN ingerida (ARMENTANO; PEREIRA, 1997). As equações são:

(4) Tempo mastigando / quantidade de matéria seca ingerida

(5) Tempo mastigando / quantidade de FDN ingerida

4.9 FERMENTAÇÃO RUMINAL

No 18º dia de cada período, amostras de líquido ruminal (100 mL) foram coletadas nas áreas cranial, ventral e caudal do rúmen em 9 tempos: 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 e 16 h após alimentação da manhã. O pH ruminal foi imediatamente determinado com uso de peagâmetro (MB-10, Marte Centífica, Santa Rita do Sapucaí, Brasil). Após, amostras de fluído ruminal (50 mL) foram centrifugadas a $7000 \times g$ por 15 min, e uma subamostra de 2 mL de sobrenadante foi misturado com 0,4 mL de ácido fórmico P.A. e armazenadas -20°C para análise de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). Outros 2 mL de sobrenadante foi adicionado de 1mL de ácido sulfúrico (1 N) e armazenadas -20°C para determinação de nitrogênio amoniacal (N-NH_3).

As concentrações de AGCC no fluído ruminal foram medidas por cromatógrafo a gás (GC-2014, Shimadzu, Tokyo, Japão) equipado com coluna capilar (Stabiliwax; Restek, Bellefonte, EUA) de acordo com método descrito por Erwin et al. (1961) e adaptado por Getachew et al. (2002) no Laboratório de Fermentabilidade Ruminal da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA-USP). As amostras foram descongeladas a temperatura ambiente e centrifugadas a $14500 \times g$ a 4°C por 10 min, e

o sobrenadante (1 mL) foi transferido para um frasco seco e limpo contendo 100 µL do padrão interno (ácido 2-etil-butírico 100 mM, Chemservice, USA). Hélio foi utilizado como gás de arraste (vazão 8,01 mL/min), o ar sintético como comburente (vazão 40 kPa) e o hidrogênio como combustível (vazão 60 kPa). A temperatura de operação utilizadas do injetor split/splitless e do detector de ionização de chamas foram de 250° C e da coluna de 145° C. O padrão externo foi preparado com ácidos acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico e valérico (Chemservice, USA). O software GCSolution (Shimadzu, Japão) foi utilizado para cálculo das concentrações de AGCC.

As concentrações de AGCC foram corrigidos para quantidade de líquido e massa sólida no rúmen pela equação proposta por Hall et al. (2015): $AGCC \text{ (mol)} = AGCC \text{ (mmol/l)} * \text{Volume Líquido Ruminal (L)} * 1 \text{ (mol)} / 1000 \text{ (mmol)}$

O nitrogênio amoniacal (N-NH₃) foi determinado pelo método fenol-hipoclorito (BRODERICK; KANG, 1980). Foram adicionados aos tubos contendo amostras de líquido ruminal e ácido sulfúrico a 1 N, 1 ml de tungstato de sódio a 10%, e posteriormente as amostras foram centrifugadas a 1200 g durante 15 minutos. Em seguida foram pipetados 25 µl do sobrenadante a um tubo limpo, e neste adicionado 5 ml do reagente fenol e 5ml de hipoclorito.

Os tubos foram agitados para homogeneização das amostras e colocados em banho-maria a 37°C durante 15 minutos, adquirindo coloração azul. Após resfriamento as amostras foram analisadas em espectrofotômetro. Quanto a sua absorbância e os resultados obtidos, foram utilizados em equação de regressão para calcular a concentração em mg/dl, onde: $\text{concentração de N-NH}_3 \text{ (mg/dl)} = \text{absorbância} - (a)/b$; $b = R^2$ da equação elaborada a partir do padrão.

4.10 SÍNTESE DE PROTEÍNA MICROBIANA RUMINAL E BALANÇO DE NITROGÊNIO

A síntese de proteína microbiana ruminal foi estimada a partir da quantificação dos derivados de purinas na urina e no leite, de acordo com metodologia descrita por Valadares et al. (1999) e Rennó (2000), considerando-se a absorção de purinas a partir da fórmula sugerida por Verbic et al. (1990).

Amostras *spot* de 100 ml de urina foram obtidas de todas as vacas a cada 9 horas, durante micção estimulada por massagem na vulva, nos 18º, 19º e 20º dias de cada período experimental, totalizando 8 amostras de urinas por vaca/período com o objetivo de formação do *pool* representativo de um período de 24 horas para retirar o efeito da variação diária.

Vinte ml das amostras foram filtradas e diluídas imediatamente em 80 mL de ácido sulfúrico a 0,036N para evitar destruição bacteriana dos derivados de purinas e precipitação do ácido úrico. Foram posteriormente acondicionadas em garrafas plásticas de capacidade de 1 litro e armazenadas em freezer à -20°C, para posterior análises de nitrogênio total, uréia, alantoína, ácido úrico e creatinina.

As determinações de creatinina foram realizadas por meio de kits comerciais (Bioclin®), utilizando reação enzimática colorimétrica cinética em aparelho SBA-200 (CELM®), as concentrações de ácido úrico e alantoína na urina e alantoína no leite foram determinados pelo método colorimétrico, conforme metodologia de Fujihara et al. (1987) descrita por Chen e Gomes (1992).

Excreção total de urina diária foi estimada dividindo-se as excreções urinárias diárias de creatinina pelos valores observados de concentração de creatinina na urina, segundo Valadares Filho e Valadares (2001). A excreção urinária diária de creatinina foi estimada a partir da excreção padrão de 24,05 mg/kg de peso corpóreo (PC) de creatinina (CHIZZOTTI, 2008). A excreção total de derivados de purinas foi calculada pela soma das quantidades de alantoína e ácido úrico excretados na urina e da quantidade de alantoína excretada no leite, expressas em mmol/dia.

Amostras de leite de aproximadamente 300 ml foram coletadas no 16º e 17º dia de cada período experimental, nas ordenhas da manhã e da tarde, para a realização das análises de compostos nitrogenados totais, alantoína e ureia. Parte da amostra composta de leite foi desproteínizada com ácido tricloroacético 25% (TCA), onde 10 ml de leite foram misturados com 5 ml de TCA, filtrados em papel-filtro e armazenados a -20°C, sendo as análises de ureia e alantoína realizadas no filtrado.

As purinas absorvidas (X, mmol/dia) foram calculadas a partir da excreção de derivados de purinas (Y, mmol/dia), por meio da equação $Y = 0,85X + 0,385 PC^{0,75}$, em que 0,85 é a recuperação de purinas absorvidas como derivados de purinas e 0,385 $PC^{0,75}$ a contribuição endógena para excreção de purinas (VERBIC et al., 1990). A síntese de compostos nitrogenados microbianos no rúmen (Y, g N/dia) foi calculada em função das purinas absorvidas (X, mmol/dia), por meio da equação $Y = (70X)/$

($0,83 \times 0,116 \times 1000$), em que 70 representa o conteúdo de N nas purinas (mg N/mmol); 0,83, a digestibilidade das purinas microbianas e 0,116, a relação N-purina:N total nas bactérias (CHEN; GOMES, 1992).

O consumo de nitrogênio foi determinado por meio do consumo de proteína bruta retirando-se o valor de conversão de nitrogênio 6,25, obtendo-se a quantidade em gramas de nitrogênio consumida. O mesmo cálculo foi realizado com os valores de proteína bruta das fezes obtendo-se a excreção total de nitrogênio em g/kg MS.

O nitrogênio total das amostras de urina e leite foram determinados de acordo com as metodologias descritas pelo AOAC (2000) (PB; $N \times 6,25$; 984.13) segundo o método semi-micro Kjeldahl, onde a quantidade em gramas de nitrogênio para cada 100 ml de urina ou leite foi obtido dividindo-se o valor de proteína bruta das amostras pelo fator 6,25 para as amostras de urina e do fator 6,38 para as amostras de leite.

O balanço de nitrogênio foi obtido subtraindo do total de nitrogênio em gramas consumido com os valores de nitrogênio na urina, fezes e leite, obtendo-se os valores de nitrogênio retido em gramas e em porcentagem do nitrogênio total.

4.11 BALANÇO DE ENERGIA

Para obtenção do consumo de energia bruta e realização do cálculo da eficiência do uso de energia consumida, as amostras de silagem e alimentos foram analisadas quanto ao seu teor de energia bruta em bomba calorimétrica, de acordo com Harvatine e Allen (2006a).

O consumo de energia digestível (CED) foi obtido por meio do coeficiente de digestibilidade das dietas experimentais e do consumo de energia bruta, de acordo com os valores de energia obtidos para os ingredientes e a silagem de milho (HARVATINE; ALLEN, 2006a).

O consumo de energia metabolizável foi calculado como: $EM (\text{consumo}) = 1,01 \times (ED (\text{consumo}) - 0,45] + 0,0046 \times (EE - 3)$ de acordo com NRC (2001), onde: EM = energia metabolizável; EE = extrato etéreo; ED = energia digestível.

O consumo de energia líquida (CELI) foi calculado a partir dos teores de energia líquida nos alimentos e nas sobras, obtidos a partir da equação do NRC (2001) como:

ELI nos alimentos e sobras (Mcal/kg) = $0.0245 * \text{NDT} (\%) - 0.12$, diante disso multiplica-se o valor de cada alimento subtraindo o valor contido nas sobras.

A energia líquida de lactação foi estimada a partir da seguinte equação do NRC (2001): $\text{EL}_L (\text{Mcal/dia}) = \text{produção de leite (kg)} \times (0.0929 \times \text{G}\% + 0.0547 \times \text{P}\% + 0.0395 \times \text{L}\%)$, onde: G% é teor de gordura no leite; P% é o teor de proteína bruta do leite e L% é o teor de lactose. A energia líquida de manutenção foi estimada, de acordo com o NRC (2001), como $\text{EL}_m (\text{Mcal}) 0.08 * \text{PC}^{0.75}$ e o balanço de energia (BE) obtido pela diferença entre o CELI e $\text{EL}_L + \text{EL}_m$.

A eficiência de utilização de energia foi calculada de acordo com Harvatine e Allen (2006a) da seguinte forma: Eficiência da produção de leite = $\text{EL manutenção} = \text{EL (consumo)} - \text{EL (ganho PV)} - \text{EL(leite)}$; Eficiência lactação = $\text{EL produção de leite} + \text{EL ganho de PC} / \text{Consumo de ED}$.

4.12 PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE

As vacas foram ordenhadas mecanicamente, por um sistema de ordenha duplo-oito linha baixa DeLaval[®] acoplado ao sistema DeLaval Alpro[®], duas vezes ao dia às 6h00 e às 16h00 sendo a produção de leite medida e gravada diariamente, entretanto, mensurações foram consideradas somente durante os últimos sete dias de cada período experimental, posteriormente ao período de adaptação as dietas experimentais. Nos dias 15º, 16º e 17º foram coletadas amostras de leite para análise de composição, compreendendo amostras proporcionais das ordenhas realizadas diariamente da manhã e da tarde.

As amostras foram acondicionadas em frascos plásticos e mantidos entre 2 e 6°C, e encaminhadas para obtenção da composição do leite. Para a determinação da gordura, proteína bruta e lactose no leite foram utilizadas amostras à fresco utilizando o equipamento LACTOSCAN[®] no Laboratório de Bromatologia do Departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ-USP. Para determinação da ureia e nitrogênio uréico no leite, as amostras de leite foram desproteinizadas da mesma forma que as amostras utilizadas na análise da alantoína. As análises da concentração de uréia no leite desproteinado foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Animal do Departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ-USP, por meio de kits

comerciais (Laborlab® e Celm®). A concentração de nitrogênio uréico no leite foi determinada indiretamente por meio da seguinte fórmula: nitrogênio uréico = uréia (mg/dl)/2,14.

A produção de leite foi corrigida para 3,5% de gordura, segundo fórmula descrita por Sklan et al. (1994) onde, $PLC = (0,432 + 0,163 * G\%) * PL$.

4.13 AVALIAÇÃO DO ESCORE DE CONDIÇÃO CORPORAL E PESO CORPORAL

Durante o experimento as vacas foram avaliadas em relação ao escore de condição corporal (ECC) e o peso corporal no 7º dia do período de adaptação e no final de cada período experimental, para avaliação da variação de peso. O peso dos animais foi correspondente à média de duas pesagens sucessivas, feitas antes do fornecimento da alimentação e após a ordenha, durante dois dias em um sistema de pesagem automática por meio da balança digital DeLaval AWS100 acoplada ao sistema DeLaval Alpro®. As mensurações do ECC foram realizadas segundo metodologia proposta por Wildman et al. (1982) e desenvolvida por Edmonson et al. (1989).

4.14 METABÓLITOS SANGUÍNEOS

No experimento foram realizadas coletas de sangue dos animais, no 16º dia de cada período experimental, sempre por punção da artéria ou veia coccígea, decorridos 4 horas ao fornecimento da alimentação da manhã, para dosagem dos parâmetros sanguíneos.

As amostras foram coletadas em tubos vacuolizados (Vacutainer®) de 10 mL e imediatamente refrigerados até a centrifugação em centrífuga refrigerada, à 3000 rpm durante 15 minutos e a 5°C, para a separação do soro. O soro obtido foi transferido para tubetes plásticos, identificados e armazenados a -20°C, até o procedimento das análises laboratoriais.

Foram analisadas as concentrações sanguíneas de glicose (GLI), ureia, nitrogênio uréico no soro (NUS), e as enzimas aspartato aminotransferase (AST) e gama glutamil transferase (GGT). As análises laboratoriais foram realizadas por meio de kits comerciais, (Bioclin[®]) que utilizam o método enzimático colorimétrico de ponto final ou cinético. A leitura foi realizada em aparelho automático para bioquímica sanguínea (Sistema de Bioquímica Automático SBA-200). Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Animal do VNP-FMVZ-USP.

4.15 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados, foram submetidos à regressão simples polinomial pelo PROC MIXED do SAS (Statistical Analysis for Windows 9.4 – Institute Inc., Cary, USA), de acordo com o seguinte modelo matemático:

$$Y_{ijkl} = \mu + T_i + P_j + Q_k + A_l(Q_k) + e_{ijkl}$$

Em que: Y_{ijkl} é o valor observado para o animal l pertencente ao quadrado k , no j -ésimo período, no qual recebeu a dose i de enzimas fibrolítica exógena; μ = média geral; T_i = efeito fixo de dose de enzima; P_j = efeito fixo de período; Q_k = efeito fixo de quadrado; $A_l(Q_k)$ = efeito aleatório de animal dentro de quadrado e e_{ijklm} = erro experimental da parcela. As médias foram ajustadas e apresentadas pelo LSMEANS, e a correção dos graus de liberdade foi feita pelo método de Kenward e Rogers (1997). Os modelos de regressão foram obtidos pelo recurso *Solution* do PROC MIXED.

As variáveis avaliadas na fermentação ruminal (pH, concentração de N-NH₃, acetato, butirato, propionato e ácidos graxos de cadeia ramificada – AGCR), foram analisadas como medidas repetidas no tempo, pelo PROC MIXED do SAS 9.4, considerando no modelo estatístico os efeitos de animal, período, quadrado, tratamento (nível de enzima), além dos efeitos de tempo e suas interações com os tratamentos. Estruturas de covariância testadas incluem CS, CSH, UNIV, TOEP, TOEPH, AR (1), MARMA (1), ANTE (1), AF (1,1) e ARH (1).

Para a escolha da matriz de variância e covariância foi utilizado o critério Akaike, selecionando-se a de menor valor para este parâmetro (AKAIKE, 1974). As

respostas, ao nível de inclusão de enzima fibrolítica exógena, foram testadas pelos contrastes linear e quadrático, considerando significância quando $P < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CONSUMO E DIGESTIBILIDADE

A utilização de enzimas fibrolíticas aumentou linearmente o consumo de matéria seca, matéria orgânica e da fibra em detergente neutro ($P < 0,05$) e tendeu a aumentar o consumo de NDT linearmente ($P = 0,07$; Tabela 3). Entretanto não foi observado efeito no consumo de proteína bruta, extrato etéreo e carboidrato não-fibroso. Não foi observado diferença também entre o consumo de matéria seca e de FDN relativos ao peso corporal. Em média, foi observado aumento de 0,780 kg/dia de matéria seca ou 3,27% no tratamento com 24 g/vaca/dia de enzima fibrolítica em relação ao tratamento controle, sem adição da enzima.

Sugere-se que o aumento no consumo de FDN proporcionou o maior consumo de matéria seca, quando se adicionou enzimas fibrolítica exógenas na dieta, que pode ser explicado pelo índice de seleção o qual mostrou aumento no consumo de partículas longas, isso devido ao fato da concentração dos nutrientes entre as dietas experimentais serem semelhantes. Este fenômeno pode ser devido ao fato de um possível aumento na taxa de digestão ruminal da fibra. Beauchemin et al. (2003a) relataram que o aumento no consumo seja devido a melhora na digestão de forragens que possuem baixa digestibilidade como demonstrado por Zinn et al. (1999) e também devido ao aumento na taxa de passagem pelo trato digestório (FENG et al., 1996).

Tabela 3 – Consumo e digestibilidade aparente total da matéria seca e dos nutrientes de vacas em lactação alimentadas com níveis crescentes de inclusão enzima fibrolítica exógena na dieta

Item	Tratamentos ¹				EPM ²	Probabilidades (P) ³	
	0	8	16	24		L	Q
<i>Consumo (kg dia⁻¹)</i>							
Matéria Seca	23,06	23,65	23,32	23,84	0,370	0,047	0,864
Matéria Orgânica	21,53	22,07	21,76	22,25	0,343	0,046	0,885
Proteína Bruta	3,95	4,02	3,97	4,03	0,061	0,297	0,977
Extrato Etéreo	1,07	1,09	1,09	1,09	0,017	0,157	0,512
CNF ⁵	9,91	9,97	9,93	10,10	0,153	0,237	0,590
FDN ⁶	6,66	6,82	6,73	6,97	0,119	0,048	0,652
NDT ⁷	16,68	16,87	16,78	17,13	0,261	0,077	0,588
<i>Consumo em % do PC⁴</i>							
Matéria Seca	3,54	3,56	3,53	3,61	0,059	0,255	0,371
FDN	1,02	1,03	1,02	1,06	0,018	0,092	0,454
<i>Digestibilidade Aparente Total (%)</i>							
Matéria Seca	74,39	73,58	74,24	74,09	0,640	0,948	0,705
Matéria Orgânica	76,92	75,79	76,54	76,31	0,648	0,787	0,613
Proteína Bruta	75,99	74,35	75,75	75,77	0,691	0,856	0,379
Extrato Etéreo	73,44	71,56	73,25	72,01	1,199	0,637	0,794
FDN	47,03	47,33	49,06	47,18	1,129	0,801	0,571

¹0, 8, 16 e 24g de enzima fibrolítica/vaca/dia;²EPM: Erro padrão da média;³Probabilidade de efeito linear (L) e quadrático (Q), obtido por contrastes ortogonais;⁴PC: peso corporal;⁵CNF: Carboidratos não fibrosos;⁶FDN: Fibra em detergente neutro;⁷NDT: Nutrientes digestíveis totais;

Funções de regressão:

Consumo de matéria seca = 23,165(±1,043)+0,0253(±0,012)X;

Consumo de matéria orgânica = 21,560(±0,568)+0,0267(±0,038)X;

Consumo de FDN = 6,645(±0,195)+0,014(±0,013)X;

Médias corrigidas pela função LSMEANS do SAS 9.4.

É bem aceito que a digestibilidade da forragem tem forte influência sobre o consumo de matéria seca (ALLEN, 2007). A distensão ruminal estimula receptores de tensão localizados no retículo e no saco cranial dorsal do rúmen emitindo um sinal de saciedade para o centro da fome, via nervo vago aferente. Esta distensão é afetada pelo peso e volume da digesta ruminal o qual é determinado pela concentração de FDN e pela sua característica de digestão (fragilidade, taxa de digestão e passagem) (ALLEN; PIANTONI, 2014).

Os efeitos de depressão de consumo diante da digestibilidade da fibra são pronunciados em animais que estão em desafio energético (pico de lactação, vacas de alta produção), quando são usadas dietas com alta proporção de forragens (ALLEN;

PIANTONI, 2014) ou quando a forragem é de baixa digestibilidade (JUNG; ALLEN, 1995). O aumento no consumo de matéria orgânica ($P < 0,05$) ocorreu devido à forte influência do aumento no consumo de matéria seca.

Um grande número de estudos na literatura relata alta variabilidade de resultados de consumo de matéria seca com o uso de enzimas fibrolíticas exógenas, mas são escassos os dados de consumo de FDN. Semelhante a este experimento Lewis et al. (1999) e Gado et al. (2009), observaram maior consumo de matéria seca quando adicionaram doses crescentes de enzimas fibrolíticas exógenas às dietas.

Diversos estudos (RODE et al. 1999; SCHINGOETHE et al., 1999; YANG et al., 1999; KUNG et al., 2000; YANG et al., 2000; BOWMAN et al., 2002; 2003; KNOWLTON et al., 2002; KUNG JR. et al., 2002; ELWAKEEL et al., 2007; HRISTOV et al., 2007; REDDISH; KUNG JR., 2007) não encontraram diferença no consumo de matéria seca em um período variável ao longo da lactação quando incluíram enzimas fibrolíticas exógenas com atividade celulase e xilanase às dietas.

Zheng et al. (2000) também não encontraram diferença no consumo de matéria seca quando estudaram diferentes fases do período pré-parto e pós-parto, entretanto Kim et al. (2006) encontraram maior consumo 2 dias antes do parto. Diferentemente, Holstshausen et al. (2011) encontraram diminuição no consumo de matéria seca com a inclusão de enzimas fibrolíticas exógenas nas dietas, especulando ser devido ao aumento da eficiência do uso dos nutrientes levando à saciedade dos animais (ALLEN; PIANTONI, 2014).

Os resultados do atual estudo indicam que os animais mesmo não estando no pico de lactação com desafio físico de consumo e pelo fato de não possuírem altíssima produção de leite, estavam com limitação física de consumo provocado pela baixa qualidade da FDN, o que pode ter resultado em baixa degradabilidade ruminal deste nutriente.

A suplementação de enzima fibrolítica exógena pode ter levado ao aumento na degradabilidade da fibra o que proporcionou aumento no consumo voluntário. Este efeito é explicado por Oba e Allen (1999) e Allen (2000) os quais afirmam que a qualidade da forragem pode influenciar o consumo voluntário pela taxa de degradação ruminal e não pela digestibilidade aparente total. Explicam que há fatores de confundimento na digestibilidade aparente total pois, há diferentes tempo de retenção no rúmen pela diferença em consumo de alimentos de cada animal e, também, o perfil

acidificante do intestino delgado e a fermentação do intestino grosso podem interferir na diferença em taxa de digestão da fibra no trato total.

Não foi observado efeito na digestibilidade aparente total da matéria seca, matéria orgânica, proteína bruta, extrato etéreo e fibra em detergente neutro neste estudo, semelhante ao relatado por Knowlton et al. (2002) e Peters et al. (2010). Este resultado pode estar relacionado à potencial ação da enzima em degradar sítios que já seriam degradados pelos microrganismos e não aumentar estes sítios, ou seja, ela aumenta a taxa de degradação e não a sua extensão (BEAUCHEMIN et al., 2003a).

Vários estudos têm demonstrado a influência da adição de enzima fibrolítica exógena na digestibilidade da fibra vinda de forragens *in vitro* (EUN et al., 2007; BALA et al., 2009; FACCHINI et al., 2012), e *in vivo* (RODE et al., 1999; YANG et al., 1999; PINOS-RODRÍGUEZ et al., 2002; SHEKHAR et al., 2010). Outros estudos têm demonstrado aumento na digestibilidade aparente total dos nutrientes (RODE et al., 1999; YANG et al., 1999; BEAUCHEMIN et al., 2000; YANG et al., 2000; BOWMAN et al., 2002; SUTTON et al., 2003; EUN; BEAUCHEMIN, 2005; GADO et al., 2009; ARRIOLA et al., 2011) ou tendência de aumento (KNOWLTON et al., 2007).

Segundo Yang et al. (1999), aumento na digestibilidade aparente total pode ser tanto devido ao aumento na digestibilidade ruminal quanto ao aumento na digestibilidade pós-ruminal, e que esta variação do local de digestão é principalmente ligada ao efeito do modo de fornecimento. Quando se fornece a enzima pouco tempo antes da ingestão do alimento e de maneira seca (como no atual estudo), ela é rapidamente levada do rúmen podendo atuar nos intestinos e, quando se aplica a enzima previamente ao fornecimento dos animais, e de maneira aquosa, a enzima atua principalmente no rúmen pelo aumento no potencial de hidrólise dos polissacarídeos (ROMERO et al., 2015a,b).

Giraldo et al. (2008a) suplementando ovelhas diretamente no rúmen com enzimas fibrolíticas encontram maior digestibilidade da fração insolúvel potencialmente degradável, bem como, aumento na taxa de degradação tanto da matéria seca como da FDN no rúmen. Entretanto, Wallace et al. (2001), os quais suplementaram enzimas diretamente no rúmen, não encontraram diferenças nos resultados de produção de gás, recomendando aplicação prévia nos alimentos para que se obtenha eficiência na utilização das enzimas fibrolíticas.

Alta variabilidade de resultados é encontrado na literatura quanto a digestibilidade parcial ou total dos nutrientes, isto pode ser explicado pela grande

variedade de composição de enzimas, tipos de animais e tipo de dieta, ou até mesmo pelos modelos experimentais usados com reduzido número de animais.

5.1.1 Índice de seleção

O índice de seleção revela o comportamento físico do consumo, mostrando se as vacas selecionaram partículas maiores ou menores quando consumiram a ração total. Os resultados do índice de seleção estão apresentados na (Tabela 4). Houve aumento no consumo de partículas longas com adição de enzima fibrolítica na ração ($P<0,05$), podendo inferir que os animais selecionaram menos os alimentos.

Tabela 4 - Índice de seleção por tamanho de partículas de vacas em lactação alimentadas com níveis crescentes de inclusão de enzima fibrolítica exógena na dieta

Item	Tratamentos ¹				Média	EPM ²	Probabilidades (P) ³	
	0	8	16	24			L	Q
Índice de Seleção ⁴								
>19 mm	0,70	0,74	0,78	0,84	0,77	0,023	0,001	0,722
8-19 mm	1,01	1,00	1,00	1,01	1,00	0,003	0,829	0,043
1,18-8 mm	1,02	1,02	1,02	1,02	1,02	0,002	0,702	0,101
<1.18 mm	1.03	1.03	1.05	1.04	1.04	0.005	0.131	0.531

¹0, 8, 16 e 24g de enzima fibrolítica/vaca/dia;

²EPM: Erro padrão da média;

³Probabilidade de efeito linear (L) e quadrático (Q), obtido por contrastes ortogonais,

⁴Calculado de acordo com Silveira et al., 2007: >1,0 = selecionou a favor, <1,0 = selecionou contra;

Funções de regressão:

>19 mm= $0,7004(\pm 0,0373)+0,005471(\pm 0,00158)X$;

8-19 mm= $1,006(\pm 0,008)-0,001(\pm 0,0006)X+0,00005(\pm 0,00002)X^2$,

Médias corrigidas pela função LSMEANS do SAS 9.4.

O aumento no consumo de FDN pode ser explicado pelo maior consumo de fibra longas ($P<0,05$) quando se suplementou enzimas fibrolítica exógena, podendo desta maneira inferir que estes animais consumiram maior quantidade de fibra longa rica em FDN como explicado por Allen (1996) e encontrado por Kononoff et al. (2003). Este fato nos leva a crer que possa ter ocorrido um fator de confundimento quanto ao efeito da enzima na digestibilidade aparente total da FDN.

Como os animais que receberam a suplementação da enzima consumiram uma dieta mais íntegra, com menos seleção de partículas pequenas, as quais são mais fáceis de serem fermentadas, houve um balanço compensatório em que os animais com alta

inclusão de enzima obtiveram semelhante digestibilidade dos nutrientes consumindo uma dieta de menor qualidade. Ainda mais, houve tendência de elevação do consumo de NDT pela suplementação de enzimas neste estudo, mostrando que a enzima atuou aumentando a digestibilidade da FDN, mas devido ao maior consumo deste nutriente não foi possível evidenciar este efeito.

Este fato, redução na seleção de ingredientes, é de grande importância no arraçãoamento de vacas leiteiras, uma vez que os animais de alta produção com elevadas exigências energéticas consomem a dieta integralmente, suportando desafios dietéticos de abaixamento de pH devido a seleção de alimentos, o que pode comprometer a saúde ruminal.

5.1.2 Comportamento ingestivo

A inclusão de enzimas fibrolíticas a dieta promoveu efeito quadrático no tempo de ruminação e mastigação ($P < 0,05$; Tabela 5), com maiores valores observados para as doses intermediárias de enzima fibrolíticas (8 e 16 g/vaca/dia). Esta resposta pode estar relacionada ao índice de seleção, pois mesmo com maior consumo de FDN e de partículas longas, animais alimentados com 24 g/vaca/dia de enzima fibrolítica tiveram redução no tempo de ruminação e mastigação, evidenciando a capacidade da enzima em alterar o comportamento alimentar por aumentar a degradação ruminal da fibra (BEAUCHEMIN et al. 2000). Este fato faz com que os animais gastem menos tempo ruminando e consumam mais nutrientes aumentando, possivelmente, o desempenho produtivo.

Tabela 5 - Comportamento alimentar de vacas em lactação alimentadas com níveis crescentes de inclusão enzima fibrolítica exógena na dieta

Item	Tratamentos ¹				EPM ²	Probabilidades (P) ³	
	0	8	16	24		L	Q
<i>Horas</i>							
Alimentando	4,54	4,92	4,92	4,89	0,079	0,111	0,157
Ruminando	7,64	8,55	8,46	8,33	0,095	0,015	0,005
Mastigando	12,19	13,55	13,43	13,23	0,095	0,006	0,002
Mastigação/kg FDN ⁴	1,70	1,78	1,79	1,79	0,032	0,100	0,250
Alimentação/kg FDN	0,64	0,66	0,67	0,65	0,013	0,554	0,349
Ruminação/kg FDN	1,08	1,13	1,16	1,13	0,021	0,245	0,250

¹0, 8, 16 e 24g de enzima fibrolítica/vaca/dia;

²EPM: Erro padrão da média;

³Probabilidade de efeito linear e quadrático, obtido por contrastes ortogonais;

⁴FDN: Fibra em Detergente Neutro;

Funções de regressão: Ruminando = $7,523(\pm 0,170) + 0,129(\pm 0,034)X - 0,004(\pm 0,001)X^2$;

Mastigando = $11,995(\pm 0,2625) + 0,191(\pm 0,046)X - 0,006(\pm 0,001)X^2$;

Médias corrigidas pela função LSMEANS do SAS 9.4.

É provável que haja uma correlação entre tempo de mastigação e produção de leite e, ainda entre a FDN vinda de forragem com consumo de matéria seca e produção de leite (ARMENTANO; PEREIRA, 1997). Beauchemin et al. (2003b) relatam que consumo de FDNfe (FDNfe = concentração de FDN no alimento retido na peneira >1,18mm) é correlacionada positivamente com tempo perdido mastigando, podendo trazer um prejuízo na eficiência de produção de leite. Leonardi et al. (2005) estudando tamanho geométrico que é correlacionado com efetividade física de dietas mostraram que quanto maior é o tamanho geométrico das partículas menor é a produção de leite e maior é o tempo perdido mastigando, ou seja, a eficiência de ingestão de alimentos é diminuída. Portanto é provável que quanto maior o tempo de mastigação menor é a produção de leite e quanto mais FDN vinda de forragem, menor é o consumo de matéria seca e conseqüentemente a produção de leite.

Beauchemin et al. (2000) observaram menor tempo perdido alimentando por unidade de FDN ingerida, quando suplementaram enzimas fibrolíticas às dietas, sugerindo que este aditivo tem a capacidade de alterar a fragilidade dos ingredientes ainda no comedouro fazendo com que degrade mais rapidamente diminuindo a necessidade de mastigação. Estes dados diferem aos de Bowman et al. (2003) os quais

não detectaram diferenças no comportamento ingestivo com a adição de enzimas fibrolíticas exógenas à dieta.

Yang e Beauchemin (2007) trabalhando com diferentes dietas quanto a proporção de forragens (FDN) e com diferentes tamanhos das partículas vindas das forragens, observaram uma diminuição no consumo de matéria seca e de FDN quando se fornece maior proporção de forragem na dieta (60:40 vs. 35:65 de V:C), devido ao enchimento físico do rúmen (ALLEN, 2000). Quando se avaliou o tamanho de partículas vinda da forragem é mostrado que com dietas com maior proporção de volumoso, se a fibra for longa, haverá maior tempo perdido mastigando.

Um conceito importante é que o tempo total de mastigação por dia é definido pela quantidade de FDN e FDNfe na dieta, mas a taxa de mastigação por quilograma de matéria seca ou FDN é influenciado, principalmente, pela fermentabilidade dos nutrientes (BEAUCHEMIN et al., 2000). Essa informação é relevante tendo em vista que não foi detectado efeito de taxa de mastigação por consumo de matéria seca ou FDN, podendo haver um possível efeito pré-ingestivo que aumentou a digestibilidade destes nutrientes, já que não foi detectado alteração na taxa de digestão e na taxa de passagem ruminal da FDN mostrado pela dinâmica ruminal, a seguir.

5.1.3 Dinâmica ruminal

Não foi observado efeito da dose de inclusão de enzima no consumo de FDNpd e FDNi, na quantidade da massa ruminal de matéria seca, FDN, FDNi e FDNpd e na taxa de renovação ruminal destes nutrientes ($P>0,05$; Tabela 6) semelhante ao relatado por Lewis et al. (1996); Yang et al. (1999) e Hristov et al. (2000). Entretanto pode-se observar uma superioridade de 0,210 kg de consumo de FDNpd quando se suplementou a dose de 24 g/vaca/dia de enzima fibrolítica comparada a dieta controle. A taxa de digestão da FDN e a digestibilidade aparente ruminal da FDN não foi influenciada pelos tratamentos ($P>0,05$) embora haja superioridade de 0,94 pontos percentuais na digestibilidade ruminal da FDN quando se suplementou 24 g de enzima fibrolítica/vaca/dia, comparada à dieta controle.

Tabela 6 - Dinâmica ruminal de vacas em lactação alimentadas com níveis crescentes de inclusão enzima fibrolítica exógena na dieta

Item	Tratamentos ¹				EPM ²	Probabilidades (P) ³	
	0	8	16	24		L	Q
<i>Consumo (kg.dia⁻¹)</i>							
FDNpd	5,36	5,45	5,37	5,57	0,172	0,438	0,738
FDNi	1,43	1,44	1,36	1,45	0,048	0,924	0,207
<i>Composição da digesta ruminal (%)</i>							
Matéria Seca	14,73	14,72	15,39	14,11	0,447	0,728	0,409
FDN	62,04	59,93	61,18	62,37	0,770	0,761	0,326
FDNi	28,20	24,83	26,61	26,83	0,626	0,628	0,109
FDNpd	38,74	35,71	34,09	36,10	0,910	0,276	0,203
<i>Massa da digesta ruminal (kg)</i>							
Matéria Orgânica	77,83	77,06	78,26	81,26	1,642	0,305	0,458
Matéria Seca	11,57	11,49	12,20	11,46	0,516	0,920	0,713
FDN	7,19	6,86	7,44	7,18	0,343	0,842	0,955
FDNi	3,25	2,89	3,24	3,07	0,155	0,857	0,692
FDNpd	3,94	3,97	4,20	4,11	0,235	0,721	0,900
<i>Taxa de renovação ruminal (% h⁻¹)</i>							
MS	8,72	9,09	8,38	8,74	0,371	0,809	0,999
FDN	4,16	4,50	4,03	4,15	0,184	0,732	0,745
FDNi - kp	2,29	2,54	2,38	2,28	0,221	0,790	0,327
FDNpd	5,81	5,76	4,74	5,54	0,272	0,428	0,432
<i>Taxa de digestão (% h⁻¹)</i>							
FDN - kd	4,07	3,53	2,91	3,83	0,221	0,501	0,117
<i>Digestibilidade ruminal (%)</i>							
FDN	36,20	35,58	32,99	37,14	0,856	0,965	0,071
Volume Ruminal (L)	96,88	96,60	98,15	102,09	2,052	0,218	0,501

¹0, 8, 16 e 24g de enzima fibrolítica/vaca/dia;²EPM: Erro padrão da média;³Probabilidade de efeito linear e quadrático, obtido por contrastes ortogonais.

Médias corrigidas pela função LSMEANS do SAS 9.4.

A metodologia empregada foi a proposta por Dado e Allen (1995) o qual está de acordo com o modelo de primeira ordem de digestão da celulose no rúmen, ou seja, depende somente das características da fibra (WALDO et al., 1972), com avaliação de dois *pools* que minimiza o efeito de variação de consumo diário.

De acordo com Allen (2007) o tamanho da massa ruminal varia durante o dia podendo ter mais sucesso quando: a taxa de passagem de frações do nutriente a se avaliar tem maior tempo de retenção ruminal; se utiliza vacas com alto consumo de alimentos; quando se usa rações misturadas totalmente. Esta variação pode ser minimizada fazendo-se dois esvaziamentos para se medir a massa ruminal, sendo eles no ponto máximo e mínimo do enchimento ruminal (4h antes e 4h depois da alimentação). Assim se consegue estimar com acurácia a massa média ruminal das FDN's, por exemplo.

Este modelo considera que a quantidade da massa ruminal e o fluxo de FDN pelo rúmen é constante, e que a taxa de passagem da FDNi e da FDNpd são iguais. No entanto Harvatine et al. (2002) e Allen (2007) explicam que a taxa de passagem da FDNi não é a mesma da FDNpd mesmo sendo consideradas que estas estão contidas em um conglomerado de mistura de partículas. A fibra é composta por diferentes frações de FDNpd e FDNi o que altera suas cinéticas de digestão e passagem que é dependentemente da quantidade de cada fração.

A FDNpd contribui para retenção no rúmen, por ter menor densidade e boiar no conteúdo ruminal, corroborando com Firkins et al. (1998), e a FDNi por ter maior densidade passa mais rápido pelo rúmen. Além disso, Dixon e Milligan (1985) enfatizam que a taxa de passagem da FDNi é dependente do tamanho da partícula, mostrando que a entidade química FDNi não é acurada para mostrar a real taxa de passagem da fibra.

Portanto, no presente estudo, a metodologia empregada para esta avaliação não foi acurada para mostrar este efeito por considerar, na equação, que a taxa de passagem do FDNpd é a mesma da FDNi superestimando-a, o que não é verdade, igualando todos os fatores entre os tratamentos, diminuindo a probabilidade de detecção de efeito biológico pela estatística empregada.

Provavelmente, o aumento no consumo de matéria seca e FDN, pode estar relacionado a atuação da enzima fibrolítica exógena, pois mesmo com o aumento na ingestão de partículas longas houve diminuição no tempo de mastigação diário dos animais suplementados, mostrando que possa ter havido um potencial aumento na taxa de digestão da FDN como encontrado por Feng et al. (1996) e Yang et al. (1999). Este fenômeno pode ser devido ao potencial sinergismo existente entre enzimas endógenas e exógenas (MORGAVI et al., 2000) ou, pelo maior potencial de adesão de microrganismos às partículas (YANG et al., 1999). Latham (1980) observou que a

celulase liberada por microrganismos celulolíticos foi o maior determinante para sua própria adesão à celulose.

5.2 BALANÇO DE ENERGIA

Houve aumento linear no consumo energia líquida, bem como no balanço de energia líquida ($P < 0,05$; Tabela 7) com o aumento da dose de enzima fibrolítica a dieta, o que pode estar associado ao aumento no consumo de matéria seca, assim como observado por Knowlton et al. (2002). Entretanto não foi observado efeito no consumo de energia bruta, digestível e metabolizável ($P > 0,05$). Estes resultados demonstram que as vacas suplementadas com enzima fibrolítica obtiveram maior aporte energético, mesmo consumindo mais FDN, ou seja, mesmo ingerindo menos as partículas pequenas da dieta (concentrado). Como é usado equações que estimam as diferentes frações de energia consumida, a energia líquida resulta do somatório de pequenos efeitos na energia digestível, determinado pelo consumo de NDT (WEISS et al., 1993) e da energia metabolizável dos alimentos, tornando-se significativa neste estudo quando houve o aumento na dose de enzima fibrolítica.

Rode et al. (1999) e Yang et al. (1999) não observaram aumento no balanço de energia de vacas em início de lactação suplementadas com enzima fibrolítica exógena, justificando ser a consequência da alta produção de leite e baixo consumo de alimentos nesta fase.

Tabela 7 - Balanço de energia de vacas em lactação suplementadas com níveis crescentes de inclusão de enzima fibrolítica exógena na dieta

Item	Tratamentos ¹				EPM ²	Probabilidades (P) ³	
	0	8	16	24		L	Q
<i>Consumo (Mcal.dia⁻¹)</i>							
Energia Bruta	97,56	100,10	100,15	99,98	1,576	0,178	0,254
Energia Digestível	72,40	73,42	73,62	73,12	1,171	0,644	0,504
Energia Metabolizável	60,10	60,94	61,10	60,69	0,972	0,644	0,504
Energia Líquida	38,20	38,90	38,63	39,63	0,603	0,007	0,632
<i>Exigências de energia líquida (Mcal.dia⁻¹)</i>							
Lactação	20,82	21,27	21,06	20,65	0,621	0,619	0,189
Mantença	10,38	10,46	10,41	10,44	0,105	0,323	0,264
<i>Balanço (Mcal.dia⁻¹)</i>							
Energia Líquida	6,71	7,06	6,84	7,81	0,487	0,035	0,342
<i>Eficiências (Mcal.Mcal⁻¹)</i>							
ElLactação/CED	0,28	0,29	0,28	0,29	0,008	0,919	0,851
ElLactação+ElMantença/CED	0,43	0,43	0,42	0,43	0,007	0,865	0,507

¹0, 8, 16 e 24g/vaca/dia de enzima fibrolítica;²EPM: Erro padrão da média;³Probabilidade de efeito linear e quadrático, obtido por contrastes ortogonais;

Funções de regressão:

Consumo de Energia Líquida de Lactação = 38,305(±1,655)+0,022(±0,062)X;

Balanço de Energia Líquida = 6,811(±1,226)+0,014(±0,061)X;

Médias corrigidas pela função LSMEANS do SAS 9.4.

5.3 FERMENTAÇÃO RUMINAL

Na (Tabela 8) estão descritos os resultados referentes à fermentação ruminal de acordo com a suplementação de enzimas fibrolíticas exógenas às dietas. Os dados são mostrados em duas frentes: proporção molar (mmol/100mmol) e em quantidade de mols, que é a correção para a quantidade de água e matéria seca no rúmen.

Não foi verificado efeito do nível de inclusão em relação aos valores de pH ruminal ao longo do dia (Figura 1), assim como Ahn et al. (2003). Entretanto foi observado efeito do tempo sobre o pH (P<0,05) mostrando, deste modo, que há variação

de pH conforme a quantidade de substrato fermentescível no rúmen após a alimentação das vacas. Não houve interação entre tempo e pH ruminal.

Os valores de pH neste estudo estão dentro do esperado para vacas leiteiras que está entre 5,9 e 6,1 (BOWMAN et al., 2003), porém, assim como outros trabalhos (YANG et al., 1999; BEAUCHEMIN et al., 2000; BOWMAN et al., 2003) não foi verificado efeito da enzima fibrolítica exógena sobre o pH ruminal. Alguns estudos que trabalharam com grãos de cevada no concentrado observaram diminuição no pH ruminal quando suplementaram enzimas fibrolíticas na dieta (HRISTOV et al., 2000) podendo ser devido à alta digestibilidade do amido.

A redução do pH ruminal pode ter efeito negativo na digestão da fibra diminuindo a degradabilidade da MS e da FDN em cerca de 7 e 22%, respectivamente (PLAIZIER et al., 2001). Alguns estudos tem demonstrado que bactérias celulolíticas tem o crescimento prejudicado com pH abaixo de 6,2 (RUSSELL; WILSON, 1996). Entretanto, bactérias ruminais tem resistência ao ácido pelo mecanismo de diminuição do pH intracelular mantendo o pH inter-membrana semelhante ao pH do meio prevenindo altas taxas de acumulação de ânions de AGCC intracelular levando à toxicidade para a bactéria. Mas quando o pH está aquém do limite este mecanismo não consegue manter esta homeostase (RUSSEL; WILSON, 1996).

Tabela 8 - Fermentação ruminal de vacas em lactação alimentadas com níveis crescentes de inclusão enzima fibrolítica exógena na dieta

Item	Tratamentos ¹				EPM ²	Probabilidades (P) ³			
	0	8	16	24		Tempo	Trat* Tempo	L	Q
pH	6,11	6,09	6,06	6,11	0,022	<0,0001	0,164	0,890	0,407
<i>mg.dl⁻¹</i>									
N-NH ₃ (mg/dl) ⁵	18,10	19,08	20,06	17,83	0,365	0,0004	0,426	0,864	0,024
<i>AGCC (mol.100mol⁻¹)</i>									
Acetato (C2)	62,63	62,21	62,21	62,76	0,002	<0,0001	0,743	0,803	0,158
Propionato (C3)	22,56	23,38	23,25	22,48	0,002	0,0005	0,8235	0,790	0,012
Butirato (C4)	14,80	14,41	14,54	14,76	0,0009	0,0006	0,816	0,989	0,047
<i>AGCC (mol)</i>									
Acetato (C2)	6,45	6,69	6,78	7,14	0,086	<0,0001	0,732	<0,001	0,653
Propionato (C3)	2,39	2,54	2,58	2,61	0,052	<0,0001	0,443	0,036	0,457
Butirato (C4)	1,53	1,56	1,57	1,70	0,023	<0,0001	0,590	0,004	0,235
Valerato (C5)	0,173	0,177	0,186	0,186	0,002	<0,001	0,820	0,017	0,682
C2:C3	0,24	0,23	0,23	0,26	0,003	<0,0001	0,967	0,001	<0,001
AGCR	0,37	0,39	0,37	0,39	0,005	0,039	0,633	0,209	0,863
AGCC	10,93	11,36	11,50	12,03	0,151	<0,0001	0,678	0,001	0,829

¹0, 8, 16 e 24g de enzima fibrolítica/vaca/dia;²EPM: Erro padrão da média;³Probabilidade de efeito linear e quadrático, obtido por contrastes ortogonais;⁴Trat: Tratamento;⁵N-NH₃: Nitrogênio amoniacal ruminal;⁶AGCC: Ácidos Graxos de Cadeia Curta;⁷AGCR: Ácido Graxos de Cadeia Ramificada

Funções de regressão:

C3 (mol 100mol⁻¹) = 22,58(±0,862)+0,143(±0,0006)X-0,0006(±0,00002)X²;C4 (mol 100mol⁻¹) = 14,78(±0,006)-0,0005(±0,0002)X+0,00002(±0,00001)X²;

C2 (mol) = 6,480(±0,438)+0,014(±0,027)X;

C3 (mol) = 2,401(±0,258)+0,019(±0,0014)X;

C4 (mol) = 1,539(±0,862)+0,002(±0,00001)X;

C2:C3 (mol) = 0,243(±0,207)+0,0019(±0,0008)X-0,0001(±0,00003)X²;

AGCC (mol) = 10,969(±0,686)+0,033(±0,047)X;

AGCR (mol) = 1,968(±0,100)+0,001(±0,009)X;

Médias corrigidas pela função LSMEANS do SAS 9.4.

Weimer et al. (1999), concluíram que é difícil de obter efeito da dieta, do nível de forragem e do pH sobre a população de bactérias celulolíticas pois, como trabalharam com poucos animais, o efeito de animal predomina sobre os demais efeitos estudados.

Mesmo com o aumento na produção de AGCC no rúmen ($P<0,05$; Figura 6) não foi verificado efeito no pH (Figura 1), mostrando que a inclusão da enzima não levou os animais à acidose ruminal, podendo ser usada com segurança.

Houve efeito quadrático na concentração de $N-NH_3$ ruminal ($P<0,05$; Figura 2). Brito e Broderick (2006); Hassanat et al. (2013) e Arndt et al. (2015) observaram maior concentração de $N-NH_3$ quando aumentaram a quantidade de PDR na dieta e diminuíram a quantidade de CNF. O resultado do atual estudo pode ser explicado pelo fato de haver maior quantidade de carboidratos fermentescíveis com a dose máxima de inclusão da enzima as quais elevaram a síntese de proteína microbiana como demonstrado na (Tabela 9). Entretanto, com as doses intermediárias pode-se inferir que houve maior deaminação de proteínas pela maior eficiência de digestão, entretanto a degradabilidade da fibra pode não ter acompanhado esta velocidade fazendo com que haja maior concentração de $N-NH_3$ no meio ruminal sem a síntese de proteína microbiana (BOWMAN et al., 2002).

A proporção de ácido propiônico obteve efeito quadrático negativo ($P<0,05$) com altas proporções quando se suplementou as vacas com doses intermediárias de 8 e 16g/vaca/dia, tendo uma leve queda com a dose de 24g/vaca/dia. O ácido butírico obteve efeito inverso ($P<0,05$), com maiores proporções na dieta controle e com 24g/vaca/dia. Com a suplementação de enzima predominou-se a rota de formação do propionato ruminal diminuindo a proporção de ácido butírico no rúmen. A gliconeogênese é uma via dependente de propionato, deste modo, a suplementação de enzimas fibrolítica melhorou o status energético do animal por fornecer maior proporção de precursor para a síntese de glicose.

Houve aumento linear ($P<0,05$) na quantidade de acetato (Figura 3), propionato (Figura 4), butirato (Figura 5) quando se corrigiu os dados de AGCC para MS ruminal, assim como o estudo de Giraldo et al. (2008) que encontraram aumento de acetato, propionato e AGCC total, *in vitro*. Estes resultados sugerem que houve melhora no perfil de fermentação da fibra devido ao aumento da hidrólise da parede celular pela enzima (ROMERO et al., 2015a) e consequente maior colonização da fibra pelos microrganismos (GIRALDO et al., 2008). Os resultados de fermentação do atual estudo é plausível com o aumento linear de consumo de MS e devido à maior fermentabilidade dos nutrientes proporcionada pela adição crescente de enzima fibrolítica exógena na dieta. Deste modo, houve maior aporte energético aos animais demonstrado pelo consumo de energia líquida e ganho de peso corporal os quais obtiveram

comportamento linear crescente para a suplementação com doses crescente de enzima fibrolítica exógena.

Figura 1 - pH ruminal em diferentes tempos após o fornecimento da alimentação matinal de vacas em lactação suplementadas com doses crescentes de enzima fibrolítica exógena

Tratamentos: controle (—), 8 g (— ·), 16 g (— —), 24 g (.....);
 Horário de fornecimento da alimentação (↑).

Figura 2 - N-NH₃ ruminal em diferentes tempos após o fornecimento da alimentação matinal de vacas em lactação suplementadas com doses crescentes de enzima fibrolítica exógena

Tratamentos: controle (—), 8 g (— ·), 16 g (— —), 24 g (.....);
 Horário de fornecimento da alimentação (↑).

Figura 3 - Acetato ruminal em diferentes tempos após o fornecimento da alimentação matinal de vacas em lactação suplementadas com doses crescentes de enzima fibrolítica exógena

Tratamentos: controle (—), 8 g (— · —), 16 g (— —), 24 g (.....); Horário de fornecimento da alimentação (↑).

Figura 4 - Propionato ruminal em diferentes tempos após o fornecimento da alimentação matinal de vacas em lactação suplementadas com doses crescentes de enzima fibrolítica exógena

Tratamentos: controle (—), 8 g (— · —), 16 g (— —), 24 g (.....); Horário de fornecimento da alimentação (↑).

Figura 5 - Butirato ruminal em diferentes tempos após o fornecimento da alimentação matinal de vacas em lactação suplementadas com doses crescentes de enzima fibrolítica exógena

Tratamentos: controle (—), 8 g (— ·), 16 g (— —), 24 g (.....); Horário de fornecimento da alimentação (↑).

Figura 6 - Ácidos graxos de cadeia curta ruminal em diferentes tempos após o fornecimento da alimentação matinal de vacas em lactação suplementadas com doses crescentes de enzima fibrolítica exógena

Tratamentos: controle (—), 8 g (— ·), 16 g (— —), 24 g (.....); Horário de fornecimento da alimentação (↑).

5.4 SÍNTESE DE PROTEÍNA MICROBIANA RUMINAL

Houve efeito quadrático sobre a síntese de proteína microbiana com inclusão de enzima fibrolítica a dieta ($P < 0.05$) (Tabela 9) com consequente redução da síntese de proteína microbiana com doses intermediárias de inclusão de enzima fibrolítica, no entanto com a dose de 24 g/vaca/dia, houve aumento desta produção, revelando que com doses de 8 e 16 g/vaca/dia, a síntese de proteína microbiana ruminal pode ser inibida sem que haja alteração no desempenho produtivo de vacas leiteiras, e com a dose de 24 g/vaca/dia os animais retomam a síntese de proteína microbiana ruminal, aumentando a eficiência de sua produção por quilograma de NDT consumido. Estes dados mostram que mesmo as vacas consumindo mais fibra longa, não há alteração no potencial fermentativo ruminal não diminuindo o desempenho produtivo.

Tabela 9 - Síntese de proteína microbiana de vacas em lactação alimentadas com níveis crescentes de inclusão de enzima fibrolítica na dieta

Item					EPM ²	(continua)	
	Tratamentos ¹					Probabilidades	
	0	8	16	24		(P) ³	
						L	Q
Alantoína/Creatinina	4,29	3,70	3,72	4,00	0,189	0,4744	0,095
	<i>mmol.dia⁻¹</i>						
Ácido Úrico urina	64,48	61,09	65,16	63,54	2,229	0,919	0,748
Alantoína urina	434,43	370,91	355,71	401,83	18,112	0,303	0,028
Alantoína leite	3,61	3,99	3,04	4,07	0,255	0,826	0,454
Purinas totais	505,83	435,04	422,65	469,43	19,596	0,304	0,029
Purinas absorvidas	536,33	452,49	438,1	493,19	22,915	0,302	0,028
	<i>Derivados de purinas (%)</i>						
Alantoína	85,61	85,91	84,40	85,57	0,486	0,517	0,445
	<i>g.dia⁻¹</i>						
N mic ⁴	389,93	328,98	318,52	358,57	16,660	0,302	0,028
PB mic ⁵	2437,09	2056,15	1990,74	2241,08	104,125	0,302	0,028

Item					EPM ²	(conclusão)	
	Tratamentos ¹					Probabilidades	
	0	8	16	24		(P) ³	
						L	Q
	<i>gPBMic.gNDT¹</i>						
Eficiência	147,47	129,32	119,12	136,17	6,340	0,202	0,026

¹0, 8, 16 e 24g de enzima fibrolítica/vaca/dia;

²EPM: Erro padrão da média;

³Probabilidade de efeito linear (L) e quadrático (Q), obtido por contrastes ortogonais;

⁴N mic: Nitrogênio microbiano;

⁵PB mic: Proteína microbiana;

Funções de regressão: Alantoína urina = $431,54(\pm 58,188) - 9,027(\pm 5,124)X + 0,3296(\pm 0,2046)X^2$;

Purinas totais = $502,2(\pm 65,205) - 9,762(\pm 5,500)X + 0,356(\pm 0,219)X^2$;

Purinas absorvidas = $535,81(\pm 69,389) - 14,946(\pm 6,039)X + 0,549(\pm 0,240)X^2$;

N mic = $386,79(\pm 55,623) - 8,393(\pm 4,707)X + 0,306(\pm 0,187)X^2$;

PB mic = $2417,46(\pm 347,65) - 52,458(\pm 29,423)X + 1,913(\pm 1,1746)X^2$;

Eficiência = $146,71,46(\pm 21,077) - 3,322(\pm 1,7107)X + 0,121(\pm 0,068)X^2$;

Médias corrigidas pela função LSMEANS do SAS 9.4.

Yang et al. (1999) encontraram efeito semelhante quanto à síntese de proteína microbiana ruminal mostrando maior taxa de desaparecimento da MS e do FDN. Mostra ainda que a alta solubilidade da FDN leva à maior e mais rápida adesão dos microrganismos às partículas alimentares, mecanismo que é pré-requisito para a maior síntese microbiana ruminal (KHALILI; HUHTANEN, 1991; MIRON et al., 1991).

Bach et al. (2005) descreve que a síntese de proteína microbiana ruminal é dependente de energia e nitrogênio disponível vindo da proteína degradável no rúmen, sendo o primeiro o mais limitante. Rode et al. (1999); Yang et al. (1999) e Gado et al. (2009), observaram que a suplementação de enzima fibrolítica pode elevar a degradabilidade ruminal de proteínas ou, ainda segundo Bowman et al. (2002) pode haver melhor aporte energético no rúmen com uso de enzimas fibrolíticas, podendo ter efeito no metabolismo de proteína e energia líquida ruminal e aumento na síntese de proteína microbiana ruminal.

Em contrapartida Yang et al. (1999); Nsereko et al. (2002) e Peters et al. (2010) não encontraram diferença na síntese de proteína microbiana quando suplementaram enzimas fibrolíticas às dietas de vacas leiteiras, mostrando que em seus estudos não houve aumento de energia disponível no rúmen em relação às dietas sem suplementação.

5.5 PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE E MUDANÇA DE PESO CORPORAL

Os resultados de desempenho produtivo estão apresentados na (Tabela 10). Não foram observadas diferenças na produção de leite, leite corrigido para 3,5% de gordura, bem como na produção de seus componentes ($P>0,05$) para vacas alimentadas com níveis crescentes de enzimas fibrolíticas. Da mesma forma o teor de gordura, proteína e lactose no leite não foram alterados ($P>0,05$), assim como os teores de ureia e nitrogênio ureico. Entretanto, a utilização de enzima fibrolítica resultou em aumento linear ($P<0,05$) no ganho de peso corpóreo, obtendo média de 0,412 kg/dia a mais de ganho de peso diário para animais recebendo 24g/vaca/dia em relação ao tratamento controle. Este resultado é esperado, pois, como houve aumento no consumo de energia líquida, já estando em balanço energético positivo e os animais não responderam em produção de leite, os nutrientes foram direcionados para a deposição de carcaça.

Tabela 10 - Desempenho produtivo de vacas em lactação suplementadas com níveis crescentes de inclusão de enzima fibrolítica exógena na dieta

Item	Tratamentos ¹				EPM ²	Probabilidades (P) ³	
	0	8	16	24		L	Q
<i>kg.dia⁻¹</i>							
Produção de leite	31,15	30,98	31,19	30,75	0,781	0,590	0,749
PL 3,5% ⁴	31,74	32,24	31,93	31,57	0,800	0,743	0,451
Gordura	1,10	1,14	1,11	1,10	0,032	0,640	0,250
Proteína	0,93	0,93	0,94	0,92	0,028	0,537	0,456
Lactose	1,40	1,40	1,41	1,38	0,042	0,570	0,463
Mudança de PC ⁵	0,08	0,17	0,41	0,42	0,076	0,012	0,531
<i>Composição (g.kg⁻¹)</i>							
Gordura	36,97	38,43	37,39	37,03	0,056	0,762	0,156
Proteína	30,88	31,03	30,86	30,78	0,010	0,114	0,074
Lactose	46,29	46,46	46,29	46,20	0,015	0,327	0,196
<i>mg.dl⁻¹</i>							
NUL ⁶	12,57	12,95	12,70	12,74	0,269	0,822	0,478

¹0, 8, 16 e 24g/vaca/dia de enzima fibrolítica na dieta;²EPM: Erro padrão da média;³Probabilidade de efeito linear (L) e quadrático (Q), obtido por contrastes ortogonais;⁴Produção de leite corrigida para 3,5% de gordura (Sklan et al., 1994),⁵PC: Peso Corporal;⁶NUL: Nitrogênio ureico no leite;

Médias corrigidas pela função LSMEANS do SAS 9.4.

Alguns estudos observaram aumento na produção de leite (LEWIS et al., 1999; RODE et al., 1999; SCHINGOETHE et al., 1999; KUNG et al., 2000; YANG et al., 2000; ADESOGAN et al., 2007; GADO et al., 2009; ARRIOLA et al., 2011; ROMERO et al., 2013), entretanto outros não detectaram nenhum efeito em desempenho (BERNARD et al., 2010; QUEIROZ et al., 2011; CHUNG et al., 2012). A maioria dos estudos citados, que obtiveram efeito na produção de leite, consistiram em analisar animais no início para o meio de lactação e não do meio para o fim, como no atual experimento. Todos os estudos que obtiveram aumento na produção de leite fizeram

suplementação a longo prazo com delineamento experimental contínuo, diferente do atual estudo que trabalhou com delineamento experimental em reversão do tipo quadrado latino.

O tempo de suplementação da enzima fibrolítica pode influenciar os resultados produtivos. Dois estudos envolvendo delineamentos contínuos (durante 10 semanas) ou em reversão tipo quadrado latino 3x3 com períodos de 21 dias conduzidos pelos mesmos autores Holtshausen et al. (2011) e Chung et al. (2012), respectivamente, usaram as mesmas dietas e o primeiro encontrou diminuição no consumo de matéria seca e aumento na eficiência de produção de leite, e no segundo estudo nenhum efeito foi encontrado. Além disso, alguns autores sugerem suplementação acima de 21 dias para que se possa ver efeitos (ROMERO, 2013; ADESOGAN et al., 2014).

De acordo com os resultados encontrados por Chung et al. (2012) a não diferença no desempenho, quando se suplementa vacas leiteiras em delineamentos de curto período (21 dias), é devido à falta de tempo para adaptação dos microrganismos ruminais. Pois, este autor detecta somente tendência de aumento na população de *Fibrobacter succinogenes* e nenhuma diferença nas outras comunidades de microrganismos com experimento em quadrado latino com períodos de 21 dias.

O atual estudo utilizou animais após o pico de lactação, em uma zona confortável de consumo de alimentos, em que já estava presente a queda de produção de leite e o consequente ganho de peso. O ganho de peso nesta fase da lactação é fisiologicamente compreensível devido ao efeito homeorrético nesta fase da lactação que privilegia a deposição de carcaça devido a diminuição da resistência à insulina. (ALLEN; PIANTONI, 2014). Além disso, todos os animais estavam em balanço energético positivo não possibilitando desafio energético para produção de leite entre os tratamentos.

Rode et al. (1999); Yang et al. (1999) e Holtshausen et al. (2011) encontraram tendência de aumento, aumento significativo ou nenhum efeito na produção de leite, respectivamente, sem efeito no ganho de peso dos animais. Estes resultados demonstram que a fase da lactação a ser avaliada pode interferir nos resultados esperados.

Elwakeel et al. (2007) encontraram efeito quadrático no ganho de peso de animais suplementados com doses crescentes de enzima fibrolítica exógena, com menores valores de ganho para as doses intermediárias em relação à dieta sem suplementação e à dieta com dose máxima da enzima (15 g/animal/dia). Estes mesmos

autores observaram aumento numérico da eficiência de produção de leite com as doses intermediárias em relação à controle à dose máxima, sugerindo que a enzima alterou a repartição de nutrientes, aumentando a deposição de carcaça dos animais quando suplementado com doses altas de enzima fibrolítica exógena. Já Knowlton et al. (2002) observaram maior ganho de peso em vacas no início da lactação suplementadas com enzimas fibrolíticas sugerindo que as vacas estando em balanço positivo de energia não foi possível aumentar a produção de leite, assim como neste estudo.

Alguns trabalhos com bovinos de corte (BEAUCHEMIN et al., 1995; BEAUCHEMIN et al., 1999; MACALLISTER et al., 1999; BALCI et al., 2007) têm mostrado aumento no ganho de peso diário dos animais com a suplementação de enzima fibrolítica às dietas, entretanto a alta variabilidade é vista por causa dos níveis de forragem nas dietas, dose de enzima utilizada, tempo antes da alimentação, que é adicionada a enzima, e em qual parte da dieta o aditivo é aplicado. Desempenho satisfatório é observado mesmo com dietas de alta inclusão de grãos cereais, mostrando haver um sinergismo o qual melhora o aproveitamento dos nutrientes no rúmen (MEALE et al., 2013).

O aumento no ganho de peso do atual estudo, proporcionado pela adição de enzima fibrolíticas às dietas, é devido à melhora no balanço energético dos animais. Como os animais estavam no terço médio do estágio de lactação a energia foi disponibilizada para ganho de peso corporal ao invés de ser direcionada para produção de leite. Bowman et al. (2002) sugerem que melhor efeito de produção de leite é encontrado em animais com balanço energético negativo no início da lactação.

5.6 BALANÇO DE NITROGÊNIO

Os resultados da dinâmica de nitrogênio estão apresentados na (Tabela 11). O consumo de nitrogênio e a excreção de nitrogênio pelas fezes e leite não foram alterados com a inclusão de enzima fibrolítica à dieta ($P>0,05$), mas houve efeito quadrático na excreção de nitrogênio na urina ($P<0,05$), com menores excreções nas doses intermediárias da inclusão de enzima. O balanço de nitrogênio apresentou comportamento quadrático ($P<0,05$) mostrando maior retenção de nitrogênio no organismo com a suplementação intermediária de enzimas fibrolíticas, com maior valor

foi para a dieta com a dose de 16 g/vaca/dia, obtendo queda para a dieta com 24 g/vaca/dia.

A excreção nitrogênio na urina como porcentagem do nitrogênio consumido apresentou efeito quadrático ($P<0,05$) com maiores excreções com a dieta controle e com a dose de 24g/vaca/dia, sendo observados menores excreções urinárias de nitrogênio quando se suplementou 8 e 16g/vaca/dia da enzima fibrolítica.

A secreção de nitrogênio no leite como porcentagem do consumido diminuiu linearmente com a inclusão de enzima fibrolítica à dieta ($P<0,05$), mostrando que o nitrogênio pode ter sido particionado para outros tecidos, além da glândula mamária.

Spanghero e Kowalski (1997) realizaram uma compilação de dados utilizando o modelo de meta-análise, e avaliaram 35 experimentos e 135 dietas diferentes, com média de consumo de matéria seca de 17,6 kg/dia, e produção média de leite de 26,1 kg/dia. Estes autores avaliaram o balanço de nitrogênio em vacas leiteiras e verificaram valores médios de balanço de nitrogênio de $38,8\pm 52,2$ g/dia com consumo ficando entre 231 e 784 g de nitrogênio/dia. No presente estudo, a média de balanço de nitrogênio foi de 70,97 g/dia e o consumo foi 639,71 g de nitrogênio/dia estando dentro dos valores relatados.

O nitrogênio usado em metabolismo produtivo (leite ou massa corporal) é correlacionado positivamente com a digestibilidade do nitrogênio dietético. A retenção do nitrogênio na massa corporal é relatada ser maior do que a secretada no leite, entretanto este fato não é muito aceito quando se trata de vacas de alta produção de leite, pois as reservas de proteína são menores do que a produção de proteína no leite (SPANGHERO; KOWALSKI, 1997). Experimentos com humanos (HEGSTED, 1976; ODDOYE; MARGEN, 1979) encontraram maior retenção na massa corporal de nitrogênio quando se aumentou a digestibilidade do nitrogênio consumido. Estes dados podem explicar a menor eficiência de secreção de nitrogênio no leite linearmente com a suplementação de enzimas fibrolíticas, pois os animais ganharam mais peso linearmente com a dose crescente da enzima fibrolítica.

Tabela 11 - Balanço de nitrogênio de vacas em lactação suplementadas com níveis crescentes de inclusão de enzima fibrolítica exógena na dieta

Item	Tratamentos ¹				EPM ²	Probabilidades (P) ³	
	0	8	16	24		L	Q
<i>Consumo (g.dia⁻¹)</i>							
Nitrogênio	628,08	643,51	644,42	642,86	9,893	0,1793	0,2515
<i>Excreção (g.dia⁻¹)</i>							
Fecal	153,26	165,64	158,31	157,11	5,550	0,886	0,302
Urinário	297,83	239,46	260,54	288,61	12,350	0,934	0,017
Leite	146,30	146,44	147,32	144,06	4,408	0,548	0,431
<i>Balanço⁴ (g.dia⁻¹)</i>							
Nitrogênio	36,37	92,33	95,84	59,36	11,134	0,360	0,011
<i>Excreção (% nitrogênio consumido)</i>							
Fecal	24,21	25,42	24,17	24,32	0,693	0,830	0,575
Urinário	46,73	38,22	40,79	45,93	1,98	0,988	0,014
Leite	23,22	22,76	22,66	22,38	0,605	0,048	0,756
<i>Balanço (% nitrogênio consumido)</i>							
Nitrogênio	8,78	13,70	12,25	9,97	1,754	0,869	0,202

¹0, 8, 16 e 24g/vaca/dia de enzima fibrolítica na dieta;²EPM: Erro padrão da média;³Probabilidade de efeito linear e quadrático, obtido por contrastes ortogonais;⁴Consumo de nitrogênio – Excreção total de nitrogênio (N fezes + N urina + N leite)

Funções de regressão:

Excreção de Nitrogênio Urinário = 293,18(±37,491)-8,071(±3,462)X+0,335(±0,137)X²;Balanço de Nitrogênio = 37,579(±26,268)+9,597(±3,401)X-0,3627(±0,136)X²;Excreção Nitrogênio urinário = 46,220(±5,413)-1,270(±0,528)X+0,0533(±0,021)X²;

Excreção de Nitrogênio leite = 23,201(±1,683)-0,049(±0,056)X;

Balanço de Nitrogênio = 6,188(±4,874)+1,230(±0,5643)X-0,049(±0,022)X²;

Médias corrigidas pela função LSMEANS do SAS 9.4.

Cardozo et al. (2000, 2002) trabalhando com cultura contínua de fermentação *in vitro* encontraram que quando o conteúdo ruminal usados são de animais consumindo 100% forragem, em suas rações, há maior atividade proteolítica em relação à conteúdo ruminal vindo de animais alimentados com rações compostas de 90% de concentrado. Alguns trabalhos sugerem que bactérias amilolíticas possuem maior capacidade de degradar proteína, entretanto no estudo de Cardozo et al. (2000) a degradação de proteína foi consistentemente menor para meio de cultura vindo de vacas alimentadas com alta inclusão de amido.

Este resultado indica que o tipo de população microbiana é influenciado pelo tipo de substrato presente no rúmen. Deste modo, é provável que maior população de

bactérias celulolíticas, quando se suplementa enzimas fibrolíticas devido à maior solubilidade da FDN, pode-se aumentar o potencial de degradação de proteínas ruminais aumentando a síntese de proteína microbiana e consequentemente melhorando a eficiência de uso do nitrogênio devido ao melhor perfil de aminoácidos chegando ao intestino delgado o que proporcionou a maior retenção de nitrogênio encontrada no atual estudo.

A maior excreção de nitrogênio urinário no tratamento controle e com a dose de 24 g/vaca/dia pode ser devido ao potencial aumento de proteína degradável no rúmen (PDR), e amido degradável no rúmen como observado por Arndt et al. (2015) que trabalharam com dietas com diferentes proporções de PDR, proteína não-degradável no rúmen (PNDR) e amido. Esta explicação é plausível para a menor secreção de nitrogênio no leite com o aumento na dose de enzima fibrolítica. No tratamento controle houve seleção de partículas pequenas da dieta sugerindo maior consumo de concentrado e, na dose máxima de enzima, houve melhora no perfil fermentativo do rúmen aumentando disponibilidade de substratos aos microrganismos mesmo havendo maior consumo de fibra longa, isto faz com que haja excesso de nitrogênio disponível ao animal levando à maior excreção e menor utilização para o leite. Entretanto, não foi detectado efeito nos níveis de nitrogênio ureico sanguíneo ($P>0,05$).

5.7 METABÓLITOS SANGUÍNEOS

Não houve alteração na concentração sanguínea de glicose, ureia e nitrogênio ureico, bem como das enzimas hepáticas GGT e AST, com a inclusão de enzimas fibrolíticas ($P>0,05$) mostrado na (Tabela 12).

Tabela 12 - Metabólitos sanguíneos de vacas leiteiras alimentadas com níveis crescentes de inclusão enzima fibrolítica exógena na dieta

Item	Tratamentos ¹				EPM ²	Probabilidades (P) ³	
	0	8	16	24		L	Q
	<i>mg.dl⁻¹</i>						
Glicose	74,98	74,08	74,81	74,33	1,172	0,889	0,914
Ureia	36,80	36,54	37,61	36,37	0,622	0,939	0,454
NUS ⁴	17,19	17,09	17,65	17,26	0,303	0,592	0,668
	<i>U. l⁻¹</i>						
GGT ⁵	25,75	26,21	26,90	23,63	0,969	0,493	0,116
AST ⁶	59,28	54,23	56,67	55,52	1,840	0,574	0,577

¹0, 8, 16 e 24g de enzima fibrolítica/vaca/dia;²EPM: Erro padrão da média;³Probabilidade de efeito linear e quadrático, obtido por contrastes ortogonais;⁴NUS: Nitrogênio ureico no sangue;⁵GGT: Gama-glutamyl transferase;⁶AST: Aspartato transaminase;

Médias corrigidas pela função LSMEANS do SAS 9.4.

Com o aumento no consumo de energia líquida e maior produção de propionato ruminal poderia ter havido maior taxa de gliconeogênese hepática, entretanto, neste experimento estes resultados não foram suficientes para elevar a concentração de glicose plasmática. Os níveis de ureia e NUS plasmáticos estão dentro da faixa esperada para vacas leiteiras (REBHUN, 2008), não apresentando diferença em sua concentração com a inclusão da enzima fibrolítica nas dietas. Os mesmos resultados foram encontrados por Hristov et al. (2000) que trabalharam com novilhas de corte e Shekhar et al. (2010) que trabalharam com búfalos leiteiros.

As concentrações das enzimas hepáticas (AST e GGT) são correlacionadas com lesão hepática retratando toxicidade de alimentos aos animais. Suas concentrações ficaram dentro dos limites fisiológicos (REBHUN, 2008) e não foram alteradas pelas rações experimentais neste estudo, concluindo que os animais não tiveram diferença em seu metabolismo hepático comprovando, desta maneira, o efeito atóxico das enzimas fibrolíticas exógenas aos animais quando incluída às dietas, podendo ser usada com segurança.

6 CONCLUSÃO

A suplementação de enzima fibrolítica exógena em doses crescentes aumenta o consumo de MS e FDN e também melhora a eficiência fermentativa ruminal de vacas leiteiras aumentando o balanço energético e consequentemente o ganho de peso. Entretanto, não é efetiva em aumentar a produção de leite de animais no terço médio de lactação.

REFERÊNCIAS

- ADESOGAN, A. T.; KIM, S. C.; ARRIOLA, K. G.; DEAN, D. B.; STAPLES, C. R. Strategic addition of dietary fibrolytic enzymes for improved. Performance of lactating dairy cows. In: FLORIDA RUMINANT NUTRITION SYMPOSIUM, 18., 2007, Gainesville. **Proceedings...** Gainesville: University of Florida, 2007. p. 92-110.
- AHN, J. H.; KIM, Y. J.; KIM, H. J., Effects of fibrolytic enzyme addition on ruminal fermentation, milk yield and milk composition of dairy cows. **Journal of Animal Science and Technology**, v. 45, p. 131–142, 2003.
- AKAIKE, H. A new look at the statistical model identification. **IEEE Transactions on Automatic Control**, v. AC - 19, n. 6, p. 716-723, 1974.
- ALLEN, M. S.; MERTENS, D. R. Evaluating constraints on fiber digestion by rumen microbes. **Journal of Nutrition**, v. 118, n. 1, p. 261-270, 1988.
- ALLEN, M. S.; PIANTONI, P. Carbohydrate nutrition: Managing energy intake and partitioning through lactation. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v. 30, p. 577–597, 2014.
- ALLEN, M. S. Physical constraints on voluntary intake of forages by ruminants. **Journal of Animal Science**, v.74, n.9, p.3063-3075, 1996.
- ALLEN, M. S. Relationship between fermentation acid production in the rumen and the requirement for physically effective fiber. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 1447, 1997.
- ALLEN, M. S. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 1598-1624, 2000.
- ALLEN, M. S.; VOELKER, L. J. A. In vivo methods to measure digestibility and digestion kinetics of feed fractions in the rumen. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL AVANÇOS EM TÉCNICAS DE PESQUISA EM NUTRIÇÃO DE RUMINANTES, 2007, Pirassununga. **Anais...** Pirassununga: Universidade de São Paulo, 2007. p. 72-89.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official Methods of Analysis**. 15th ed. Washington, DC.,USA, 1990.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official Methods of Analysis**. 18th ed. Gaithersburg, MA., USA, 2006.

ARMENTANO, L.; PEREIRA, M. Measuring the effectiveness of fiber by animal response trials. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 7, p. 1416-1425, 1997.

ARNDT, C.; POWELL, J. M.; AGUERRE, M. J.; WATTIAUX, M. A. Performance, digestion, nitrogen balance, and emission of manure ammonia, enteric methane, and carbon dioxide in lactating cows fed diets with varying alfalfa silage-to-corn silage ratios. **Journal of Dairy Science**, v. 98, p. 418–430

ARRIOLA, K. G.; KIM, S. C.; STAPLES, C. R.; ADESOGAN, A. T. Effect of fibrolytic enzyme application to low and high concentrate diets on the performance of lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 832-841, 2011

BACIC, A.; HARRIS, P. J.; STONE, B. A. Structure and function of plant cell walls. **The Biochemistry of Plants**, v. 14, p. 297–371, 1988.

BACH, A.; CALSAMIGLIA, S.; STERN, M. D. Nitrogen metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. E9–E21, 2005.

BALCH, C. C. Proposal to use time spent chewing as an index of the extent to which diets for ruminants possess the physical property of fibrousness characteristic of roughages. **British Journal of Nutrition**, v. 26, p. 383-392, 1971.

BALCI, F.; DIKMEN, S.; GENCOGLU, H.; ORMAN, A.; TURKMEN, I. I.; BIRICIK, H. The effect of fibrolytic exogenous enzyme on fattening performance of steers. **Bulgarian Journal Veterinary Medicine**, v. 10, p. 113-118, 2007.

BANSAL, P.; HALL, M. B.; REALFF, M. J.; LEE, J. H.; BOMMARIUS, A. S. Modeling cellulase kinetics on lignocellulosic substrates. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 6, p. 833-848, 2009.

BARLETTA, A. Introduction: current market and expected developments. In: BEDFORD, M. R.; PARTRIDGE, G. G. (Ed.). **Enzymes in farm animal nutrition**. 2. edition, London, UK, CAB International, 2011. p. 1-11.

BAYER, E. A.; CHANZYT, H.; LAMEDI, R.; SHOHAM, Y. Cellulose, cellulases and cellulosomes. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 8, p. 548-557, 1998.

BEAUCHEMIN, K. A.; HOLTSHAUSEN, L. Developments in enzyme usage in ruminants. In: BEDFORD, M. R.; PARTRIDGE, G. G. (Ed.). **Enzymes in farm animal nutrition**. 2. ed. London, UK, CAB International, 2011. p. 206-230.

BEAUCHEMIN, K. A.; RODE, L. M. The potential use of feed enzymes for ruminants. In: CORNELL NUTRITION CONFERENCE FOR FEED MANUFACTURERS, 58., 1996. **Proceedings...** Ithaca: Cornell University, 1996. p.131-141.

BEAUCHEMIN, K. A.; RODE, L. M.; MAEKAWA, M.; MORGAVI, D. P.; KAMPEN, R. Evaluation of a non-starch polysaccharidase feed enzyme in dairy cow diets. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 543–553, 2000.

BEAUCHEMIN, K. A.; COLOMBATTO, D.; MORGAVI, D.P.; YANG, W. Z. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. **Journal of Animal Science**, v. 81, p. E37–E47, 2003a.

BEAUCHEMIN, K. A.; YANG, W. Z.; RODE, L. M. Effects of particle size of alfalfa-based dairy cow diets on chewing activity, ruminal fermentation, and milk production. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 630–643, 2003b.

BEAUCHEMIN, K. A.; COLOMBATTO, D.; MORGAVI, D. P.; YANG, W. Z.; RODE, L. M. Mode of action of exogenous cell wall degrading enzymes for ruminants. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 84, p. 13–22, 2004.

BERGMAN, E. N. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. **Physiological Reviews**, v. 70, p. 567, 1990.

BERNARD, J. K.; CASTRO, J. J.; MULLIS, N. A.; ADESOGAN, A. T.; WEST, J. W.; MORANTES, G. Effect of feeding alfalfa hay or Tifton 85 bermudagrass haylage with or without a cellulase enzyme on performance of Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 5280–5285, 2010.

BHAT, M. K.; HAZLEWOOD, G. P. Enzymology and other characteristics of cellulases and xylanases. In: BEDFORD, M. R.; PARTRIDGE G. G. (Ed.). **Enzymes in farm animal nutrition**. Wallingford, UK: CABI Publications, 2001. p. 11-60.

BHAT, M. K.; MCCRAE, S. I.; WOOD, T. M. The endo-(1→4)-β-glucanase system of *Penicillium pinophilum* cellulase: Isolation, purification, and characterization of five major endoglucanase components. **Carbohydrate Research**, v. 190, p. 279-297, 1989.

BIDLACK J.; MALONE, M.; BENSON, R. Molecular structure and component integration of secondary cell wall in plants. **Proceedings of the Oklahoma Academy Science**, v. 72, p. 51–56, 1992. Disponível em: <http://digital.library.okstate.edu/oas/oas_pdf/v72/p51_56.pdf>. Acesso em: 01 jul. 2015.

BOON, E. J. M. C.; STRUIK, P. C.; TAMMINGA, S.; ENGELS, F. M.; CONE, J. W. Stem characteristics of two forage maize (*Zea mays* L.) cultivars varying in whole plant digestibility. III. Intra-stem variability in anatomy, chemical composition and in vitro rumen fermentation. **NJAS-Wageningen Journal of Life Science**, v. 56, p. 101-122, 2008.

BORASTON, A.; BOLAM, D. N.; GILBERT, H. J.; DAVIES, G. J. Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. **Biochemistry Journal**, v. 382, p. 769-781, 2004.

BOWMAN, G. R.; BEAUCHEMIN, K. A.; SHELFORD, J. A. The proportion of the diet to which fibrolytic enzymes are added affects nutrient digestion by lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 3420-3429, 2002.

BOWMAN, G. R.; BEAUCHEMIN, K. A.; SHELFORD, J. A. Fibrolytic enzymes and parity effects on feeding behavior, salivation, and ruminal pH of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 565–575, 2003.

BRENDA. **The comprehensive enzyme information system**. 2013. Disponível em: <<http://www.brenda-enzymes.org/>>. acesso em: 13 jun. 2015.

BRITO, A. F.; BRODERICK, G. A. Effect of varying dietary ratios of alfalfa silage to corn silage on production and nitrogen utilization in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 3924–3938, 2006.

BRITO, C. J. F. A.; RODELLA, R. A.; DESCHAMPS, F. C. Perfil químico da parede celular e suas implicações na digestibilidade de *Brachiaria brizantha* e *Brachiaria humidicola*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 6, p. 1835-1844, 2003. Suplement, 2.

BRODERICK, G. A.; KANG, J. H. Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and *in vitro* media. **Journal of Dairy Science**, v. 63, p. 64-75, 1980.

BUCKERIDGE, M. S. Seed Cell Wall Storage Polysaccharides: models to understand cell wall biosynthesis and degradation. **Plant Physiology**, v. 154, p. 1017–1023, 2010.

BURNS, J. C.; POND, K. R.; FISHER, D. S.; LUGINBUHL, J. M. Changes in forages quality, ingestive mastication and digesta kinetics resulting from switchgrass maturity. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 1368-1379, 1997.

BURNS, J. C. ASAS centennial paper: utilization of pasture and forages by ruminants: a historical perspective. **Journal of Animal Science**, v. 86, p. 3647-3663, 2008.

BUXTON, D. R.; BRASCHE, M. R. Digestibility of structural carbohydrates in cool-season grass and legume forages. **Crop Science**, v. 31, p. 1338–1345, 1991.

CACCAMO, M.; FERGUSON, J. D.; VEERKAMP, R. F.; SCHADT, I.; PETRIGLIERI, R.; AZZARO, G.; POZZEBON, A.; LICITRA, G. Association of total mixed ration particle fractions retained on the Penn State Particle Separator with milk, fat, and protein yield lactation curves at the cow level. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 4, p. 2502-2511, 2014.

CARDOZO, P.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A. Effect of pH on microbial fermentation and nutrient flow in a dual flow continuous culture system. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 265, 2000. Supplement, 1.

CARDOZO, P.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A. Effects of pH on nutrient digestion and microbial fermentation in a dual flow continuous culture system fed a high concentrate diet. **Journal Dairy Science**, v. 85, p. 182, 2002. Supplement, 1.

CARRARD, G.; LINDER, M. Widely different off-rates of two closely related cellulose-binding domains from *Trichoderma reesei*. **European Journal of Biochemistry**, v. 262, p. 637–643, 1999.

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

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

CHANLIAUD, E.; BURROWS, K. M.; JERONIMIDIS, G.; GIDLEY, M. J. Mechanical properties of primary plant cell wall analogues. **Planta**, v. 215, n. 6, p. 989-996, 2002

CHENG, K. J.; STEWART, C. S.; DINSDALE, D.; COSTERTON, J. W. Electron microscopy of the bacteria involved in the digestion of plant cell walls. **Animal Feed Science and Technology**, v. 10, p. 93, 1984.

CHENG, K. J.; MCALLISTER, T. A.; MIR, Z.; SELINGER, L. B.; YANKE, L. J.; OOSTING, S. J.; TREACHER, R. J. **Use of enzymes to enhance the utilization of feeds by ruminants**. Marlborough, Wiltshire, UK: Research report prepared for Finnfeeds International Ltd, 1995.

CHIZZOTTI, M. L.; VALADARES, S. C.; VALADARES FILHO, R.F.D.; CHIZZOTTI, F. H. M.; TEDESCHI, L. O. Determination of creatinine excretion and evaluation of spot urine sampling in Holstein cattle. **Livestock Science**, v. 113, n.2-3, p. 218-225, 2008.

CHUNG, Y. H.; ZHOU, M.; HOLTSHAUSEN, L.; ALEXANDER, T. W.; MCALLISTER, T. A.; GUAN, L. L.; OBA, M.; BEAUCHEMIN, K. A. Fibrolytic enzyme additive for lactating Holstein cow diets: Ruminal fermentation, rumen microbial populations, and enteric methane emissions. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 1419-1427, 2012.

COELHO, D. T.; ROCHA, J. A. A. **Práticas de processamento de produtos animais**, Viçosa: UFV, 1977. 79 p.

COLOMBATTO, D. **Use of enzymes to improve fibre utilization in ruminants. A biochemical and in vitro rumen degradation assessment**. 2000. Ph.D. Thesis, University of Reading, U.K., 2000.

COLOMBATTO, D.; MORGAVI, D. P.; FURTADO, A. F.; BEAUCHEMIN, K. A.. Screening of fibrolytic enzymes as feed additives for ruminants: Can the effect of enzyme additives on in vitro fermentations be predicted by enzyme activities and feed hydrolysis? **Journal of dairy Science**, v. 85, p. 355, 2002.

COSTA, M. G.; CAMPOS, J. M. S.; VALADARES FILHO, S. C.; VALADARES, R. F. D.; MENDONÇA, S. S.; SOUZA, D. P.; TEIXEIRA, M. P. Desempenho produtivo de vacas leiteiras alimentadas com diferentes proporções de cana-de-açúcar e

concentrado ou silagem de milho na dieta. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, p. 2437-2445, 2005.

COUGHLAN, M. P.; TUOHY, M. G.; FILHO, E. X. F.; PULS, J.; CLAYESSENS, M. VRSANSKÁ, M.; HUGHES, M. M. Enzymological aspects of microbial hemicellulases with emphasis on fungal systems. In: COUGHLAN M. P.; HAZLEWOOD, G. P. (Ed.). **Hemicellulose and hemicellulases**. London: Portland Press, 1993. p. 53-84.

CRAIG, W. M.; BRODERICK, G. A.; RICKER, D. B. Quantitation of microorganisms associated with the particulate phase of ruminal ingesta. **Journal of Nutrition**, v. 117, p. 56, 1987.

DADO, R. G.; ALLEN, M. S. Intake limitations, feeding behavior, and rumen function of cows challenged with rumen fill from dietary fiber or inert bulk. **Journal of Dairy Science**, v. 78, p. 118-133, 1995.

DEHORITY, B. A.; TIRABASSO, P. A. Effect of ruminal cellulolytic bacterial concentrations on *in situ* digestion of roughage cellulose. **Journal of Animal Science**, v. 76, n. 11, p. 2905-2911, 1998.

DESCHAMPS, F. C.; RAMOS, L. P. Método para a determinação de ácidos fenólicos na parede celular de forragens. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, p. 1634-1639, 2002.

DESCHAMPS, F. C. Implicações do período de crescimento na composição química e digestão dos tecidos de cultivares de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* schum.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 28, p. 1358-1369, 1999.

DETMANN, E.; PAULINO, M. F.; ZERVOUDAKIS, J. T.; VALADARES FILHO, S. C.; EUCLYDES, R. F.; LANA, G. P. QUEIROZ, D. S. Cromo e indicadores internos na determinação do consumo de novilhos mestiços, suplementados, a pasto. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, p. 1600-1609, 2001.

DIDI, V.; JACKSON, P.; HEJÁTKO, J. Review paper: Hormonal regulation of secondary cell wall formation. **Journal of Experimental Botany**, 2015. Publicação on line: doi:10.1093/jxb/erv222. Disponível em: <
<http://jxb.oxfordjournals.org/content/early/2015/05/22/jxb.erv222.abstract>>. Acesso em: 02 Set. 2015.

DIXON, R. M.; MILLIGAN, L. P. Removal of digesta components from the rumen of steers determined by sieving techniques and fluid, particulate and microbial markers. **British Journal of Nutrition**, v. 53, n. 2, p. 347-362, 1985.

DODD, D.; CANN, I. K. O. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. **Global Change Biology Bioenergy**, v. 1, p. 2-17, 2009.

EDMONSON, A. J.; LEAN, I. J.; WEAVER, L. D.; FARVER, T.; WEBSTER, G. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 72, n. 1, p. 68-78, 1989.

ERWIN, E. S.; MARCO, G. J.; EMERY, E. M. Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. **Journal of Dairy Science**, v. 44, n. 9, p. 1768-1771, 1961.

FENG, P.; HUNT, C. W.; PRITCHARD, G. T.; JULIEN, W. E. Effect of enzyme preparations on in situ and in vitro degradation and in vivo digestive characteristics of mature cool-season grass forage in beef steers. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 1349-1357, 1996.

ELWAKEEL, E. A.; TITGEMEYER, E. C.; JOHNSON, B. J.; ARMENDARIZ, C.K.; SHIRLEY, J.E. Fibrolytic enzymes to increase the nutritive value of dairy feedstuffs. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 5226-5236, 2007.

ENGELS, F. M. Some properties of cell wall layers determining ruminant digestion. In: CHESSON, A.; ORSKOV, E. R. (Ed.). **Physico-chemical characterization of plant residues for industrial and feed use**. London: Applied Science Publishers, 1989. p. 80.

ERIKSSON, K. E. L.; BLANCHETTE, R. A.; ANDER, P. **Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components**, New York, N.Y.: Springer-Verlag, 1990. 407 p.

EVERT, R. F. **Esau's Plant anatomy. Meristems, cells, and its tissue of the plant body: their structure, function, and development**. 3. ed. New Jersey: Wiley-Interscience, Hoboken, 2006. p. 1-567.

EXPLORENZ. **The enzyme database**. 2015. Disponível em: <http://www.enzymedatabase.org/index.php>. Acesso em: 10 jun. 2015.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). **Livestock's long shadow: environmental issues and options**. FAO, Rome, 2006. Disponível em: <http://ftp.fao.org/docrep/fao/010/a0701e/A0701E00.pdf>. Acesso em: 12 Ago. 2015.

FAULDS, C. B.; WILLIAMSON, G. Purification and characterization of a ferulic acid esterase (FAE-III) from *Aspergillus niger*: specificity for the phenolic moiety and binding to microcrystalline cellulose. **Microbiology**, v. 140, n. 4, p. 779-787, 1994.

FILHO, E. X. F. The xylan degrading enzyme system. **Brazilian Journal Medical and Biological Research**, v. 27, p. 1093-1109, 1994.

FIRKINS, J. L.; ALLEN, M. S.; OLDICK, B. S.; ST-PIERRE, N. R. Modeling ruminal digestibility of carbohydrates and microbial protein flow to the duodenum. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 3350-3369, 1998.

FORSBERG, C. W.; BEVERIDGE, T. J.; HELLSTROM, A. Cellulase and xylanase release from *Bacteroides succinogenes* and its importance in the rumen environment. **Applied Environmental Microbiology**, v. 42, p. 886-896, 1981.

FRANCIS, C. A.; PRAGER, M.; LAING, D. R.; FLOR, C. A. Genotype x environment interactions in bush bean cultivars in monoculture and associated with maize. **Crop Science**, v. 18, p. 237-242, 1978.

FUJIHARA, T.; ØRSKOV, E. R.; REEDS, P. J. The effect of protein infusion on urinary excretion of purine derivatives in ruminants nourished by intragastric nutrition. **Journal of Agricultural Science**, v. 109, p. 7-12, 1987.

GADO, H. M.; SALEM, A. Z. M.; ROBINSON, P. H.; HASSAN, M. Influence of exogenous enzymes on nutrient digestibility, extent of ruminal fermentation as well as milk production and composition in dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, v. 154, p. 36-46, 2009.

GETACHEW, G.; CROVETTO, G. M.; FONDEVILA, M.; KRISHNAMOORTHY, U.; SINGH, B.; SPANGHERO, M.; STEINGASS, H.; ROBINSON, P. H.; KAILAS, M. M. Laboratory variation of 24 h *in vitro* gas production and estimated metabolizable energy value of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 102, p. 169-180, 2002.

GIGER-REVERDIN, S. Review of the main methods of cell wall estimation: interest and limits for ruminants. **Animal Feed Science and Technology**, v. 55, p. 295-334, 1995.

- GILBERT, H. J. Cellulosomes: microbial nanomachines that display plasticity in quaternary structure. **Molecular Microbiology**, v. 63, n. 6, 1568–1576, 2007.
- GILBERT, H. J. The biochemistry and structural biology of plant cell wall deconstruction. **Plant Physiology**, v. 153, p. 444–455, 2010.
- GIRALDO, L. A.; RANILLA, M. J.; TEJIDO, M. L.; CARRO, M. D. Influence of exogenous fibrolytic enzymes and fumarate on methane production, microbial growth and fermentation in Rusitec fermenters. **British Journal of Nutrition**, v. 98, p. 753–761, 2007.
- GIRALDO, L. A.; TEJIDO, M. L.; RANILLA, M. J.; RAMOS, S.; CARRO, M. D. Influence of direct-fed fibrolytic enzymes on diet digestibility and ruminal activity in sheep fed a grass hay-based diet. **Journal of Animal Science**, v. 86, p. 1617–1623, 2008a.
- GIRALDO, L. A.; RANILLA, M. J.; TEJIDO, M. L.; CARRO, M. D. Effects of exogenous fibrolytic enzymes on in vitro ruminal fermentation of substrates with different forage:concentrate ratios. **Animal Feed Science and Technology**, v. 141, p. 306–325, 2008b.
- GOES, R. H. T. B.; MANCIO, A. B.; VALADARES FILHO, S. C.; LANA, R. P. Degradação ruminal da matéria seca e proteína bruta, de alimentos concentrados utilizados como suplementos para novilhos. **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 28, n. 1, p. 167–173, 2004.
- GRABBER, J. H.; RALPH, J.; HATFIELD, R. D. Ferulate cross-link limit the enzymatic degradation of synthetically lignified primary walls of maize. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 2609–2614, 1998.
- GUSTAFSON, R. H.; BOWEN, R. E. Antibiotic use in animal agriculture. **Journal of Applied Microbiology**, v. 83, p. 531–541, 1997.
- HALL, M. B. **Calculation of non-structural carbohydrate content of feeds that contain non-protein nitrogen**. Gainesville: University of Florida, 2000. p. A-25 (Bulletin, 339).

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

HARVATINE, K. J.; ALLEN, M. S. Effects of fatty acid supplements on ruminal and total tract nutrient digestion in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 1092–1103, 2006b.

HARVATINE, D. I.; WINKLER, J. E.; DEVANT-GUILLE, M.; FIRKINS, J. L.; ST. PIERRE, N. R.; OLDICK, B. S.; EASTRIDGE, M. L. Whole linted cottonseed as a forage substitute: fiber effectiveness and digestion kinetics. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 8, p. 1988-1999, 2002.

HASSANAT, F.; GERVAIS, R.; JULIEN, C.; MASSE, D. I.; LETTAT, A.; CHOUINARD, P. Y.; PETIT, H. V.; BENCHAAAR, C. Replacing alfalfa silage with corn silage in dairy cow diets: Effects on enteric methane production, ruminal fermentation, digestion, N balance, and milk production. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 4553–4567, 2013.

HATFIELD, R. D. Cell wall polysaccharides interaction and degradability. In: JUNG, H. G.; BUXTON, D. R.; HATFIELD, R. D.; RALPH, J. (Ed.). **Forage cell wall structure and digestibility**. Madison: American Society of Agronomy, Crop Science Society American and Soil Science Society American, 1993. p. 285-313.

HATFIELD, R. D.; RALPH, J.; GRABBER, J. H. Cell wall structural foundations: Molecular basis for improving forage digestibilities. **Crop Science**, v. 39, n. 1, p. 27-37, 1999.

HEGSTED, D. M. Balance studies. **Journal of Nutrition**, v. 106, p. 307-311, 1976.

HEINRICHS, P. J.; KONONOFF, P. J. **Evaluating particle size of forages and TMRs using the New Penn State Forage Particle Separator**. University Park: Pennsylvania State University/Department of Dairy and Animal Science, 2002. 14 p (Technical Report DAS 02-42).

KRUEGER, N. A.; ADESOGAN, A. T.; STAPLES C. R.; KRUEGER, W. K.; DEAN, D. B.; LITTELL R. C. The potential to increase the digestibility of tropical grasses with a fungal ferulic acid esterase enzyme preparation. **Animal Feed Science and Technology**, v. 145, p. 95-108, 2008a.

KRUEGER, N. A.; ADESOGAN A. T. Effect of different mixtures of fibrolytic enzymes on digestion and fermentation of bahiagrass hay. **Animal Feed Science and Technology**, v. 145, p. 84-94, 2008b.

HALL, M. B.; NENNICH, T. D.; DOANE, P. H.; BRINK, G. E. Total volatile fatty acid concentrations are unreliable estimators of treatment effects on ruminal fermentation in vivo. **Journal of Dairy Science**, v. 98, p. 3988–3999, 2015.

HOGLUND, C. R. Role of forage in tomorrow's dairy cattle feeding programs1: minimizing cost of forage in tomorrow's dairy ration. **Journal of Dairy Science**, v. 52, p. 1137-1143, 1969.

HOLTSHAUSEN, L.; CHUNG, Y. H.; GERARDO-CUERVO, H.; OBA, M.; BEAUCHEMIN, K. A. Improved milk production efficiency in early lactation dairy cattle with dietary addition of a developmental fibrolytic enzyme additive. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 899-907, 2011.

HRISTOV, A. N.; McALLISTER, T. A.; CHENG, K. J. Intraruminal supplementation with increasing levels of exogenous polysaccharide-degrading enzymes: effects on nutrient digestion in cattle fed barley grain diets. **Journal of Animal Science**, v. 78, p. 477-487, 2000.

HRISTOV, A. N. Comparative characterization of reticular and duodenal digesta and possibilities to estimate microbial outflow from the rumen based on reticular sampling in dairy cows. **Journal of Animal Science**, v. 85, p. 2606-2613, 2007.

HRISTOV, A. N.; RODE, L. M. ; BEAUCHEMIN, K. A.; WUERFEL, R. L. Effect of a commercial enzyme preparation on barley silage in vitro and in sacco dry matter degradability. In: WESTERN SECTION MEETING, AMERICAN SOCIETY OF ANIMAL SCIENCE, 1996, New Mexico. **Proceedings...**New Mexico: University of New Mexico, 1996. p. 282–284.

HU, J.; ARANTES, V.; SADDLER, J. The enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates by the addition of accessory enzymes such as xylanase: is it an additive or synergistic effect? **Biotechnology Biofuels**, v. 4, p. 1-13, 2011.

HUHTANEN, P.; AHVENJÄRVI, S.; WEISBJERG M. R.; NORGAARD P. Digestion and passage of fibre in ruminants. In: SJERSEN K.; HVELPLUND T.; NIELSEN M. O. (Ed.). **Ruminant physiology, digestion, metabolism and impact of nutrition on gene expression, immunology and stress**. Netherlands: Wageningen Academic Publishers, 2006. p. 87–135.

HUMBERSTONE, F. J.; BRIGGS, D. E. Extraction and assay of acetic acid esterase from Malted Barley. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 106, n. 1, p. 31-38, 2000.

JOVANOVIC, I.; MAGNUSON, J. K.; COLLART, F.; ROBBERTSE, B.; ADNEY, W. S.; HIMMEL, M. E.; BAKER, S. E. Fungal glycoside hydrolases for saccharification of lignocellulose: outlook for new discoveries fueled by genomics and functional studies. **Cellulose**, v. 16, p. 687–697, 2009.

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

JUNG, H. J. G.; DEETZ, D. A. Cell wall lignification and degradability. In: JUNG, H. G.; D. R. BUXTON, D. R.; HATFIELD, R. D.; RALPH, J. (Ed.). **Forage cell wall structure and digestibility**. Madison, WI: American Society of Agronomy, Crop Science Society American and Soil Science Society American, 1993. p. 315.

JUNG, H. J. G.; VOGEL, K. P. Influence of lignin on digestibility of forage cell wall material. **Journal of Animal Science**, v. 62, p. 1703-1712, 1986.

JUNG, H. J. G.; RAETH-KNIGHT, M.; LINN, J. G. Forage fiber digestibility: Measurement, variability, and impact. In: MINNESOTA NUTRITION CONFERENCE, 65., 2004, St. Paul. **Proceedings...** Minneapolis: University of Minnesota, 2004. p. 105–125.

JUNG, H. J. G. Forage lignins and their effects on fiber digestibility. **Agronomy Journal**, v. 81, p. 33-38, 1989.

JUNG, H. J. G. Analysis of Forage Fiber and Cell Walls in Ruminant Nutrition. **Journal of Nutrition**, v. 127, p. 810S–813S, 1997.

KAMSTRA, L. D.; MOXON, A. L.; BENTLEY, O. G. The effect of stage of maturity and lignification on the digestion of cellulose in forage plants by rumen microorganisms in vitro. **Journal of Animal Science**, v. 17, p. 199-208, 1958.

KENWARD, M. G.; ROGER J. H. Small Sample Inference for Fixed Effects from Restricted Maximum Likelihood. **Biometrics**, v. 53, n. 3, p. 983–997, 1997.

KHALILI, H.; HUHTANEN, P. Sucrose supplements in cattle given grass silage-based diet. 1. Digestion of organic matter and nitrogen. **Animal Feed Science and Technology**, v. 33, p. 247–261, 1991.

KINGSTON-SMITH, A. H.; MARSHALL, A. H.; MOORBY, J. M. Breeding for genetic improvement of forage plants in relation to increasing animal production with reduced environmental footprint. **Animal**, v. 7, n. 1, p. 79–88, 2013.

KIM, H. S.; AHN, B. S.; CHUNG, S. G.; MOON, Y. H.; HA, J. K.; SEO, I. J.; AHN, B. H.; LEE, S. S. Effect of yeast culture, fungal fermentation extract and non-ionic surfactant on performance of Holstein cows during transition period. **Animal Feed Science and Technology**, v. 126, p. 23–29, 2006.

KNOWLTON, K. F.; MCKINNEY, J. M.; COBB, C. Effect of a direct-fed fibrolytic enzyme formulation on nutrient intake, partitioning, and excretion in early and late lactation Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 3328–3335, 2002.

KONONOFF, P. J.; HEINRICHS, A. J. BUCKMASTER, D. R. Modification of the Penn State Particle Separator and the effects of moisture content on its measurements. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 1858–1863, 2003.

KOSLOZKY, G. **Bioquímica de ruminantes**. 2. ed. Santa Maria: Ed. UFSM, 2009. p. 216.

KRAUSE, D. O.; DENMAN, S. E.; MACKIE, R. I.; MORRISON, M.; RAE, A. L.; ATTWOOD, G. T.; MCSWEENEY, C. S. Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology, and genomics. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, p. 663–693, 2003.

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

KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 23, p. 411–456, 1999.

KUNG, JR., L.; COHEN, M. A.; RODE, L. M.; TREACHER, R. J. The effect of fibrolytic enzymes desprayed onto forages and fed in a total mixed ratio to lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 2396–2402, 2002.

KUNG, L.; TREACHER, R. J.; NAUMAN, G. A.; SMAGALA, A. M.; ENDRES, K. M.; COHEN, M. A. The effect of treating forages with fibrolytic enzymes on its nutritive value and lactating performance of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 115-122, 2000.

KUOPPALA, K.; RINNE, M.; AHVENJÄRVI, S.; NOUSIAINEN, J.; HUHTANEN, P. The effect of harvesting strategy of grass silage on digestion and nutrient supply in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 3253–3263, 2010.

LAM, T. B. T.; IIYAMA, K.; STONE, B. A. Changes in phenolic acids from internode walls of wheat and phalaris during maturation. **Phytochemistry**, v. 31, n. 8, p. 2655-2658, 1992.

LATHAM, M. J. Adhesion of rumen bacteria to plant cell walls. In: BERKELEY, R. C. W.; LYNCH, J. M.; MELLING, J.; RUTTER, P. R.; VINCENT, B. (Ed.). **Microbial adhesion to surfaces**. Chichester, West Sussex, England: Ellis Harwood Ltd., 1980. p. 339–350.

LEHNINGER, A. L. **Princípios de bioquímica**. 4. ed. In: NELSON, D. L.; MICHAEL M.; COX, M. M. (Rev.). São Paulo: Sarvier, 2007. 1100 p.

LEONARDI, C.; ARMENTANO, L. E. Effect of quantity, quality and particle length of alfalfa hay on selective consumption by dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 557-564, 2003.

LEONARDI, C.; SHINNERS, K. J.; ARMENTANO, L. E. Effect of different dietary geometric mean particle length and particle size distribution of oat silage on feeding behavior and productive performance of dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 698-710, 2005.

LEVY, I.; SHOSEYOV, O. Cellulose-binding domains: Industrial and biotechnological application. **Biotechnology Advances**. v. 20, n. 3-4, p. 191-213, 2002.

LEWIS, G. E.; SANCHEZ, W. K.; HUNT, C. W.; GUY, M. A.; PRITCHARD, G. T.; SWANSON, B. I.; TREACHER, R. J. Effect of Direct-Fed Fibrolytic Enzymes on the Lactational Performance of Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 611-617, 1999.

LIANG, C.; XUE, Y.; FIORONI, M.; RODRÍGUEZ-ROPERO, F.; ZHOU, C.; SCHWANENBERG, U.; MA, Y. Cloning and characterization of a thermostable and halo-tolerant endoglucanase from *Thermoanaerobacter tengcongensis* MB4. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 89, p. 315-326, 2011.

LIU, L.; SHANG-GUAN, K.; ZHANG, B.; LIU, X.; YAN, M.; ZHANG, L.; SHI, Y.; ZHANG, M.; QIAN, Q.; LI, J.; ZHOU, Y. Brittle Culm1, a COBRA-like protein, functions in cellulose assembly through binding cellulose micro-fibrils. **PLoS Genetics** 9, p. e1003704, 2013.

IYAMA, K., LAM, T. B. T.; MEILKE, P. J.; RHODES, D. I.; STONE, B. A. 1993. Cell Wall biosynthesis and its regulation. In: JUNG, H. G.; BUXTON, D. R.; HATFIELD, R. D.; RALPH, J. (Ed.). **Forage cell wall structure and digestibility**. Madison, WI: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of American, 1993. p. 621.

LLEWELLYN, D. A.; MARSTON, T. T.; TEUTEMACHER, K. L.; HIGGINS, J. J.; MELGAREJO, T. Evaluation of Low Molecular Weight Fractions and Crude Enzyme Preparation from a *Trichoderma* Cellulose Complex as a Treatment for Fibrous Feeds. **Animal Feed Science Technology**, v. 160, p. 39-48, 2010.

LUND, P. **The effect of forage type on passage kinetics and digestibility of fibre in dairy cows**. 2002. Thesis (Doctor of Philosophy) - The Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen, Denmark, 2002.

LYNCH, J. P.; O'KIELY, P.; MURPHY, R.; DOYLE, E. M. Changes in chemical composition and digestibility of three maize stover components digested by white-rot fungi. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 98, n. 4, p. 731–738, 2013.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002.

MARTINS, A. S.; VIEIRA, P. F.; BERCHIELLI, T. T.; PRADO, I. N.; LEMPP, B.; PAULA, M. C. Degradabilidade in situ e observações microscópicas de volumosos em bovinos suplementados com enzimas fibrolíticas exógenas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 1927-1936, 2007.

MARTINS, A. S.; VIEIRA, P. F.; BERCHIELLI, T. T.; PRADO, I. N.; MOLETTA, J. L. Consumo e digestibilidade aparente total em bovinos sob suplementação com enzimas fibrolíticas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, p. 2118-2124, 2006.

MCALLISTER, T. A.; BAE, H. D.; JONES, G. A.; CHENG, K. J. Microbial attachment and feed digestion in the rumen. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 3004-3018, 1994.

MCALLISTER, T. A.; OOSTING, S. J. Effect of exogenous enzymes on digestibility of barley silage and growth performance of feedlot cattle. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 79, n. 3, p. 353-360, 1999.

MEALE, S. J.; BEAUCHEMIN, K. A.; HRISTOV, A. N.; CHAVES, A. V.,
MCALLISTER, T. A. Board-invited review: Opportunities and challenges in using exogenous enzymes to improve ruminant production. **Journal of Animal Science**, v. 92, p. 427-442, 2014.

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

MERTENS, D. R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fibre in feeds with refluxing beakers or crucibles: collaborative study. **Journal of Association Official Analytical Chemistry International**, v. 85, p. 1217-1240, 2002.

MERTENS, D. R.; P. HUHTANEN, P. Grass forages: dynamics of digestion in the rumen. In: NEW YORK STATE RUMINANT HEALTH-NUTRITION CONFERENCE, 2007, Syracuse. **Proceedings...** Syracuse, 2007. 20 p.

MEYER, J. H.; LOGFGREEN, J. P. The comparative energy requirements of sheep and cattle for maintenance and gain. **Journal of Animal Science**, v. 18, n. 2, p. 528-547, 1959.

MIRON, J. The hydrolysis of lucerne cell-wall monosaccharide components by monocultures or pair combinations of defined ruminal bacteria. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 70, p. 245-252, 1991.

MOHNEN, D.; BAR-PELED, M.; SOMERVILLE, C. Biosynthesis of plant cell walls. In: BLACKWELL, H. M. (Ed.). **Biomass recalcitrance**. Oxford: Publishing, 2008. chap. 5, p. 94-187.

MORGAVI, D. P.; BEAUCHEMIN, K. A.; NSEREKO, V. L.; RODE, L. M.;
IWAASA, A. D.; YANG, W. Z.; MCALLISTER, T. A.; WANG, Y. Synergy between ruminal fibrolytic enzymes and enzymes from *Trichoderma longibrachiatum*. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 1310-1321, 2000a.

MORGAVI, D. P.; BEAUCHEMIN, K. A.; NSEREKO, V. L.; RODE, L. M.; MCALLISTER, T. A.; IWAASA, A. D.; WANG, Y.; YANG, W. Z. Resistance of feed enzymes to proteolytic inactivation by rumen microorganisms and gastrointestinal proteases. **Journal of Animal Science**, v. 79, p. 1621–1630, 2001.

MORRISON, I. M. The effect of physical and chemical treatments on the degradation of wheat and barley straws by tureen liquor-pepsin and pepsin-cellulose systems. **Journal of Science Food and Agriculture**, v. 34, p. 1323-1329, 1983.

NAKASHIMA, Y.; ORSKOV, E. R.; HOTTEN, P. M.; AMBO, K.; TAKASE, Y. Rumen degradation of straw. 6. Effect of polysaccharidase enzymes on degradation characteristics of rice straw. **Animal Production**, v. 47, p. 421–427, 1988.

NASCIMENTO JR., D. Comentários sobre métodos químicos para avaliação de forragens. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 3, p. 233-244, 1974.

NIEVES, R. A.; EHRMAN, C. I.; ADNEY, W. S.; ELANDER, R. T.; HIMMEL, M. E. Technical Communication: Survey and analysis of commercial cellulase preparations suitable for biomass conversion to ethanol. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 14, p. 301-304, 1998.

NOCEK, J. E. In situ and other methods to estimate ruminal protein and energy digestibility. A review. **Journal of Dairy Science**, v. 71, p. 2051-2069, 1988.

NOCEK, J. E. Bovine acidosis: Implications on laminitis. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 1005-1028, 1997.

NRC. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7th rev. ed. Washington, DC: Natl. Acad. Sci., 2001. 381 p.

NSEREKO, V. L.; BEAUCHEMIN, K. A.; MORGAVI, D. P.; RODE, L. M.; FURTADO, A. F. ; MCALLISTER, T. A.; IWAASA, D.; YANG, W. Z.; WANG, Y. Effect of a fibrolytic enzyme preparation from *Trichoderma longibrachiatum* on the rumen microbial population of dairy cows. **Canadian Journal of Microbiolog**, v. 48, p. 14–20, 2002.

NUSSIO, L. G.; CAMPOS, F. P.; LIMA, M. L. M. Metabolismo de Carboidratos Estruturais. In: BERCHIELI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. (Ed.). **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal: Funep, 2011. p. 193- 238.

OBA, M.; ALLEN, M. S. Evaluation of the importance of the digestibility of neutral detergent fiber from forage: effects on dry matter intake and milk yield of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 589-596, 1999.

OBA, M.; ALLEN, M. S. Effects of brown midrib 3 mutation in corn silage on productivity of dairy cows fed two concentrations of dietary neutral detergent fiber: 1. feeding behavior and nutrient utilization. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 1333-1341, 2000.

OBA, M.; ALLEN, M. S. Effects of corn grain conservation method on ruminal digestion kinetics for lactating dairy cows at two dietary starch concentrations. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 184-194, 2003.

ODDOYE, E. A.; MARGEN, S. Nitrogen balance studies in humans: long-term effect of high nitrogen intake on nitrogen accretion. **Journal of Nutrition**, v. 109, p. 363-377, 1979.

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

OLIVEIRA, A. S.; DETMANN, E.; CAMPOS, J. M. S.; PINA, D. S.; SOUZA, S. M.; COSTA, M. G. Meta-análise do impacto da fibra em detergente neutro sobre o consumo, a digestibilidade e o desempenho de vacas leiteiras em lactação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 7, p. 1587-1595, 2011.

PALOHEIMO, M.; PIIRONEN, J.; VEHMAANPERÄ. Xylanases and cellulases as feed additives. In: BEDFORD, M. R.; PARTRIDGE, G. G. (Ed.). **Enzymes in farm animal nutrition**. 2nd ed. London, UK, CAB International, 2011, p. 12-53.

PETERS, A.; LEBZIEN, P.; MEYER, U.; BORCHERT, U.; BULANG, M.; FLACHOWSKY, G. Effect of exogenous fibrolytic enzymes on ruminal fermentation and nutrient digestion in dairy cows. **Archives of Animal Nutrition**, v. 64, p. 221-237, 2010.

PINOS-RODRIGUEZ, J. M.; GONZÁLEZ, S. S.; MENDOZA, G. D.; BÁRCENA, R.; COBOS, M. A.; HERNÁNDEZ, A.; ORTEGA, M. E. Effects of exogenous fibrolytic

enzyme on ruminal fermentation and digestibility of alfalfa and rye-grass hay fed to lambs. **Journal of Animal Science**, v. 80, p. 3016–3020, 2002.

PLAIZIER, J. C.; KEUNEN, J.; WALTON, J. P.; DUFFIELD, T.; MCBRIDE, B. W. Effect of subacute ruminal acidosis on in situ digestion of mixed hay in lactating dairy cows. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 81, p. 421–423, 2001.

POUTANEN, K. An α -L-arabinofuranosidase of *Trichoderma reesei*. **Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 4, p. 271–281, 1988.

QUEIROZ, O. C. M.; ADESOGAN, A. T.; DANIEL, J. L. P.; ROMERO, J. J.; SHIN, J. H.; STAPLES, C. R.; SANTOS, J. E. P. Effects of adding fibrolytic enzymes to diets containing bermudagrass silage harvested at two maturity stages on the performance of lactating Holstein cattle. **Journal of Animal Science**, v. 89, p. 378, 2011. Supplement, 1. Trabalho apresentado no American Dairy Science Association & American Society of Animal Science Joint Annual Meeting. **Proceedings...**New Orleans, Louisiana, USA.

RALPH J.; HELM R. F. Lignin/hydroxycinnamic acid/polysaccharide complexes: Synthetic models for regiochemical characterization. In: JUNG, H. G.; BUXTON, D.R.; HATFIELD, R. D.; RALPH J. (Ed.). **Forage cell wall structure and digestibility**. Madison, WI: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of American, 1993. p. 201–246.

RAMOS, L. P. The chemistry involved in the pretreatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**, v. 26, p. 863–871, 2003.

RAYBURN, E. B.; FOX, D. G. Variation in neutral detergent fiber intake of holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 2, p. 544–554, 1993.

REBHUN, W. C. **Diseases of dairy cattle**. In: THOMA, J.; DIVERS, E.; SIMON, F. P. (Ed.). 8th ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2008. chap. 1, p. 14.

REDDISH, M. A.; KUNG JR., L. The effect of feeding a dry enzyme mixture with fibrolytic activity on the performance of lactating cows and digestibility of a diet for sheep. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 4724–4729, 2007.

REEVES, J. B. Lignin and fiber composition changes in forages over a growing season and their effects on in vitro digestibility. **Journal of Dairy Science**, v. 70, p. 1583–1594, 1987.

REEVES, J. B. Chemical Studies on the Composition of Fiber Fractions and Lignin Determination Residues. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 120-128, 1993.

RENNÓ, L. N.; VALADARES, R. F. D; LEÃO, M. I.; VALADARES FILHO, S. C.; SILVA, J. F. C.; CECON, P. R.; DIAS, H. L. C.; COSTA, M. A. L.; OLIVEIRA, R. V. Estimativa da produção de proteína microbiana pelos derivados de purinas na urina em novilhos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 4, p. 1223-1234, 2000

RINCON, M. T.; CEPELJNIK, T.; MARTIN, J. C.; BARAK, R. L. Y.; BAYER, E. A.; FLINT, H. J. Unconventional mode of attachment of the *Ruminococcus flavefaciens* cellulosome to the cell surface. **Journal of Bacteriology**, v. 187, p. 7569-7578, 2005.

ROBERTSON, J. B.; VAN SOEST, P. J. The detergent system of analysis. In: JAMES, W. P. T.; THEANDER, O. (Ed.). **The analysis of dietary fibre in food**. New York: Marcel Dekker, 1981. chap. 9, p. 123–158.

RODE, L. M.; YANG, W. Z.; BEAUCHEMIN, K. A. Fibrolytic enzyme supplements for dairy cows in early lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 2121–2126, 1999.

ROMERO, J. J. **Improving the potency and reliability of exogenous fibrolytic enzymes for enhancing forage utilization by dairy cattle**, 2013. 198 f. Thesis (Doctor of Philosophy) - Department of Animal Science, University of Florida, Gainesville, 2013.

ROMERO, J. J.; ZARATE, M. A.; ADESOGAN, A. T. Effect of the dose of exogenous fibrolytic enzyme preparations on preingestive fiber hydrolysis, ruminal fermentation, and in vitro digestibility of bermudagrass haylage. **Journal of Dairy Science**, v. 98, p. 406–417, 2015a.

ROMERO, J. J.; MA, Z. X.; GONZALEZ, C. F.; ADESOGAN, A. T. Effect of adding cofactors to exogenous fibrolytic enzymes on preingestive hydrolysis, in vitro digestibility, and fermentation of bermudagrass haylage. **Journal of Dairy Science**, v. 98, p. 4659–4672, 2015b.

ROZANOV, A. S.; SUSHENTSEVA, N. N.; MALUP, T. K.; GORYACHKOVSKAYA, T. N.; DEMIDOVA, E. V.; MESHCHERIAKOVA, I. A.; DEMIDOV, E. A.; PELTEK, S. E. Analysis of enzymes of the hemicellulose complex from *Geobacillus stearothermophilus* 22 VKPM B-11678 isolated from Garga hot spring, Russia. **Journal of Molecular Catalysis B: enzymatic**, v. 116, p. 159-165, 2015.

RUSSELL, J. B.; WILSON, D. B. Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH? **Journal of Dairy Science**, v.79, p.1503–1509, 1996.

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Indian Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 279-291, 2003.

SAMIR, M. A. S. A.; ALLOIN, F.; DUFRESNE, A. Review of recent research into cellulosic whiskers, their properties and their application in nanocomposite field. **Biomacromolecules**, v. 6, p. 612-626, 2005.

SCHINGOETHE, D. J.; STEGEMAN G. A.; TREACHER, R. J. Response of lactating dairy cows to a cellulase and xylanase enzyme mixture applied to forages at the time of feeding. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 996-1003, 1999.

SEWALT, V. J. H.; GLASSER, W. G.; BEAUCHEMIN, K. A. Lignin impact on fiber degradation. 3. Reversal of inhibition of enzymatic hydrolysis by chemical modification of lignin and by additives. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 45, p. 1823–1828, 1997.

SHALLOM, D.; SHOHAM, Y. Microbial hemicellulases. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 219-228, 2003.

SHEKHAR, C.; THAKUR, S. S.; SHELKE, S. K. Effect of exogenous fibrolytic enzymes supplementation on milk production and nutrient utilization in Murrah buffaloes. **Tropical Animal Health and Production**, v. 42, p. 1465–1470, 2010.

SILVA, D. J.; D'ALMEIDA, M. L. O. Nanocristais de celulose. **O Papel**, v. 70, n. 7, p. 34-52, 2009.

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

SILVA, A. T.; WALLACE, R. J.; ØRSKOV, E. R. Use of particle bound microbial enzyme activity to predict the rate and extent of fibre degradation in the rumen. **British Journal of Nutrition**, v. 57, p. 407–415, 1987.

SKLAN, D.; ASHKENAZI, R.; BRUN, A.; DEVORIN, A.; TABORI, K. Fatty acids, calcium soaps of fatty acids, and cottonseeds fed to high yielding cows, **Journal of Dairy Science**, v. 75, p. 2463-2472, 1992.

SMITH, L. W.; GOERING, H. K.; GORDON, C. H. Relationships of forage composition with rates of cell wall digestion and indigestibility of cell walls. **Journal of Dairy Science**, v. 55, p. 1140–1147, 1972.

SPANGHERO, M.; KOWALSKI, Z. M. Critical analysis of N balance experiments with lactating cows. **Livestock Production Science**, v. 52, p. 113-122, 1997.

SULLIVAN, J. T. Studies of the hemicelluloses of forage plants. **Journal of Animal Science**, v. 25, p. 83-86, 1966.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 3. ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2002.

TERASHIMA, N.; FUKUSHIMA, K.; HE, L. F.; TAKABE, K. Comprehensive model of the lignified plant cell wall. In: JUNG, H. G.; BUXTON, D. R.; HATFIELD, R. D.; RALPH, J. (Ed.). **Forage cell wall structure and digestibility**. Madison, WI: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, 1993. p. 247.

TERRY, R. A.; TILLEY, J. M. A. The indigestibility of the leaves and stems of perennial ryegrass, cocksfoot, timothy, tall fescue, lucerne and sainfoin as measured by in vitro procedure. **Journal British Grassland Society**, v. 19, p. 362-372, 1964.

TREACHER, R.; MCALLISTER, T. A.; POPP, J. D.; MIR, Z.; MIR, P.; CHENG, K. J. Effects of exogenous cellulases and xylanases on feed utilization and growth performance of feedlot steers. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 77, p. 541, 1997.

TU, Y.; ROCHFORD, S.; LIU, Z.; RAN, Y.; GRIFFITH, M.; BADENHORST, P.; LOUIE, G. V.; BOWMAN, M. E.; SMITH, K. F.; NOEL, J. P.; MOURADOV, A.; SPANGENBERG, G. Functional analyses of caffeic acid *o*-methyltransferase and cinnamoyl-coa-reductase genes from perennial ryegrass (*Lolium perenne*). **The Plant Cell**, v. 22, p. 3357–3373, 2010.

TURNER, S. R.; SOMERVILLE, C. R. Collapsed xylem phenotype of arabidopsis identifies mutants deficient in cellulose deposition in the secondary cell wall. **The Plant Cell**, v. 9, p. 689-701, 1997.

UNITED NATIONS. Department of Economic and Social Affairs, Population Division. **World population prospects: the 2012 revision, key findings and advance tables**. Working Paper no. ESA/P/WP.227. 2013. Disponível em:

<http://esa.un.org/unpd/wpp/Documentation/pdf/WPP2012_%20KEY%20FINDINGS.pdf>. Acesso em: 20 Jun. 2015.

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

VALADARES FILHO, S. C.; MACHADO, P. A. S.; CHIZZOTTI, M. L.; AMARAL, H. F.; MAGALHÃES, K. A.; RCHA JÚNIOR, V. R.; CAPELLE, E. R. **Tabelas brasileiras de composição de alimentos para bovinos**. CQBAL 3.0. Disponível em: <www.ufv.br/cqbal>. Acesso em: 10 dez. 2015.

VAN SOEST, P. J. Development of a comprehensive system of feed analyses and its application to forages. **Journal of Animal Science**, v. 26, p. 119-128, 1967.

VAN SOEST, P. J. Collaborative study of acid-detergent fiber and lignin. **Journal of Association Official Analytical Chemistry**, v. 56, p. 781, 1973.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2nd ed. Ithaca, NY.: Comstock Publ. Assoc., 1994.

VAN SOEST, P. J.; MASON, V. C. The influence of Maillard reaction upon the nutritive value of fibrous feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 32, n. 1, p. 45-53, 1991.

VAN SOEST, P. J.; MERTENS, D. R.; DEINUM B. Preharvest factors influencing quality of conserved forages. **Journal of Animal Science**, v. 47, p. 712-720, 1978.

VAN SOEST, P. J.; WINE, R. H. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV. Determination of plant cell-wall constituents. **Journal of Association Official Analytical Chemistry**, v. 50, p. 50-55, 1967.

VARGA, G. A.; KOLVER, E. S. Microbial and animal limitations to fiber digestion and utilization. **Journal of Nutrition**, v. 127, p. 819-823, 1997.

VERBIC, J.; CHEN, X. B.; MACLEOD, N. A.; ORSKOV, E. R. Excretion of purine derivatives by ruminants. Effect of microbial nucleic acid infusion on purine derivative excretion by steers. **Journal of Agricultural Science**, v. 114, p. 243-248, 1990.

VICINI, J. L.; BATEMAN, H. G.; BHAT, M. K.; CLARK, J. H.; ERDMAN, R. A.; PHIPPS, R. H.; VAN AMBURGH, M. E.; HARTNELL, G. F.; HINTZ, R. L.; HARD, D. L. Effect of feeding supplemental fibrolytic enzymes or soluble sugars with malic acid on milk production. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 576-585, 2003.

WALLACE, R. J.; WALLACE, S. J. A.; MCKAIN, N.; NSEREKO, V. L.; HARTNELL, G. F. Influence of supplementary fibrolytic enzymes on the fermentation of corn and grass silages by mixed ruminal microorganisms in vitro. **Journal of Animal Science**, v. 79, p. 1905-1916, 2001.

WANG, Y.; MCALLISTER, T. A.; RODE, L. M.; BEAUCHEMIN, K. A.; MORGAVI, D. P.; NSEREKO, V. L.; IWAASA, A. D.; YANG, W. Effects of an exogenous enzyme preparation on microbial protein synthesis, enzyme activity and attachment to feed in the Rumen Simulation Technique (Rusitec). **British Journal of Nutrition**, v. 85, p. 325-332, 2001.

WEIMER, P. J.; WAGHORN, G. C.; ODT, C. L.; MERTENS, D. R. Effect of diet on populations of three species of ruminal cellulolytic bacteria in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 122-134, 1999.

WEISS, W. P. Energy prediction equations for ruminant feeds. In: CORNELL NUTRITION CONFERENCE FOR FEED MANUFACTURERS, 61., 1999, Ithaca. **Proceedings...** Ithaca: Cornell University, 1999. p. 176-185.

WEISS, W. P. Predicting energy values of feeds. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 1802-1811, 1993.

WILDMAN, O. E. E.; JONES, G. M.; WAGNER, P. E. A dairy cow body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. **Journal of Dairy Science**, v. 65, n. 3, p. 495-501, 1982.

WILMAN, D.; ALTIMIMI, A. K. The *in-vitro* digestibility and chemical composition of plant parts in white clover, red clover and lucerne during primary growth. **Journal of Science Food and Agriculture**, v. 35, p. 133, 1984.

WILSON, J. R. Organization of forage plant tissues. In: JUNG, H. (Ed.). **Forage cell wall structure and digestibility**. Madison, WI: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, 1993. p. 1-32.

WILSON, D. B. Three microbial strategies for plant cell wall degradation. **Annales of the New York Academy of Sciences**, v. 1125, p. 289–297, 2008.

WIRYAWAN, K. G.; BROOKER, B. E. Probiotic control of lactate accumulation in acutely grain-fed sheep. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 46, p. 1555–1568, 1995.

WOOD, T. M.; MCCRAE, S. I. The cellulase of *Penicillium pinophilum*: synergism between enzyme components in solubilizing cellulose with special reference to the involvement of two immunologically distinct CBHs. **Carbohydrate Research**, v. 234, p. 93-99, 1986.

WOODFORD, J. A.; JORGENSEN, N. A.; BARRINGTON, G. P. Impact of dietary fiber and physical form on performance of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 69, p. 1035-1047, 1986.

YANG, W. Z.; BEAUCHEMIN, K. A. Altering physically effective fiber intake through forage proportion and particle length: Digestion and milk production. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 3410-3421, 2007.

YANG, W. Z.; BEAUCHEMIN, K. A.; RODE, L. M. Effects of an enzyme feed additive on extent of digestion and milk production of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 391-403, 1999.

YANG, W. Z.; BEAUCHEMIN, K. A.; RODE, L. M. A comparison of methods of adding fibrolytic enzymes to lactating cow diets. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 2512-2520, 2000.

ZEBELI, Q.; ASCHENBACH, J. R.; TAJAJ, M.; BOGUHN, J.; AMETAJ, B. N.; DROCHNER, W. Invited review: Role of physically effective fiber and estimation of dietary fiber adequacy in high-producing dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 3, p. 1041-1056, 2012.

ZHENG, W.; SCHINGOETHE, D. J.; STEGEMAN, G. A.; HIPPEL, A. R.; TREACHER, R. J. Determination of when during the lactation cycle to start feeding a cellulase and xylanase enzyme mixture to dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 2319-2325, 2000.

ZINN, R. A.; SALINAS, J. Influence of fibrozyme on digestive function and growth performance of feedlot steers fed a 78% concentrate growing diet. In: ALLTECH'S

FIFTEENTH ANNUAL SYMPOSIUM, 1999. Loughborough, UK.

Proceedings...Loughborough, UK: Nottingham University Press, 1999. p. 313-319.