UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CASSIELE APARECIDA DE OLIVEIRA

Efeito da inclusão de doses de *Saccharomyces cerevisiae* sobre a digestibilidade da fibra e metabolismo ruminal de bovinos Nelore recebendo dietas com ou sem suplementação energética

Pirassununga

2017

CASSIELE APARECIDA DE OLIVEIRA

Efeito da inclusão de doses de *Saccharomyces cerevisiae* sobre a digestibilidade da fibra e metabolismo ruminal de bovinos Nelore recebendo dietas com ou sem suplementação energética

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 a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Nutrição e Produção Animal

Área de concentração:

Nutrição e Produção Animal

Orientador:

Prof. Dr. Luis Felipe Prada e Silva

De acordo:

Orientador

Pirassununga

2017

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.3545
FMVZ

Oliveira, Cassiele Aparecida de

Efeito da inclusão de doses de *Saccharomyces cerevisiae* sobre a digestibilidade da fibra e metabolismo ruminal de bovinos Nelore recebendo dietas com ou sem suplementação energética. / Cassiele Aparecida de Oliveira. -- 2017. 73 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga, 2017.

Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal.

Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Luis Felipe Prada e Silva.

1. Leveduras. 2. Cinética ruminal. 3. Digestibilidade de fibras. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito da suplementação com diferentes doses de *Saccharomyces cerevisiae*, sobre a digestibilidade da fibra e metabolismo ruminal em bovinos Nelore recebendo dois níveis de concentrado.", protocolada sob o CEUA nº 7162181016, sob a responsabilidade de **Luís Felipe Prada E Silva** e equipe; *Cassiele Aparecida de Oliveira* - 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 - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.099 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 27/10/2016.

We certify that the proposal "Effect of supplementing with different doses probiotics on fiber digestibility and rumen ecosystem of growing cattle receiving two levels of concentrate.", utilizing 36 Bovines (males and females), protocol number CEUA 7162181016, under the responsibility of **Luís Felipe Prada E Silva** and team; *Cassiele Aparecida de Oliveira* - 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 - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6099 of July 15, 2009, as well as 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 (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 10/27/2016.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de 04/2016 a 08/2016

Área: **Nutrição E Produção Animal**

Origem: **Animais provenientes de outros projetos**

Espécie: **Bovinos**

Sexo: **Machos e Fêmeas**

Idade: **24 a 30 meses**

N: **36**

Linhagem: **Nelore**

Peso: **350 a 450 kg**

Resumo: A menor digestibilidade da fibra nas pastagens tropicais, é o principal obstáculo para aumentar o desempenho animal nesses sistemas. A utilização de suplementos concentrados para animais em pastejo no período das águas, supri as deficiências de qualidade das forragens, otimizando o ganho de peso animal. Leveduras do gênero *Saccharomyces cerevisiae*, vem sendo utilizadas na alimentação de ruminantes, e podem causar efeitos benéficos no trato digestório deste animais, como o aumento na digestibilidade da fibra. O objetivo do estudo é avaliar o efeito da suplementação com diferentes doses de *S. cerevisiae*, sobre a digestibilidade da fibra, consumo de matéria seca, rúmica e ambiente ruminal de bovinos Nelore alimentados com feno, recebendo ou não suplementação energética, através dos seguintes parâmetros: 1) Consumo de matéria seca; 2) parâmetros de fermentação ruminal; e 3) quantificação de microrganismo ruminais. Serão utilizados 36 animais fistulados no rúmen, com aproximadamente 24 meses de idade e 400 kg, mantidos em baias individuais, onde receberão doses diárias das leveduras avaliadas. O delineamento experimental será em blocos casualizados, com seis repetições por tratamento, em arranjo fatorial 3x2 (Controle, suplementados com *S. cerevisiae* dose I e o grupo suplementado com *S. cerevisiae* dose V e grupos com ou sem suplementação energética). Líquido ruminal será coletado para mensuração de pH, AGCC e amônia. Para a determinação do volume, massa total e tamanho do compartimento ruminal, será feito esvaziamento total do conteúdo ruminal. Amostras das fases líquida e sólida serão retiradas para as análises bromatológicas para determinação dos componentes da digesta e população de microrganismos ruminais através da técnica de PCR em tempo real. A realização deste estudo permitirá a identificação e avaliação dos efeitos das diferentes doses de *S. cerevisiae* no metabolismo ruminal e digestibilidade de fibras, permitindo melhor entendimento dos mecanismos de ação destas leveduras na alimentação de bovinos de corte em pastejo, em diferentes níveis de suplementação.

Local da experimentação: **Laboratório de Pesquisa em Gado de Corte**

São Paulo, 19 de junho de 2017

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: OLIVEIRA, Cassiele Aparecida de

Título: Efeito da inclusão de doses de *Saccharomyces cerevisiae* sobre a digestibilidade da fibra e metabolismo ruminal de bovinos Nelore recebendo dietas com ou sem suplementação energética

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 minha mãe Regina, por todo amor, dedicação, esforços e suporte incondicional em toda a minha vida. Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela minha vida, por eu ter saúde, paciência e persistência para seguir em frente nas novas etapas e novos desafios de minha vida.

À minha Mãe Regina, por todo apoio, esforço, dedicação e amor incondicional, dedicados a mim durante toda a vida, a meu irmão Darlan, pelo carinho e atenção durante todo o tempo.

Agradeço meus avós maternos Júlia e Henrique (*in memoriam*), por terem sido exemplos de determinação e persistência.

Meu orientador Prof^o Dr. Luís Felipe Prada e Silva, pela oportunidade de trabalho, pela confiança depositada durante todo o mestrado.

Agradeço aos membros da banca, por toda a contribuição, considerações e por todo o aprendizado adquirido durante todo o tempo convivido, tudo que foi aprendido sempre será de grande importância durante toda a minha vida.

Agradeço a toda equipe do Laboratório de Pesquisa em Gado de Corte, os pós-graduandos João Penso, Johnny, Juliana, Nara e Rafael, especialmente o Dannylo e a Viviane, por todas as orientações, ensinamentos, conversas, auxílios nos momentos em que sempre precisei, serei sempre muito grata. Aos alunos de iniciação científica Gabriel, Laís e Walter, que sempre estiveram dispostos em colaborar, que foram meu suporte sempre. Os funcionários, agradeço em especial Sr. Schmidt e o Sr. Paulo, que foram peças fundamentais durante todo o período que permaneci no laboratório, por toda colaboração e ensinamentos que foram passados, e a Lígia que nunca mediu esforços para contribuir e colaborar sempre, A todos agradeço por todos os ensinamentos, pela paciência, dedicação, convivência e solidariedade durante todo o período de convivência, tudo que foi ensinado foi de grande valia e importância para minha formação.

Agradeço minhas amigas-irmãs Letícia, Gabriela e Carol pela amizade, por todo carinho, atenção e as conversas durante o período de pós-graduação e em todos os momentos de minha vida.

O meu namorado Rafael, por todo amor, dedicação, amizade, cumplicidade, atenção e apoio dedicados a mim, e pela compreensão nos momentos de dificuldades, por sempre estar ao meu lado com todo carinho.

A todos os funcionários e professores do VNP, que foram de extrema importância na minha pós-graduação, onde pude aprender com cada um, pelo menos uma coisa que levarei por toda a vida.

Agradeço as técnicas Renata e Simi, por toda a paciência, colaboração e auxílio prestados sempre que foram solicitadas.

Aos amigos de pós-graduação Alejandro, Bruna Gomes, , Filipe, Hortência, Livia Queiroz, Maria Eduarda, Mariana Rentas, Thiago Nishimura, e os amigos de Pirassununga Ana Reway, Deisi Silva, Dinah, Flávia Castelo, Gabriela Castilho, Giovana Seloti, Leonardo Zanuzzi, Luciana Felicio, Norma e Vanessa da Mata, por toda amizade, companheirismo, abraços, sorrisos, colos, levarei cada um sempre comigo, obrigado sempre por tornarem minha família durante esses anos.

Os amigos de turma da XIII turma, que mesmo cada um estando em um canto, mesmo sem a convivência diária ainda mantivemos a essência que foi criada durante os cinco anos.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) Número de processo 2016 / 01160-0 pela bolsa de estudos.

A Lallemand® por todo apoio financeiro fornecido para o desenvolvimento desta pesquisa.

A Agrocerees Multimix, pela confiança e oportunidade, por todo apoio e compreensão da equipe durante o processo de finalização desta dissertação.

Serei grata a todos sempre.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

RESUMO

OLIVEIRA, C. A. de. **Efeito da inclusão de doses de *Saccharomyces cerevisiae* sobre a digestibilidade da fibra e metabolismo ruminal de bovinos Nelore recebendo dietas com ou sem suplementação energética.** [Effect of the inclusion of *Saccharomyces cerevisiae* doses on fiber digestibility and ruminal metabolism of Nelore cattle receiving diets with or without energetic supplementation]. 2017. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

O objetivo do estudo foi avaliar o efeito da inclusão de doses de *S. cerevisiae* na dieta sobre a digestibilidade da fibra, o consumo de matéria seca, a cinética e o ambiente ruminal de bovinos Nelore alimentados com feno de Tifton-85 (*Cynodon* spp.), recebendo ou não suplementação energética. Foram utilizados 36 novilhos Nelore canulados no rúmen, com aproximadamente 24 meses de idade e 400 kg de peso corporal (PC) ao início do experimento, em delineamento experimental de blocos casualizados, com seis repetições por tratamento. Os tratamentos foram obtidos em arranjo fatorial 3x2, a partir da combinação de três níveis de inclusão de *S. cerevisiae* (0, 8 e 40 x10⁹ UFC/animal/dia; CNCM I-1077, Lallemand®) em duas dietas a base de feno de Tifton-85, com ou sem suplementação energética (0 e 0,8% do PC). Foram realizadas coletas de líquido ruminal para mensuração de pH, ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e N-amoniaco, além de esvaziamento total de conteúdo ruminal para determinação do volume, massa total e tamanho do compartimento ruminal. Amostras das fases líquida e sólida da digesta ruminal foram retiradas para as análises dos componentes da digesta e população de microrganismos ruminantes através da técnica de PCR em tempo real. A inclusão de levedura aumentou linearmente o consumo de matéria seca (P = 0,03) e de FDN (P = 0,01), no entanto não houve efeito sobre o pH ruminal (P = 0,30). A suplementação energética aumentou a concentração ruminal de AGCC totais (P < 0,01). Em relação à digestibilidade *in situ* da FDN, a inclusão de levedura promoveu aumento linear para as quatro forrageiras após 24 h de incubação (P = 0,02). A inclusão também aumentou a massa ruminal de MS (P = 0,02) e FDN (P = 0,02), mas não a de FDN indigestível (P = 0,33). Não houve efeito da levedura sobre a população das bactérias celulolíticas mais abundantes no rúmen (*F. succinogenes*, *R. flavefaciens* e *R. albus*) (P = 0,72). Como conclusão, a inclusão de levedura na dieta de bovinos Nelore aumenta a digestibilidade ruminal da fibra, porém o aumento

da digestibilidade da fibra não pôde ser explicado por mudanças na população de bactérias celulolíticas no rúmen.

Palavras-chave: Leveduras. Cinética ruminal. Digestibilidade de fibras.

ABSTRACT

OLIVEIRA, C. A. de. **Effect of the inclusion of *Saccharomyces cerevisiae* doses on fiber digestibility and ruminal metabolism of Nellore cattle receiving diets with or without energetic supplementation.** [Efeito da inclusão de doses de *Saccharomyces cerevisiae* sobre a digestibilidade da fibra e metabolismo ruminal de bovinos Nelore recebendo dietas com ou sem suplementação energética]. 2017. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

The objective of the study was to evaluate the effect of inclusion of dietary *S. cerevisiae* on fiber digestion, dry matter intake, kinetics and ruminal environment of Nellore cattle fed with Tifton-85 hay (*Cynodon* spp.), receiving or not energetic supplementation. Thirty-six rumen cannulated Nellore steers, approximately 24 months old and 400 kg body weight (BW) were used at the beginning of the experiment, in a randomized complete block design with six replicates per treatment. The treatments were obtained in a 3x2 factorial arrangement, by combining three inclusion levels of *S. cerevisiae* (0, 8 and 40 x10⁹ CFU/animal/day; CNCM I-1077, Lallemand®) in two diets based on Tifton-85 hay, with or without energetic supplementation (0 and 0.8% of BW). Ruminal fluid samples were collected to measure pH, short chain fatty acids (SCFA) and ammonia nitrogen, as well as the rumen evacuation to determine the volume, total mass and size of the rumen compartment. Samples of the solid and liquid phases of the rumen digesta were taken for analysis of the digesta components and population of ruminal microorganisms through the real-time PCR technique. The yeast inclusion linearly increased the dry matter intake ($P = 0.03$) and NDF ($P = 0.01$), however with no effects on rumen pH ($P = 0.30$). Energy supplementation increased the rumen concentration of total SCFA ($P < 0.01$). The yeast inclusion linearly increased *in situ* digestibility of NDF of the four forages after 24 h of incubation ($P = 0.02$). The yeast inclusion also increased the ruminal mass of DM ($P = 0.02$) and NDF ($P = 0.02$), but not the indigestible NDF ($P = 0.33$). There was no yeast effect on a population of the most abundant cellulolytic bacteria in the rumen (*F. succinogenes*, *R. flavefaciens* and *R. albus*) ($P = 0.72$). In conclusion, the inclusion of yeast in the diet of Nelore cattle increases the rumen digestibility of the fiber, however, it could not be explained by changes in the population of cellulolytic bacteria in the rumen.

Key words: Yeasts. Ruminal kinetics. Fiber digestibility.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Contagem de leveduras no fluido ruminal 2 h após a suplementação com leveduras.....	49
Figura 2 - Decomposição da interação do Tempo x Tratamento para: A) Proporção molar de acetato pelo total de AGCC; B) Proporção molar do butirato pelo total de AGCC.....	52
Figura 3 - Decomposição da interação Tempo X Trat para concentração de amônia no rúmen	53
Figura 4 - Abundância relativa de bactérias fibrolíticas no presente estudo. Os valores são expressos em relação à população de <i>B. fibrisolvens</i>	56
Quadro 1 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste projeto1	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição nutricional Feno de Tifton-85 (<i>Cynodon dactylon</i>)	41
Tabela 2 - Composição do suplemento energético	42
Tabela 3 - Consumo de bovinos canulados ingerindo dois níveis de concentrado (0 ou 0,8% do PC) e três níveis de suplementação com leveduras vivas (0,8 ou 40x10 ⁹ UFC/animal/dia)	49
Tabela 4 - Crescimento e eficiência alimentar de bovinos canulados ingerindo dois níveis de concentrado (0 ou 0,8% do PC) e três níveis de suplementação com leveduras vivas (0,8 ou 40x10 ⁹ UFC/animal/dia)	50
Tabela 5 - Parâmetros de fermentação ruminal de bovinos canulados ingerindo dois níveis de concentrado (0 ou 0,8% do PC) e três níveis de suplementação com leveduras vivas (0,8 ou 40x10 ⁹ UFC/animal/dia)	51
Tabela 6 - Amônia ruminal e concentração de lactato de bovinos canulados ingerindo dois níveis de concentrado (0 ou 0,8% do PC) e três níveis de suplementação com leveduras vivas (0,8 ou 40x10 ⁹ UFC/animal/dia)	52
Tabela 7 - Digestibilidade in situ da fibra em detergente neutro de diferentes forragens após 24h ou 48 h de incubação ruminal.....	54
Tabela 8 - Digestibilidade in situ da matéria seca de diferentes forragens após 24h ou 48 h de incubação ruminal	54
Tabela 9 - Tamanho do pool, conteúdo de nutrientes e cinética ruminal de bovinos canulados ingerindo dois níveis de concentrado (0 ou 0,8% do PC) e três níveis de suplementação com leveduras vivas (0,8 ou 40x10 ⁹ UFC/animal/dia).....	55
Tabela 10 - População relativa de bactéria ruminal de bovinos canulados ingerindo dois níveis de concentrado (0 ou 0,8% do PC) e três níveis de suplementação com leveduras vivas (0,8 ou 40x10 ⁹ UFC/animal/dia)	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

C	Carbono
AGCC	Ácidos Graxos de Cadeia Curta
cm	Centímetros
CMS	Consumo de Matéria Seca
CNF	Carboidratos Não Fibrosos
CT	Carboidratos Totais
DIVFDN	Digestibilidade <i>in vitro</i> da fibra em detergente neutro
DIVMS	Digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca
ED	Energia Digestível
EE	Extrato etéreo
EPM	Erro padrão de media
FDA	Fibra em Detergente Ácido
FDN	Fibra em Detergente Neutro
FDNi	Fibra indigestível em Detergente Neutro
g	Gramas (s)
ha	Hectare
IAF	Índice de Área Foliar
IL	Interceptação Luminosa
IMS	Ingestão de matéria seca
LDA	Lignina em Detergente Ácido
mL	Mililitro
mm	Milímetros
MM	Matéria mineral
MO	Matéria Orgânica
MS	MS Matéria Seca
N	Nitrogênio
N-amoniacal	Nitrogênio amoniacal
NDT	Nutrientes Digestíveis Totais
PB	Proteína bruta
PC	Peso Corporal
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

t	Tonelada
UA	Unidade Animal
UFC	Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	HIPÓTESE.....	22
3	OBJETIVOS	24
4	REVISÃO DE LITERATURA.....	26
4.1	PRODUÇÃO DE BOVINOS DE CORTE EM AMBIENTES PASTORIS TROPICAIS	26
4.2	LEVEDURAS NA ALIMENTAÇÃO DE BOVINOS DE CORTE.....	31
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
5.1	COLETA DE AMOSTRAS E ANÁLISES.....	42
5.1.1	Desempenho animal.....	42
5.1.2	pH ruminal, Ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e amônia.	42
5.1.3	Degradabilidade ruminal <i>in situ</i>	43
5.1.4	Análises químicas	44
5.1.5	Determinação da cinética ruminal.....	44
5.1.6	Quantificação de microrganismos ruminais.	45
5.1.7	Análises dos dados	46
6	RESULTADOS	49
7	DISCUSSÃO	58
8	CONCLUSÕES	64
	REFERÊNCIAS	66

1 INTRODUÇÃO

A demanda por carne bovina aumenta gradativamente, com projeção de 43% de aumento na produção atual até 2023 (BRASIL, 2014). A grande parte da carne produzida no país é vinda de sistema de criação extensiva, sendo que em 2013, 91% dos animais abatidos vieram de sistemas de pastejo (ANUALPEC, 2013). Animais mantidos exclusivamente em pastagens tropicais durante o período quente e chuvoso do ano apresentam ganho de peso diário entre 0,500 a 0,890 kg/cab (RAMALHO, 2006). De modo geral, o potencial genético desses animais não é totalmente expresso em regime de pastejo, devido principalmente à restrição no consumo de energia, sendo este um dos principais limitantes. Como alternativa nessas situações, a suplementação com alimentos concentrados pode constituir-se em ferramenta auxiliar para incrementar as características qualitativas da pastagem sobre o desempenho animal (COSTA, 2007).

No entanto, a menor digestibilidade da fibra é o principal obstáculo para aumentar o desempenho animal nos trópicos, desta maneira, uma das ferramentas disponíveis para aumentar a digestibilidade da fibra é o uso de aditivos alimentares modificadores da fermentação ruminal, como os ionóforos e leveduras. Tais aditivos são conhecidos por melhorar a taxa de digestão da fibra no rúmen, levando a uma maior ingestão de alimentos e crescimento animal. O emprego de probióticos na alimentação de ruminantes pode provocar aumento no crescimento de bactérias celulolíticas, com consequentes alterações na relação acetato/propionato e ainda aumento do fluxo de proteína microbiana para o intestino delgado (WALLACE, 1992; KAMALAMMA; KRISHNAMOORTHY; KRISHNAPPA, 1996).

Ademais, a suplementação com leveduras, principalmente *Saccharomyces cerevisiae*, pode aumentar a taxa de degradação ruminal e a digestibilidade aparente da matéria seca (MS), como resultado da manipulação da atividade e crescimento de bactérias ruminais, especialmente as celulolíticas, que tendem a se elevar (NEWBOLD; WALLACE; McINTOSH, 1996).

Adicionalmente, com a ingestão diária de leveduras, como a *S. cerevisiae*, é possível otimizar as condições do ambiente ruminal, tornando-o mais estável. Tal fato se deve ao possível sequestro de oxigênio dentro do rúmen, criando um ambiente mais anaeróbico, o que favorece as bactérias celulolíticas que são mais sensíveis ao

oxigênio e a pH ruminal abaixo de 6,0 e bactérias utilizadoras de lactato como a *M. elsdenii*, reduzindo o acúmulo deste metabólito, mantendo pH ruminal mais elevado, melhorando as condições de crescimento para as bactérias celulolíticas (PATRA, 2012). Esse efeito das leveduras sobre o pH ruminal é particularmente importante em situações de suplementação energética, onde a ocorrência de desordens digestivas é mais comumente observada.

HIPÓTESE

2 HIPÓTESE

A inclusão de *S. cerevisiae* na dieta de bovinos Nelore promoverá melhor estabilidade do ambiente ruminal, favorecendo o desenvolvimento de bactérias celulolíticas e conseqüentemente, maior degradação de fibra.

3 OBJETIVOS

Avaliar o efeito da inclusão de duas doses de *S. cerevisiae*, sobre a digestibilidade da fibra, o consumo de matéria seca, a cinética e o ambiente ruminal de Bovinos Nelore alimentados com feno de Tifton-85, com ou sem suplementação de concentrado energético.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 PRODUÇÃO DE BOVINOS DE CORTE EM AMBIENTES PASTORIS TROPICAIS

Acontecimentos importantes, como a obtenção do título de maior exportador de carne bovina do mundo, marcaram a pecuária de corte brasileira na última década, resultantes principalmente da aplicação de técnicas modernas de produção, da melhoria na sanidade e no potencial genético das raças zebuínas, principalmente a raça Nelore, juntamente com o crescimento econômico do país. Essas mudanças permitiram ao setor ganho em volume de produção e produtividade, colocando o Brasil em condição de destaque no cenário mundial de produção de carne bovina (VIEIRA, 2011).

No entanto, as margens obtidas com a pecuária de corte têm reduzido ano a ano, o que tem demandado aumentos produtivos para que ocorra a manutenção da rentabilidade dos produtores (BRASIL, 2014). Entretanto com o aumento da pressão sobre os recursos naturais, dificilmente haverá crescimento da área de pastagens no Brasil. Diante deste cenário, para que esta demanda seja atendida a alternativa será aumentar a produtividade de carne por área. Assim, entender as bases que compõe um sistema de produção e suas possíveis limitações, seria o primeiro passo para a definição de estratégias e metas que permitam incrementos em produtividade.

Em relação à produção de carne mundial, o Brasil possui vantagem pelo baixo custo de produção, quando comparado aos outros países exportadores, como os EUA, devido ao fato de mais de 91% da produção de carne brasileira ser baseada na utilização de pastagens (ANUALPEC, 2013). Estas, uma vez estabelecidas, podem ser manejadas como fonte de nutrientes passíveis de transformações em produto animal de baixo custo. O Brasil tem como base a criação de bovinos consolidada na utilização de volumosos, principalmente pastagens tropicais (FERRAZ; FELÍCIO, 2010), no entanto, devido as oscilações climáticas durante o ano, enfrentamos normalmente oscilações na disponibilidade de massa de forragem e nutrientes nas

forrageiras, causando impacto no desenvolvimento e desempenho dos animais, podendo alterar a curva crescente de crescimento muscular destes.

Há dois momentos distintos durante o ano sobre a produção de forragem, sendo estes:

Período da seca: onde as características climáticas como as baixas temperaturas, precipitações e luminosidade, limitam o crescimento e desenvolvimento das gramíneas, modificando sua composição química e estrutural, apresentando baixo teor de proteína e elevado teor de fibras, o que leva a baixos ganhos e em alguns casos perda de peso dos animais, mesmo quando estes são submetidos a baixas taxas de lotação (DETMANN et al., 2014).

Sobre o período das águas, as condições climáticas são favoráveis para o crescimento e desenvolvimento das gramíneas, pelo aumento da luminosidade, temperatura e precipitação. No entanto, a composição química das gramíneas não é constante, possui crescimento intenso e variável, as técnicas de manejo de pasto se tornam imprescindíveis para permitir que os animais consumam forragem de melhor qualidade, apresentando boas taxas de crescimento (DETMANN et al., 2014).

Estas flutuações estacionais da qualidade e disponibilidade dos pastos resultam em aumento da idade de abate dos animais (POPPI; MACLENNAN, 1995), influenciando desse modo o acabamento e a qualidade da carcaça. Neste contexto, o aprimoramento de técnicas e estratégias de manejo e nutrição que permitam potencializar a utilização das pastagens, aumentar a taxa de lotação e, principalmente, o ganho de peso, tornam-se interessantes, pois possibilitam ao animal menor tempo para atingir o peso de abate, reduzindo sua permanência no sistema de produção (VIEIRA, 2011).

Deste modo, os recursos nutricionais basais são definidos como todos os recursos disponíveis no sistema que são capazes de prover nutrientes e atributos nutricionais sem qualquer introdução de recursos externos, como suplementos concentrados ou misturas minerais. Sendo estes elementos, por sua vez, sendo exóticos ao sistema, constituindo os recursos nutricionais suplementares (PAULINO et al., 2008; DETMANN, 2010).

Na nutrição de ruminantes, a fração fibrosa é determinada pela fibra em detergente neutro (FDN), que é correlacionada negativamente com a ingestão de

matéria seca. Porém, o conhecimento da fração indigestível da FDN (FDNi), juntamente com as propriedades físicas dessa fibra, nos permite maior entendimento para poder fornecer correlações mais acuradas com a digestibilidade do pasto, onde a baixa produtividade das pastagens brasileiras, acompanhada pela qualidade nutricional, importantes fatores que limitam a produção de carne no Brasil (VIEIRA, 2011).

Neste contexto, o pasto constitui o principal recurso nutricional basal para a produção animal nos trópicos. De forma mais específica, a fração potencialmente digestível da matéria seca (MSpd), cujo principal componente é a fração potencialmente digestível da fibra em detergente neutro (FDNpd), esse o principal substrato para a construção de produtos animais nos trópicos (DETMANN; PAULINO; VALADARES FILHO, 2008; PAULINO et al., 2008; DETMANN, 2010). As gramíneas de clima tropical, possuem maior proporção dos constituintes da parede celular, quando comparados às de clima temperado. Van Soest (1994) atribui esse fato às elevadas temperaturas, que são características marcantes das condições tropicais e promovem rápida lignificação da parede celular, acelerando a atividade metabólica das células, o que resulta em decréscimo do “pool” de metabólitos no conteúdo celular, além de promover a rápida conversão dos produtos fotossintéticos em componentes da parede celular, e um rápido aumento nos teores de carboidratos estruturais, tendo como consequência a redução dos níveis de digestibilidade.

As plantas forrageiras apresentam, em média, 50 a 80% da sua parte aérea composta por parede celular, uma vez que as gramíneas são a principal forma de obtenção de alimento pelos ruminantes, seu sistema digestivo foi adaptado por longas gerações para digerir a parede celular das forragens, através da associação com microrganismos dentro de uma câmara fermentativa, o rúmen. Sendo assim, a parede celular pode ser digerida, no entanto, dependendo da qualidade da fibra, menos de 50% desta fração consegue ser utilizada pelo animal, constituindo essa uma característica importante do desempenho dos animais em pastejo (BUXTON; REDFEARN, 1997).

As gramíneas possuem mais tecido com lenta degradação como xilema, epiderme e células da bainha vascular, e menos tecidos de rápida degradação, como mesófilo e floema (VAN SOEST, 1994). Também, devido à concentração da enzima rubisco nas células da bainha vascular e pela maior eficiência fotossintética,

as folhas de gramíneas C₄ possuem menor concentração de proteína que em gramíneas C₃ (MULLAHEY et al., 1992).

Os microrganismos ruminais colonizam grande parte dos tecidos, com digestão iniciada nas células do mesófilo e floema por possuírem apenas uma parede delgada e não lignificada, sendo rapidamente digeridos (AKIN et al., 1973). A taxa de digestibilidade das células do mesófilo facilita o acesso dos microrganismos às células da bainha parenquimática, que estão envolvidas pelo mesófilo. Essa característica é importante pois este tecido apresenta aproximadamente 50% da proteína das folhas e alta proporção de amido, entretanto, devido a grande espessura dessa parede, estas células apresentam baixa taxa de digestão. Logo, pode ocorrer escape ruminal destas células que não foram rompidas ou degradadas pelos microrganismos. Esclerênquima e xilemas, que fazem parte da parede secundária, e mais espessa, contribuem bastante para a baixa digestibilidade da forragem em geral (AKIN, 1989; WILSON et al., 1993).

O potencial de degradação das forrageiras *in vitro* de diferentes tecidos da lamina foliar, mostra que com o avanço da idade da folha, há redução significativa na taxa de degradação da parede celular, principalmente pelo arranjo mais adensado das células e elevada espessura das paredes celulares, que geralmente se apresentam lignificadas, impedindo o acesso das bactérias ao citosol, local de armazenamento de compostos com alto valor nutricional, como os carboidratos solúveis e as proteínas. (WILSON; MERTENS, 1995; PACIULLO, 2002). Sniffen, O'Connor e Van Soest (1992) classificaram as formas de presença de N na planta em cinco frações: fração A, caracterizada pelo N não proteico, com alta digestibilidade no rúmen, e normalmente acumula-se em condições de altas doses de adubação quando a planta não consegue assimilar todo o N absorvido; a fração B₂, que compõe parte da proteína que não é solúvel, que não faz parte da parede celular, não tem N não proteico e é considerada de média degradação; fração B₃, que representa parte da proteína que está aderida à FDN, mas com taxa de degradação muito lenta; e a fração C, que é indisponível, está na FDA associado à Lignina, complexada ao tanino e produto da reação de *Maillard*, que tem baixa degradabilidade ruminal.

Por outro lado, a folha é a fração da planta forrageira que compõe a maior parte da dieta de animais em pastejo (RUGGIERI et al., 2008). Portanto, há necessidade de encontrar soluções de manejo que favoreçam tanto a planta forrageira quanto o animal em pastejo, permitindo alta produtividade de forragem aliada a um elevado desempenho animal. Quando a massa de forragem e o potencial animal não são limitantes, a qualidade do pasto ou valor alimentício é definida pela produção por animal, estando diretamente relacionada com o consumo voluntário e com a disponibilidade dos nutrientes contidos na mesma. Deste modo, a definição mais adequada de qualidade da forragem é a que relaciona o desempenho do animal com o consumo de energia digestível (ED). Contraposto, o valor nutritivo refere-se apenas ao conjunto formado pela composição química da forragem, sua digestibilidade e a natureza dos produtos de digestão (MOTT; MOORE, 1970). No entanto, para que essas informações referentes ao valor nutritivo da forragem sejam úteis em termos práticos, elas devem estar disponíveis antes do fornecimento ao animal, para que possam ser usadas para prever o desempenho animal, seja fornecida exclusivamente ou quando associada a concentrados. A importância de ambos, valor nutritivo e consumo voluntário, como componentes da qualidade da forragem, vêm sendo discutidos há anos, sendo a qualidade da forragem apontada pelos autores como o fator mais importante que influencia a produtividade de um ruminante, quer seja, em pastejo ou em confinamento (POPPI; McLENNAN, 2007).

A essência do manejo do pastejo consiste em encontrar o balanço eficiente entre o crescimento da planta, o seu consumo e a produção animal, a fim de manter estável o sistema de produção (HODGSON, 1990). A planta utiliza as folhas para captar luz e realizar a fotossíntese, produzindo carboidratos, que permitem a manutenção da vida e do desenvolvimento. De modo geral, quando o pastejo é realizado de forma homogênea e a Intercepção luminosa (IL) for de 95%, o valor nutritivo das diversas forrageiras praticamente não é alterado, sendo caracterizado por níveis de proteína bruta na faixa de 14 a 18%, e digestibilidade da MS (matéria seca) de 60 a 70% (BUENO, 2003; DIFANTE, 2005). Para melhorar o valor nutritivo uma sugestão é utilizar valores de IL menor que 95% assim, haverá o consumo de folhas mais jovens e valor nutricional melhor, sendo uma estratégia para maximizar o ganho de peso em determinadas situações, porém o uso contínuo

desta estratégia levaria a pastagem para situações de degradação pelo aumento na mobilização de reservas (BARBOSA; FARIA; VILELA, 2004).

Quando consideramos animais em pastejo, podemos definir o efeito interativo pode ser delineado por uma escala arbitrária não-paramétrica na qual este efeito assumido como negativo quando há adição de suplementos ou recursos suplementares confere em dieta total cujo valor alimentício é inferior à soma das partes individuais (suplemento + pasto). Neste ponto da escala estabelece-se o efeito alimentício substitutivo. Em outra situação, o efeito interativo positivo significa que o valor alimentício da dieta total é superior a soma das partes individuais. Quando a soma das partes avaliadas individualmente é igual ao valor alimentício da dieta há o efeito interativo nulo (ou zero). Porém essa situação não é comumente observada em animais suplementados a pasto (PAULINO et al., 2008).

Assim, o pasto deve ser entendido como recurso nutricional basal de elevada complexidade, uma vez que sua capacidade de fornecimento de substratos para produção animal varia qualitativa e quantitativamente ao longo do ano em função, principalmente, da influência de variáveis climáticas, como precipitação, temperatura e radiação solar. Desta forma, a aplicação dos fundamentos de nutrição animal em sistemas nos quais animais são explorados em pastejo consiste primeiramente no entendimento, para podermos explorar o efeito interativo entre recursos nutricionais basais e suplementares (PAULINO et al., 2008) buscando-se a otimização da produtividade destes sistemas.

4.2 LEVEDURAS NA ALIMENTAÇÃO DE BOVINOS DE CORTE.

Devido ao aumento da produção do gado leiteiro e do gado de corte, faz-se necessário o aumento da concentração dos nutrientes nas dietas, principalmente proteína e energia. Aliado ao fator alto consumo de concentrados nas dietas pelos animais, faz-se necessário trabalhar com produtos que melhorem o desempenho animal, principalmente aqueles que atuam no rúmen controlando ou modificando o padrão de fermentação, evitando assim distúrbios metabólicos e aumentando a eficiência alimentar dos animais (BARBOSA; FARIA; VILELA, 2004).

É de fundamental importância fisiológica a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) pelos microrganismos ruminais para a nutrição do animal hospedeiro. Algumas espécies de bactérias, protozoários e fungos realizam celulólise, e outras diversas populações podem hidrolisar amido e açúcares, bem como proteínas. A atividade microbiana e suas funções no processo digestivo podem ser modificadas pelo pH ruminal. Uma quantidade excessiva de concentrados resulta em redução de pH ruminal, devido à rápida fermentação de carboidratos não-estruturais e à intensa produção de AGCC, que podem produzir grande impacto na digestão da fibra (PEREIRA et al., 2001). A suplementação com leveduras pode ser mais eficiente quando a digestão da fibra está comprometida e que a energia é o principal fator limitante (BEAUCHEMIN et al., 2000). Os polímeros constituintes da parede celular vegetal, principalmente celulose e hemiceluloses, são insolúveis, estruturalmente complexos e não totalmente acessíveis fisicamente, e sua degradação é menor do que desejável (BERCHIELLI; PIRES; OLIVEIRA, 2006).

Desta forma, a inclusão de leveduras nas dietas de bovinos, tende a melhorar a digestibilidade das frações potencialmente digestíveis das fibras, fornecendo um aporte maior de energia. Um dos principais fatores que poderiam explicar este efeito benéfico de leveduras vivas em aumentar o aproveitamento das frações fibrosas é o aumento da população de bactérias degradadoras de fibra, e este se dá através da capacidade das células de levedura retirarem o oxigênio do ambiente ruminal. Embora o rúmen seja considerado um ambiente anaeróbico, o oxigênio pode ser detectável *in situ*, podendo ser advindo da alimentação e ingestão de água, ruminação ou salivagem (NEWBOLD; WALLACE; CHEN, 1995). A grande parte dos microrganismos ruminais são altamente sensíveis ao oxigênio. Newbold, Wallace e McIntosh (1996) constataram que cepas de *S. cerevisiae* são capazes de estimularem atividades bacterianas pelo consumo de oxigênio, criando condições mais favoráveis para o crescimento ecológico e atividades da microflora anaeróbica.

Sendo assim, a utilização de Leveduras vivas, como aditivo probiótico para controle dos parâmetros ruminais, tem sido amplamente estudada na nutrição de ruminantes onde a espécie *Saccharomyces cerevisiae* é a mais pesquisada pelo benefício que provoca na digestão animal. Na média, os trabalhos têm mostrado benefício na nutrição de ruminantes (em termos de ganho de peso e produção de leite)

com aumentos de 7 a 8%. Esses efeitos são muito variáveis e dependentes da dosagem do aditivo e da dieta ingerida (WALLACE, 1994).

Na nutrição de ruminantes, cepas de leveduras vivas foram inicialmente introduzidas em dietas de bovinos leiteiros. Eckles et al. (1924) relataram a utilização de leveduras como alimento suplementar para vacas em lactação, sendo que posteriormente Beeson e Perry (1952) e Renz e Koch (1954) também relataram aumento expressivos, em ganho de peso e produção de leite, respectivamente. Vários produtos comerciais surgiram no mercado com diferentes cepas selecionadas, com características variáveis em relação a concentração (unidade formadora de colônia por grama de produto – UFC/g), viabilidade de células, processamento, entre outros fatores que contribuem para a grande variação nos resultados encontrados. As respostas tanto no metabolismo ruminal quanto no desempenho de ruminantes alimentados com leveduras vivas variam, e muitas vezes são contraditórios devido a esses fatores. Sabe-se, portanto, que as respostas dos animais quando recebem esse aditivo é influenciada principalmente pela composição da dieta (WALLACE; NEWBOLD, 1994).

O aumento da ingestão de alimentos devido ao uso das leveduras parece estar relacionado pelo aumento na taxa de quebra da fibra, mas também pelo aumento do fluxo duodenal de nitrogênio absorvido (WALLACE, 1994). Estas observações sugerem maior atividade da população microbiana evidenciada pelo aumento da contagem de bactérias anaeróbicas no fluído ruminal. Os números de bactérias fibrolíticas são aumentados, e as bactérias que utilizam o ácido láctico são estimuladas pela presença de ácidos dicarboxílicos, sendo assim, explica-se em parte o aumento da quebra das fibras e aumento da estabilidade na fermentação ruminal de animais que recebem este aditivo Dawson (2000), em trabalho de revisão, descreve os efeitos das leveduras no rúmen em decorrência dos seguintes fatores:

- 1- aumento da taxa inicial da digestão da matéria seca ruminal nas primeiras 24 horas de incubação, estimulada por uma mais rápida atividade ruminal;
- 2- estabilização do pH ruminal pela habilidade da levedura em prevenir acúmulo de ácido láctico no rúmen;
- 3- alteração do metabolismo do nitrogênio ruminal refletindo em menor concentração de amônia ruminal e aumento de concentrações de bactérias ruminais seguido de maior fluxo de nitrogênio bacteriano para o intestino

delgado;

- 4- mudança na população microbiana ruminal, com aumento das bactérias anaeróbicas, fibrolíticas, proteolíticas e as que utilizam ácido láctico.

Muitos autores sugerem os modos de ação de leveduras vivas no rúmen, sempre relacionados com mudanças no padrão de fermentação ruminal, como maior estabilidade nos níveis de pH, redução dos níveis de amônia, maior digestão de fibras, aumento no consumo de matéria seca e conseqüentemente aumento na produção (SIMAS; NUSSIO, 2001).

Como citado anteriormente, um dos principais efeitos da inclusão de levedura na dieta de bovinos é uma melhor estabilização do pH ruminal. Em condições normais da fermentação ruminal, em que há produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) que leva o ambiente ruminal a um pH > 6, o lactato é um importante produto de fermentação, capaz de reduzir ainda mais o pH. A medida que o pH cai, ocorre maior proliferação de bactérias *Streptococcus bovis*, produtoras de ácido láctico, se a concentração de lactato ultrapassar a capacidade de utilização desse produto pelas bactérias *Megasphaera elsdenii* e *Selenomonas ruminantium* (NOCEK, 1997) ocorre então a morte de protozoários e de várias espécies de bactérias (RUSSELL; HINO, 1985). O baixo pH ruminal durante longos períodos inibe consumo (FULTON; KLOPFENSTEIN; BRITTON, 1979) e reduz a digestão fibrosa, altera o perfil de produção de AGCC no líquido ruminal com baixos índices de acetato/propionato e com acúmulo significativo de lactato (MARTIN; BROSSARD; DOREAU, 2006). Além disso, períodos longos em que o pH se mantiver abaixo de 5,5, pode ocasionar problemas metabólicos como acidose, podendo levar a casos de laminites, e até a morte dos animais dependendo da severidade da queda de pH.

Foram observados efeitos consistentes no pH ruminal e concentração de AGCC com aumento linear com aumento da dose de levedura. No entanto a concentração de ácido láctico não foi influenciada pela suplementação de levedura (DESNOYERS et al., 2009).

Foi verificado que o uso de cultura de levedura estimula o crescimento de bactérias utilizadoras de lactato através da presença de altas concentrações de ácido dicarboxílicos em seu conteúdo, principalmente ácido málico (NISBET; MARTIN, 1991). Os resultados sugerem que esta cepa pode ser eficiente para a estabilização

do pH ruminal por estimular os protozoários ciliados *Entodiniomorphid*, que são capazes de consumir lactato e são conhecidos também por digerir grânulos de amido muito rapidamente e, assim, competir com as bactérias amilolíticas por esse substrato, além disso, o amido é fermentado pelos protozoários em um ritmo mais lento do que por bactérias amilolíticas e os principais produtos finais da fermentação são AGCC, evitando a produção de ácido láctico e quedas de pH ruminal (NISBET; MARTIN, 1991).

Em meta-análise realizada com a compilação de 110 artigos e 157 experimentos, mostrou que a suplementação com levedura aumentou o pH ruminal e a concentração de AGCC no rúmen e tenderam a reduzir a concentração de ácido láctico no rúmen, não influenciando na proporção de acetato/propionato. Eles avaliaram também o efeito da interação entre o fornecimento de levedura e as variações entre os experimentos, onde foi observado que quanto maior o consumo de MS e maior a proporção de concentrado na dieta maior o efeito positivo da adição de levedura no controle do pH ruminal ($p < 0,001$) e o efeito negativo na concentração de ácido láctico tende a ser acentuada pela maior proporção de concentrado na dieta ($p = 0,088$) (DESNOYERS et al., 2009).

Outro efeito importante do fornecimento de leveduras que vem sendo discutido, são os efeitos causados no ambiente ruminal para proporcionar maior atividade microbiana de alguns microrganismos, principalmente os que degradam fibras, no entanto estes efeitos bioquímicos não estão totalmente esclarecidos. Vários mecanismos bioquímicos hipotéticos têm sido desenvolvidos para explicar tal efeito, vários deles baseiam-se na habilidade das leveduras em fornecer importantes nutrientes ou cofatores nutricionais que podem estimular a atividade microbiana, enquanto outros sugerem habilidade da levedura em controlar o nível de oxigênio no ambiente ruminal. Recente estudo tem demonstrado o isolamento de pequenos grupos de peptídeos das leveduras que estimulam maior crescimento das bactérias, estimulando suas atividades, em comparação a aminoácidos sintéticos. Esses peptídeos funcionam como um gatilho para estimular o crescimento microbiano e aparentemente não são estáveis no ambiente ruminal, não podendo por isso, serem mensurados no fluido ruminal. Parecem ser rapidamente quebrados pelas enzimas proteolíticas dos microrganismos ruminais, sendo, provavelmente, eliminados rapidamente. Outra atividade potencial das leveduras é a habilidade na prevenção de

colonização do intestino por microrganismos patogênicos, modulando a função imune das células intestinais (DAWSON, 2000).

Buscando mais informações sobre os efeitos que as leveduras causam no crescimento da população ruminal, foi realizado estudo com crescimento *in vitro* de bactérias como *Selenomonas ruminantium* H18, *Megasphaera elsdenii* B159 e T81, *Fibrobacter succinogenes* S85 e *Ruminococcus albus* B199, quando se suplementou estas culturas com filtrados de levedura. Os resultados apontaram que a suplementação aumentou o crescimento de *Selenomonas ruminantium* e *Megasphaera elsdenii* na presença de lactato, com produção de acetato e propionato. A suplementação também aumentou a degradação inicial da celulose, nas primeiras 24 horas de incubação, por bactérias como *Fibrobacter succinogenes* S 85 e *R. flavefacies* FD1 (CALLAWAY; MARTIN, 1997).

Em um outro experimento *in vitro* mostrou que quando adicionado cepas de *S. cerevisiae* ela foi capaz de competir pela utilização de carboidratos solúveis com a *S. bovis*, reduzindo com isso a produção de lactato. Este efeito só foi observado enquanto as células de levedura estavam vivas. Com isso ocorreu a estimulação do crescimento e do metabolismo das bactérias que utilizam lactato, tais como *Megasphaera elsdenii* e *Selenomonas ruminantium* (CHAUCHEYRAS et al., 1995).

No entanto, o que foi percebido que os efeitos da utilização de leveduras são altamente dependentes da dose e da dieta fornecida. Sendo o estímulo ao crescimento microbiano central a ação benéfica das culturas de levedura no rúmen, precauções adicionais devem ser tomadas no momento de selecionar leveduras comerciais, a fim de garantir que estas precauções sejam capazes de estimular bactérias ruminais.

Sobre o efeito da levedura no aumento da digestibilidade de fibras os resultados apontam que o aumento desta digestibilidade é influenciado pelo perfil das dietas fornecidas aos animais, quando avaliado o efeito da *S. cerevisiae* (10 g/dia) em dietas à base de cana-de-açúcar, variando de 60 a 82% da dieta, sendo o restante concentrado, em novilhos ½ Hol x Zeb fistulados no rúmen e abomaso, não foram encontradas diferenças significativas no consumo e digestibilidades de MS, MO, PB, EE, CT, CNE, FDN (PEREIRA et al., 2001). Em outro trabalho com animais cruzados, porém, estes mantidos em pastagens tropicais recebendo 2 kg de concentrado/cabeça/dia não encontraram diferenças estatísticas no ganho médio

diário, ingestão de matéria seca e digestibilidade de FDN e FDA com o uso de levedura na dieta (CABRERA et al., 2000). No entanto, em meta-análise os autores mostraram que a digestibilidade da matéria orgânica (MO) foi aumentada pela suplementação com leveduras vivas ($p = 0,007$), e os efeitos positivos da suplementação de levedura na digestibilidade da MO foi diminuindo a medida que se reduziu a proporção de concentrado na dieta com conseqüente aumento de FDN ($p = 0,004$) (DESNOYERS et al., 2009).

Maiores ganhos de peso e eficiência alimentar foram observados dos dias 32 a 58 em bovinos alimentados com leveduras quando comparados com o controle, este aumento no desempenho foi atribuído pelos autores por uma maior digestibilidade da MS da dieta que continha levedura (84,3 vs. 76,1%) (PARRA; DECONSTANZO, 1992).

A literatura atual é muito escassa em relação a ensaios de desempenho com a suplementação com levedura. Vem sendo relatados resultados inconsistentes, e tal fato pode estar relacionado a diversos fatores, como a utilização de diferentes linhagens da levedura, diferentes concentrações (UFC/ g) ou ainda a interação das culturas de leveduras com as diferentes dietas empregadas.

Avaliando animais Limousin x Holandês em dietas com alto teor de grãos e cereais, não foram encontradas diferenças estatísticas em ganho de peso e produção de AGCC, porém, houve diminuição de amônia e L-lactato ruminal, maior número de cultura de bactérias e proporção de propionato. A síntese de proteína microbiana não foi influenciada pela adição de leveduras à dieta (HASSAN et al., 1996). Em estudo conduzido por Mutsvangwa et al. (1992) com o objetivo de avaliar os efeitos de diferentes níveis de levedura (8 a 10g de *Saccharomyces cerevisiae*/animal/dia) sobre o ganho de peso e a eficiência alimentar em bezerros Limousin x British Friesian, observaram um aumento significativo na ingestão de matérias seca, mas esse aumento não foi acompanhado de melhoria no ganho de peso dos animais, nem da eficiência alimentar.

No estudo de foi avaliado diferentes doses de *Saccharomyces cerevisiae*, 0, 3, 6, 9 e 12 g/animal/dia em conjunto com 3 g de monensina/animal/dia em relação ao desempenho de bovinos confinados, alimentados com dieta contendo 30% de silagem de milho, 41% de milho moído e 15% de polpa cítrica. Maiores IMS foram observadas para os tratamentos com 6, 9 e 12g de levedura/dia, porém não foi observada

diferença significativa entre os tratamentos quanto ao GPD e a CA (FERREIRA et al., 2009).

Em experimento realizado com novilhos Simental, com dietas contendo 49% de feno de tifton, os autores não obtiveram resultados positivos ao fornecerem 5 g/animal/dia de levedura (MIRANDA et al., 2001). Porém, trabalhando com novilhas ½ Holandês-Zebu alimentadas com dietas a base de cana de açúcar e fornecendo 10g/animal/dia de levedura, observaram melhorias tanto no consumo de matéria seca como no ganho de peso diário dos animais suplementados (MIRANDA et al., 2001).

A adição de cepas de leveduras nas dietas vem mostrando efeitos positivos também quando associadas com monensina sódica, aditivo mais utilizado na pecuária atualmente. Em meta-análise para observar o efeito da monensina sódica, leveduras *Saccharomyces cerevisiae* isoladas e a associação de ambos aditivos sobre o GDP e CA de bovinos de corte, observou-se que o GPD dos animais que não receberam nenhum tipo de aditivo foi menor (1,45 kg/dia) do que aqueles suplementados com leveduras (1,57 kg/dia), e com monensina apenas (1,54 kg/dia) ou, ainda, da combinação dos dois aditivos (1,57 kg/dia). A conversão alimentar dos bovinos suplementados com leveduras (6,40 kg MS/kg de ganho de peso) foi melhor do que a dos não-suplementados, (6,61 kg de MS/kg de ganho de peso), mas não diferiu dos bovinos suplementados com monensina sobre o desempenho de bovinos em confinamento (ERASMUS et al., 2009).

Em outro estudo, comparando os efeitos da suplementação com *S. cerevisiae* e de monensina sobre a ingestão de matéria seca, digestibilidade dos nutrientes, produção de AGCC, pH e concentração de amônia ruminal em bovinos confinados alimentados com dietas contendo 80% de concentrado, com dois níveis de amido (23 e 38%). Onde os tratamentos consistiam em 250 mg de monensina, levedura em baixa dose (1g/100 kg PV), e levedura em alta dose (2,5g/100 kg PV). A ingestão de carboidratos não fibrosos, amido e matéria seca foram menores para o tratamento com baixa dose de levedura, quando comparados aos outros tratamentos. O pH ruminal não foi influenciado pela inclusão de aditivos, com média de 6,49. Já as concentrações de AGCC foram maiores em animais recebendo menores quantidades de amido, monensina e levedura, e as de lactato foram menores para

os tratamentos em que a monensina foi adicionada, assim como nas com maiores níveis de amido (MONNERAT et al., 2008).

Diante do exposto, pode-se observar que o uso de culturas de leveduras vivas na nutrição de bovinos apresenta resultados contraditórios, não havendo uma unanimidade dos trabalhos com relação a todos os seus efeitos ruminais – digestão de nutrientes, alteração de concentração de amônia e AGCC, na ingestão de matéria seca, na produção (leite e ganho de peso) e composição do leite. Resultados de redução de lactato, aumento de microrganismos ruminais, inalteração do pH ruminal já apresentaram uniformidade superior, principalmente em dietas de bovinos de leite, entretanto, estudos que avaliem os efeitos da inclusão de leveduras em dietas de bovinos de corte, com alta inclusão de volumosos ainda são pouco descritos, permitindo que não haja resultados consistentes nessa área, mostrando os efeitos causado com a inclusão das leveduras. Estas que apresentam potencial em proporcionar ambiente ruminal estável para desenvolvimento de bactérias celulolíticas, proporcionando melhora na digestibilidade da fibra, contribuindo para a melhora do desempenho animal, aumentando assim a produtividade dos sistemas em pastejo.

MATERIAIS E MÉTODOS

5 MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais envolvendo os animais foram aprovados de acordo com as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ – USP).

Foram utilizados trinta e seis novilhos Nelore canulados no rúmen (30 fêmeas e 6 machos), com peso corporal médio inicial de 400 kg aproximadamente, que foram mantidos em baias individuais (12 m²) no confinamento experimental do Laboratório de Pesquisa em Gado de Corte (LPGC) da FMVZ – USP, Campus de Pirassununga.

Os tratamentos foram obtidos em arranjo fatorial 3 × 2, a partir da combinação de três níveis de inclusão de *S. cerevisiae* (0, 8 e 40 × 10⁹ UFC/animal/dia; CNCM I-1077, Lallemand®) em duas dietas a base de feno de Tifton-85, com ou sem suplementação energética (0 e 0,8% do PC), com seis repetições por tratamento (5 novilhas e 1 novilho), durante quatro períodos com duração de 21 dias cada, sendo os 10 primeiros dias do período experimental total destinado para a adaptação dos animais as instalações e a dieta.

Tabela 1 - Composição nutricional Feno de Tifton-85 (*Cynodon dactylon*)

Ingrediente	MS	MM,	PB,	FDN,	LDA,	FDNi,
	%	%MS	%MS	%MS	%FDN	%MS
Tipo A	97	6,3	12,0	71,0	11,0	36,4
Tipo B	92	7,2	10,1	72,3	16,2	45,0

Fonte: (OLIVEIRA, C. A. de, 2017)

MS=Matéria Seca; PB=Proteína Bruta; FDN=Fibra em Detergente Neutro; LDA=Lignina em Detergente Ácido; FDNi=Fibra em Detergente Neutro indigestível.

A alimentação foi fornecida *ad libitum*, onde metade dos animais recebia uma mistura de feno de Tifton-85 (Tabela 1), mais uma suplementação energética (Tabela 2), de 0,8% do Peso Corporal (PC), enquanto os demais animais recebiam somente feno de Tifton-85 com suplementação mineral.

A dieta foi fornecida uma vez ao dia, às 0800, e as sobras eram pesadas diariamente, mantendo-as entre 2,5 e 5,0% do total ofertado, para cálculo do consumo diário dos animais e o ajuste diário do fornecimento.

Tabela 2 - Composição do suplemento energético	
Ingredientes	0,8% do peso vivo
Milho	91,74%
Suplemento Mineral	4,13%
Sal comum	2,75%
Calcário	1,38%

Fonte: (OLIVEIRA, C. A. de, 2017)

Os animais de ambos os grupos foram alocados aleatoriamente para receber um dos três níveis de levedura testados (seis animais/tratamento), sendo: 1) controle (sem inclusão de levedura); 2) inclusão com linhagem específica de *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-1077 (dose 8 de 8×10^9 UFC/animal/dia), e 3) inclusão de 5 vezes a dose (dose 40 de 40×10^9 UFC/animal/dia). A dose diária de levedura foi fornecida diretamente no rúmen dos animais antes da alimentação, através da cânula ruminal.

5.1 COLETA DE AMOSTRAS E ANÁLISES

5.1.1 Desempenho animal

O consumo de matéria seca (CMS) foi mensurado diariamente pela pesagem dos alimentos fornecidos e das sobras. Os animais foram pesados após 16 horas de restrição alimentar, no início do experimento e posteriormente a cada 21 dias para avaliação do ganho médio diário (GMD) nos períodos. A eficiência alimentar foi calculada pela relação GMD:CMS.

5.1.2 pH ruminal, Ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e amônia.

Amostras de fluido ruminal foram coletadas no 19º dia de cada período experimental, manualmente através da cânula ruminal, onde aproximadamente 50 mL de líquido foram coletados de três diferentes porções do rúmen (cranial, ventral e

caudal). Para mensuração do pH ruminal, as amostras foram colhidas em quatro intervalos de tempo, imediatamente antes e após a alimentação, sendo: 07:00 (tempo 0), 09:00 (tempo 2), 12:00 (tempo 5) e 17:00 (tempo 10). Para mensuração de AGCC e NH_3 as coletas foram realizadas nos tempos 0 (07:00) e 5 (12:00).

Imediatamente após a coleta, amostras de 100 mL de líquido ruminal foram utilizadas para a determinação do pH com um medidor de pH digital portátil (Hanna Instruments limitada HI8424, Bedfordshire, Reino Unido), calibrado com soluções de pH 4,0 e 7,0. Para as análises de AGCC que incluem acetato, propionato e butirato, uma fração de aproximadamente 100 mL de líquido ruminal foi centrifugada a $2000 \times g$ durante 20 min à temperatura ambiente, e em 2 mL do sobrenadante foi adicionado 0,4 mL de ácido fórmico P.A. e congelados a -20°C para a análise, de acordo com Erwin, Marco e Emery (1961). Os ácidos graxos de cadeia curta foram medidos por cromatografia gasosa (Finnigan 9001, Thermo Scientific, West Palm Beach, FL), utilizando uma coluna de vidro de 1,22 m de comprimento e 0,63 cm de diâmetro embalados com 80/120 Carbopack B-DA / 4% (Supelco, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). A concentração de ácido láctico foi medida por uma técnica colorimétrica, de acordo com Pryce (1969). Aos outros 2 mL do sobrenadante foi adicionado 1 mL de solução de ácido sulfúrico 1N e congelado a -20°C para determinação do nitrogênio amoniacal, conforme proposto por Preston (1995).

5.1.3 Degradabilidade ruminal *in situ*

A degradabilidade *in situ* da MS e da FDN foi determinada em quatro amostras de forragem de referência: 1) silagem de milho, 2) feno de Tifton-85 (*Cynodon* spp), 3) *Brachiaria Brizantha* cv. Marandu e 4) *Panicum maximum* cv. Mombaça, para avaliar as atividades celulolíticas do ambiente ruminal. Sacos de poliéster Polyfilament (ANKOM 1020; tamanho 10 cm $\times$ 5 centímetros, com tamanho médio dos poros de 50 μm), contendo 5 g de MS, foram introduzidos simultaneamente no rúmen no dia 12 dos períodos experimentais, às 09:00 (em duplicata), e removidos sequencialmente após 24 e 48 h de incubação. Antes da incubação ruminal os sacos foram submersos

(15') em água aquecida (39°C) e após a remoção do rúmen foram mergulhados em água fria e armazenados a -20°C.

Depois de descongelados, os sacos foram lavados em detergente neutro com máquina automática, secados em estufa de ventilação forçada (60°C, 48 h), e pesados. Perdas de matéria seca foram calculadas como a diferença de peso dos sacos pré e pós-incubados, e expressas como proporção do peso inicial. Para a determinação da digestibilidade da MS e FDN, foram considerados os resíduos analisados quanto ao teor da mesma, antes e após a incubação ruminal.

5.1.4 Análises químicas

Em todos os alimentos, sobras e conteúdo ruminal, MS e MM total foram analisados de acordo com os métodos AOAC (2000) 930.15 e 942.05, respectivamente. Concentração de proteína bruta PB: método 929.080 (AOAC, 1975), e a concentração da FDN foi determinada usando o método descrito por Van Soest e Lewis (1991) usando 8 mL de ureia, sulfito de sódio e α -amilase estável ao calor (Sigma A3306; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) no ANKOM A200 Fiber Analyzer (ANKOM Technology Corp., Fairport, NY, USA). Lignina em detergente ácido e FDA foram analisados de acordo com Van Soest, Robertson e Lewis (1991). FDN indigestível (FDNi) foi determinado pelo conteúdo de FDN nas amostras depois de 288 h de incubação *in situ*, como descrito por Rinne, Huntanen e Jaakkola (2002).

5.1.5 Determinação da cinética ruminal

O conteúdo ruminal foi evacuado manualmente através da cânula ruminal às 11 h (2 h após a alimentação) no dia 20 e às 07 h (2 h antes da alimentação) no dia 21 de cada período experimental. A massa total do conteúdo ruminal e volume foram determinados. Durante a evacuação, uma amostra de 10% da digesta foi separada para facilidade de sub-amostragem. Dessa amostra, uma alíquota de 600 g foi retirada

para determinação da MS e composição bromatológica, respeitando a porcentagem de líquido e sólido do conteúdo total. Uma segunda amostra, foi coletada somente no dia 20 de cada período experimental, para quantificação de microrganismos ruminais, a qual foi filtrada através de uma membrana de náilon (1 mm de tamanho de poro) para separar as fases sólidas e líquidas. Amostras foram retiradas de ambas as fases para determinação do tamanho do compartimento ruminal (*pool*) de componentes da digesta. A cinética ruminal do FDN foi calculada baseada no tamanho de compartimento ruminal de FDNi (DADO; ALLEN, 1995). A taxa de *turnover* de FDN foi definida pelo consumo de FDN dividido pelo pool de FDN (massa ruminal de FDN), e a taxa de passagem (k_p) de FDN foi calculada pela divisão do consumo da FDNi pelo pool de FDNi no rúmen, baseado no modelo de dois compartimentos para a digestão de celulose proposto por Waldo, Smith e Cox (1972).

5.1.6 Quantificação de microrganismos ruminais.

Três populações de bactérias ruminais importantes para a degradação de fibra (*Ruminococcus flavefaciens*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Fibrobacter succinogenes* e *Ruminococcus albus*) foram quantificadas por PCR quantitativo em tempo real. Foi feita uma quantificação relativa destas bactérias em relação ao total de bactérias presentes na amostra de conteúdo ruminal.

As fases sólidas e líquidas retiradas durante o esvaziamento ruminal no dia 20 de cada período, foram processadas imediatamente após as coletas, para extração do material coletado e armazenadas em freezer -80° , para os posteriores procedimentos de quantificação de bactérias.

O DNA total foi extraído das amostras de conteúdo ruminal após degelo. Uma amostra representativa (10 g) foi homogeneizada, centrifugada a $6.500 \times g$ por 30 minutos, e o DNA total foi extraído do precipitado de conteúdo ruminal de acordo com Yu e Morrison (2004). O DNA extraído foi utilizado como molde em reação de PCR em tempo real utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores específicos para as bactérias ruminais desejadas, juntamente com oligonucleotídeo universal para eubactérias (Quadro 1).

5.1.7 Análises dos dados

As análises de variância foram feitas utilizando o procedimento MIXED do programa SAS versão 9.2. O Modelo incluiu os efeitos fixos de inclusão de levedura (Controle, levedura 1 e levedura 2; 2 G.L.), com ou sem concentrado (0 ou 0,8 % do Peso corporal; 1 G.L.), a interação entre inclusão de levedura e com ou sem suplementação de concentrado (2 G.L.); e o erro aleatório (30 G.L.). Os graus de liberdade do denominador foram calculados usando metodologia de aproximação de Kenward-Roger, considerando-se medida repetida no tempo (períodos). Vários erros estruturais de covariância foram investigados e o melhor foi escolhido de acordo com o critério de informação Bayesian (BIC). O efeito da levedura foi comparado usando a mínima diferença significativa de Fisher (opção PDIFF de LSMEANS) e regressão linear. Quando houve interação significativa, os efeitos de tratamento foram comparados usando o SLICE opção do procedimento MIXED. Em todas as comparações, a significância usada foi $P \leq 0,05$ e tendências $P \leq 0,10$.

Quadro 1 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste projeto¹

Bactéria	Primer Forward (5'→3')	Primer Reverse (5'→3')	Eficiência ²
<i>F. succunogenes</i>	GGTATGGGATGAGCTTGC	GCCTGCCCCTGAACTATC	91,3%
<i>R. albus</i>	CCCTAAAAGCAGTCTTAGTTTCG	CCTCCTTGCGGTTAGAACA	90,6%
<i>B. fibrisolvens</i>	ACCGCATAAGCGCACGGA	CGGGTCCATCTTGTACCGATAAAT	82,5%
<i>R. flavefaciens</i>	TCTGGAAACGGATGGTA	CCTTTAAGACAGGAGTTTACAA	84,8%
Eubacteria Universal	CCTACGGGAGGCAGCAG	ATTACCGCGGCTGCTGG	95,9%

Fonte: (OLIVEIRA, C. A. de, 2017)

¹Refêrencias: Tajima et al. (2001), Koike e Kobayashi (2001), Muyzer et al. (1993), Stevenson e Weimer (2007).²Eficiência de amplificação foi determinada como a inclinação da curva padrão.

6 RESULTADOS

Houve aumento linear de UFC de levedura 2 h após a alimentação para ambas as dietas (Figura 1).

Figura 1 - Contagem de leveduras no fluido ruminal 2 h após a suplementação com leveduras

Fonte: (OLIVEIRA, C. A. de, 2017)

A inclusão de levedura promoveu aumento linear no consumo de MS e FDN ($P < 0,05$ - Tabela 3), e tendeu a aumentar a consumo da FDNi ($P = 0,07$ - Tabela 4). A suplementação com concentrado também aumentou o consumo de MS ($P < 0,01$), mas não a ingestão de FDN e FDNi ($P = 0,89$ e $P = 0,47$, respectivamente - Tabela 3).

Tabela 3 - Consumo de bovinos canulados ingerindo dois níveis de concentrado (0 ou 0,8% do PC) e três níveis de suplementação com leveduras vivas (0,8 ou 40x10⁹ UFC/animal/dia)

Itens	Dieta 0			Dieta 0,8			EPM	P-valor		
	0	8	40	0	8	40		Dieta	Trt	D*T
CMS, kg/cab	7,0	7,4	7,9	8,9	10,6	10,9	0,9	<0,01	0,03 ²	0,43
CMS, %PC	1,8	2,0	2,1	2,2	2,7	2,6	0,11	<0,01	0,01 ³	0,39
CFDN, kg/cab	4,9	5,0	5,5	4,9	5,0	5,7	0,4	0,89	0,14 ⁴	0,96
CFDNI, kg/cab	2,6	2,6	2,9	2,4	2,5	2,8	0,23	0,47	0,19 ⁵	0,90

Fonte: (OLIVEIRA, C. A. de, 2017)

¹ Abreviações: CMS=consumo de matéria seca; CFDN=consumo de FDN; CFDNI=consumo de FDN indigestível.

² Efeito linear para Trat ($P = 0,03$). ³ Efeito linear para Trat ($P = 0,03$). ⁴ Efeito linear para Trat ($P = 0,05$).

⁵ Efeito linear para Trat ($P = 0,07$).

A inclusão de concentrado na dieta aumentou o ganho de peso corporal ($P < 0,01$) dos animais e melhorou a eficiência alimentar ($P < 0,01$ - Tabela 4). Não houve

efeito da suplementação de levedura no desempenho animal ($P = 0,77$ e $P = 0,80$ - Tabela 4).

Tabela 4 - Crescimento e eficiência alimentar de bovinos canulados ingerindo dois níveis de concentrado (0 ou 0,8% do PC) e três níveis de suplementação com leveduras vivas (0,8 ou 40x10⁹ UFC/animal/dia)

Itens	Dieta 0			Dieta 0,8			EPM	P-valor		
	0	8	40	0	8	40		Dieta	Trt	D*T
PC inicial, kg	364	357	361	361	361	358	18	0,88	0,91	0,88
PC final, kg	404	403	401	444	443	462	23	<0,01	0,77	0,63 ²
GMD, kg/cab	0,42	0,46	0,42	0,88	0,86	1,01	0,09	<0,01	0,75	0,57 ³
Relação G:C	0,06	0,06	0,06	0,10	0,082	0,09	0,009	<0,01	0,80	0,31

Fonte: (OLIVEIRA, C. A. de, 2017)

¹Abreviações: GMD = ganho médio diário; G:C relação = Relação ganho consumo (eficiência alimentar).

²Linear dieta 0,8 ($P = 0,31$). ³Linear dieta 0,8 ($P = 0,21$)

Os animais que ingeriram concentrado aumentaram a concentração total de AGCC e reduziram o pH ruminal ($P < 0,01$ - Tabela 5). No entanto, não houve efeito da levedura sobre o pH ruminal ($P > 0,05$ - Tabela 5).

Quando os animais foram alimentados apenas com feno (Dieta 0), a dose 8 aumentou a concentração total de AGCC ($P = 0,03$). A ingestão de concentrado diminuiu a proporção de acetato no rúmen ($P < 0,01$) e aumentou as proporções de butirato e valerato ($P < 0,01$ para ambos - Tabela 5).

Tabela 5 - Parâmetros de fermentação ruminal de bovinos canulados ingerindo dois níveis de concentrado (0 ou 0,8% do PC) e três níveis de suplementação com leveduras vivas (0,8 ou 40x10⁹ UFC/animal/dia)

Itens	Dieta 0			Dieta 0,8			EPM	P-valor		
	0	8	40	0	8	40		Dieta	Trt	Dt*T
pH ruminal ¹	6,71	6,63	6,66	6,48	6,47	6,47	0,05	<0,01	0,30	0,60
pH ruminal, AAC ²	66,6	65,7	66,1	64,3	64,1	64,3	0,5	<0,01	0,45	0,70
NH ₃ ruminal, mg/dl ³	9,5	9,8	9,7	9,1	9,0	8,9	0,4	0,06	0,95	0,90
AGCC, mM	89,7 ^{bc}	97,0 ^a	87,5 ^c	95,8 ^{ab}	98,8 ^a	99,7 ^a	2,6	<0,01	0,09	0,11
-----% Total-----										
Acetato ⁵	70,4	70,9	70,9	68,0	68,3	68,2	0,4	<0,01	0,86	0,88
Propionato	17,1	17,1	17,0	16,9	16,7	17,4	0,3	0,64	0,55	0,42
Butirato ⁶	8,5	8,8	8,6	11,1	12,0	10,8	0,4	<0,01	0,17	0,75
Valerato	0,93	0,95	0,95	1,0	1,02	0,98	0,02	<0,01	0,74	0,48
AGCR ⁷	2,99	2,72	2,68	3,03	2,87	2,73	0,10	0,27	0,01	0,83
Ac:Pr ⁸	4,11	4,15	4,16	4,04	4,09	3,94	0,84	0,07	0,70	0,52

Fonte: (OLIVEIRA, C. A. de, 2017)

¹pH ruminal foi mensurado 0, 2, 5, e 10 h após alimentação. Interação Trat x tempo ($p=0,53$), Interação Dieta x tempo ($p<0,01$). ²Área abaixo da curva para pH ruminal, é estimado pelo método de aproximação integral. ³Interação dieta x tempo ($P < 0,01$). ⁴Soma total dos ácidos graxos de cadeia curta. Efeito linear para Dieta 0 ($P = 0,12$). Efeito linear para Dieta0,8 ($P = 0,34$). ⁵Interação Trat X Tempo ($P = 0,09$). ⁶Interação Trat X Tempo ($P = 0,12$). ⁷Ácidos graxos de cadeia ramificada: soma do iso-butirato e iso-valerato. Efeito linear do Trat ($P < 0,01$) ⁸Proporção Acetato:Propionato.

Houve efeito de interação Tempo x Trat para as proporções molares de acetato e butirato no rúmen (Figura 2). A dose 8 aumentou a proporção de butirato 5h após a alimentação ($P = 0,03$ - Figura 2). A suplementação com levedura também diminuiu linearmente a proporção de ácidos graxos de cadeia ramificada no fluído ruminal ($P < 0,01$) - Tabela 5.

Figura 2 - Decomposição da interação do Tempo x Tratamento para: A) Proporção molar de acetato pelo total de AGCC; B) Proporção molar do butirato pelo total de AGCC

Fonte: (OLIVEIRA, C. A. de, 2017)

Não houve efeito da levedura na concentração de Nitrogênio amoniacal (N-NH_3) ou de lactato no rúmen (Tabela 6). As concentrações de lactato no rúmen foram muito baixas, como era de se esperar nestas dietas, e não houve efeito da adição de concentrado no lactato ruminal medida 5h após a alimentação ($P = 0,36$, Tabela 6).

Tabela 6 - Amônia ruminal e concentração de lactato de bovinos canulados ingerindo dois níveis de concentrado (0 ou 0,8% do PC) e três níveis de suplementação com leveduras vivas (0,8 ou 40x10⁹ UFC/animal/dia)

Itens	Dieta 0			Dieta 0,8			EPM	P-valor		
	0	8	40	0	8	40		Dieta	Trt	Diet*Trt
N-NH ₃ , mg/dl ¹	9,5	9,8	9,7	9,1	9,0	8,9	0,4	0,06	0,95	0,90
Lactato, mM ²	0,04	0,04	0,06	0,04	0,07	0,05	0,02	0,36	0,13	0,23

Fonte: (OLIVEIRA, C. A. de, 2017)

¹ Amostras coletadas às 0 e 5h após alimentação. Tempo x Trat ($P = 0,79$) e Tempo x Dieta ($P < 0,01$).

² Amostras coletadas 5h após a alimentação.

Houve efeito de interação tempo x dieta para a concentração de amônia ruminal ($P < 0,01$), em que a suplementação de concentrado na Dieta 0,8 diminuiu os níveis de amônia ruminal 5h após a alimentação, sem efeito no tempo 0h (Figura 3).

Figura 3 - Decomposição da interação Tempo X Trat para concentração de amônia no rúmen

Fonte: (OLIVEIRA, C. A. de, 2017)

Para a digestibilidade da FDN (DFDN), avaliada por incubação *in situ*, foi observado que as dietas com concentrado (0,8% do PC) não diminuíram a DFDN após 24 e 48 h (Tabela 7). Em geral, houve efeito linear com a suplementação de levedura, aumentando a DFDN após 24h de incubação ($P = 0,02$). O efeito linear da levedura em 24h-DFDN foi significativo para silagem de milho ($P = 0,03$) e feno de Tifton-85 ($P = 0,04$). Após 48 h de incubação, houve efeito linear da suplementação de levedura somente para DFDN no capim-mombaça ($P = 0,02$), e houve interação entre levedura e dieta sobre a digestibilidade *in situ* as 48 h para capim Marandu ($P = 0,03$), apresentando também efeito linear para tratamento ($P = 0,11$).

Tabela 7 - Digestibilidade *in situ* da fibra em detergente neutro de diferentes forragens após 24h ou 48 h de incubação ruminal

Itens	Dieta 0			Dieta 0,8			EPM	P-valor		
	0	8	40	0	8	40		Dieta	Trt	Diet*Trt
	-----DFDN-24 h-----									
Todas forragens	55,1	54,6	57,3	55,3	54,2	55,3	0,9	0,35	0,18 ¹	0,45
Sil. Milho	53,7	52,1	56,7	54,8	50,5	55,3	1,3	0,58	<0,01 ²	0,53
Feno de Tifton-85	43,0	43,6	47,4	42,9	43,3	44,9	1,6	0,46	0,11 ³	0,72
Capim-Mombaça	57,2	56,6	59,4	58,5	58,8	56,0	1,6	0,98	0,99	0,20
Capim-Marandu	65,2	65,1	64,6	63,6	62,2	63,4	1,5	0,13	0,88	0,84
	-----DFDN-48 h-----									
Todas forragens	63,4	62,8	64,5	62,3	63,0	63,6	0,8	0,36	0,26	0,70
Sil. Milho	62,2	61,4	62,4	60,9	62,6	63,1	1,1	0,84	0,56	0,49
Feno de Tifton-85	55,6	55,5	56,1	56,4	55,4	55,6	1,3	0,96	0,90	0,88
Capim-Mombaça	65,4	66,2	68,0	64,8	65,0	67,8	1,2	0,48	0,06 ⁴	0,92
Capim-Marandu	72,5	71,2	73,6	70,3	73,1	72,0	1,1	0,38	0,21	0,03 ⁵

Fonte: (OLIVEIRA, C. A. de, 2017)

¹Efeito linear para dieta 0 ($P = 0,02$). ²Efeito linear do Trat ($P = 0,03$). ³Efeito linear do Trat ($P = 0,04$). ⁴Efeito linear do Trat ($P = 0,02$). ⁵Efeito linear do Trat ($P = 0,11$).

Quando avaliado pela incubação *in situ* a digestibilidade da MS (DMS), mostrou que as dietas com concentrado (0,8% de PC) não diminuiram a DMS após 24 e 48 h de incubação (Tabela 8). Porém, houve efeito linear com a inclusão de levedura, aumentando a DMS após 24h de incubação ($P = 0,14$). Houve efeito da inclusão de levedura para DMS às 24h para silagem de milho ($P < 0,01$) que também apresentou efeito linear significativo ($P = 0,03$) e para o feno de Tifton-85 ($P = 0,04$).

Tabela 8 - Digestibilidade *in situ* da matéria seca de diferentes forragens após 24h ou 48 h de incubação ruminal

Itens	Dieta 0			Dieta 0,8			EPM	P-valor		
	0	8	40	0	8	40		Dieta	Trt	Diet*Trt
-----DMS-24 h-----										
Todas forragens	69,4	69,3	71,0	69,5	69,0	69,5	0,7	0,33	0,24 ¹	0,48
Sil. Milho	74,9	74,1	76,6	75,5	73,2	75,8	0,8	0,58	<0,01 ²	0,53
Feno de Tifton-85	56,7	57,2	60,0	56,6	56,9	58,2	1,2	0,46	0,11 ³	0,72
Capim-Mombaça	70,0	69,7	71,6	71,0	71,2	69,2	1,1	0,98	0,99	0,20
Capim-Marandu	75,4	75,3	74,9	74,2	73,3	74,1	1,1	0,13	0,88	0,84
-----DMS-48 h-----										
Todas forragens	75,2	74,9	76,0	74,5	74,9	75,3	0,5	0,31	0,24 ⁴	0,70
Sil. Milho	79,5	79,1	79,6	78,8	79,7	80,0	0,6	0,85	0,56	0,49
Feno de Tifton-85	66,3	66,2	66,7	66,9	66,1	66,3	1,0	0,96	0,90	0,88
Capim-Mombaça	75,8	76,4	77,6	75,4	75,6	77,5	0,8	0,48	0,06 ⁵	0,92
Capim-Marandu	80,5	79,6	81,3	79,0	81,0	80,2	0,6	0,38	0,21	0,03 ⁶

Fonte: (OLIVEIRA, C. A. de, 2017)

¹Efeito linear de Trat ($p=0,14$); Efeito linear para Dieta0 ($p=0,06$); Efeito linear para Dieta0,8 ($p=0,83$).

²Efeito linear para dieta0 ($p=0,03$). ³Efeito linear para dieta0 ($p=0,04$). ⁴Efeito linear para dieta0 ($p=0,10$). ⁵efeito linear para dieta0 ($p=0,02$). ⁶Efeito linear de Trat ($p=0,11$); Efeito linear para Dieta0 ($p=0,14$); Efeito linear para Dieta0,8 (0,42).

Após 48 h de incubação, não houve efeito linear para a inclusão de levedura. Ocorrendo interação entre levedura e dieta sobre a digestibilidade *in situ* as 48 h para capim Marandu ($P = 0,03$).

A alimentação com concentrado aumentou a massa ruminal de MS e FDNi ($P < 0,05$ - Tabela 9). A inclusão de levedura também aumentou linearmente a massa ruminal de MS e FDN, especialmente na dieta 0 ($P = 0,03$ - Tabela 9), mas não foi observado efeito sobre a massa ruminal de FDNi.

Tabela 9 - Tamanho do pool, conteúdo de nutrientes e cinética ruminal de bovinos canulados ingerindo dois níveis de concentrado (0 ou 0,8% do PC) e três níveis de suplementação com leveduras vivas (0,8 ou 40x10⁹ UFC/animal/dia)

com leveduras vivas (0,8 ou 40x10 ⁹ CFU Gramina/dia)										
Itens	Dieta 0			Dieta 0,8			EPM	P-valor		
	0	8	40	0	8	40		Dieta	Trt	Diet*Trat
	-----Massa ruminal, kg-----									
MS	4,9	5,8	6,0	5,9	6,0	6,4	0,4	0,01	0,02	0,22 ¹
FDN	3,7	4,4	4,5	4,3	4,3	4,7	0,3	0,06	0,02	0,16 ²
FDNi	2,4	2,8	2,7	2,9	2,8	3,0	0,2	0,04	0,33	0,20
	-----Cinética ruminal, %/h-----									
Turnover FDN	5,4	4,8	5,1	4,8	5,5	5,3	0,2	0,79	0,89	0,04
kp FDN	4,9 ^a	4,4 ^a	4,7 ^a	3,7 ^b	4,6 ^a	4,5 ^a	0,2	0,05	0,42	0,03

Fonte: (OLIVEIRA, C. A. de, 2017)

¹Linear para Dieta 0 ($p=0,03$), linear para dieta 0,8 ($P = 0,16$). ²Linear para dieta 0 ($P = 0,03$), linear para dieta 0,8 ($P = 0,10$). ³Linear para dieta 0 ($P = 0,97$), linear para dieta 0,8 ($P = 0,11$)

Em relação à cinética da fibra no rúmen, observou-se um efeito significativo de interação entre Dieta x Trat para o *turnover* da FDN e para a taxa de passagem da FDN (k_p) ($P = 0,02$ - Tabela 9). Não houve efeito da inclusão de levedura sobre a taxa de *turnover* da FDN na Dieta 0 e Dieta 0,8 ($P > 0,05$ - Tabela 9). A alimentação com concentrado para os animais diminuiu a taxa de passagem da FDN (k_p); contudo, a inclusão de levedura aumentou k_p na Dieta 0,8, sem efeito na Dieta 0. A taxa de passagem da FDN é em função da ingestão de FDNi e da sua retenção na massa do rúmen.

O aumento do nível de concentrado na dieta diminuiu a população relativa de *F. succinogenes* ($P = 0,02$, Tabela 10) e de *B. fibrisolvens* ($P = 0,03$ - Tabela 10), e aumentou a população de *R. albus* ($P < 0,01$, Tabela 10).

Tabela 10 - População relativa de bactéria ruminal de bovinos canulados ingerindo dois níveis de concentrado (0 ou 0,8% do PC) e três níveis de suplementação com leveduras vivas (0,8 ou 40x10⁹ UFC/animal/dia)

Itens	Dieta 0			Dieta 0,8			EPM	P-valor		
	0	8	40	0	8	40		Dieta	Trt	Diet*Trt
Bac.fibrolíticas	1,00	0,87	0,98	0,81	0,90	0,91	0,08	0,23	0,72	0,34
<i>F.succinogenes</i>	1,00	1,22	1,08	0,89	0,71	0,87	0,19	0,02	0,95	0,32
<i>R. albus</i>	1,00	0,91	1,23	1,44	1,63	1,37	0,27	<0,01	0,86	0,33
<i>B. fibrisolvens</i>	1,00 ^a	0,45 ^b	0,63 ^{ab}	0,36 ^b	0,45 ^b	0,48	0,21	0,03	0,44	0,10
<i>R. flavefaciens</i>	1,00	0,98	0,95	0,92	0,96	1,01	0,23	0,92	0,98	0,91

Fonte: (OLIVEIRA, C. A. de, 2017)

A suplementação de levedura não teve efeito sobre a população ruminal de *F. succinogenes*, *R. albus* e de *R. flavefaciens* e a dose de 8 reduziu a população relativa de *B. fibrisolvens* apenas na dieta 0 ($P = 0,02$ Tabela 10). *B. fibrisolvens* foi a espécie celulolítica menos abundante no presente estudo, com uma população relativa menor que a população de *F. succinogenes* (Figura 4).

Figura 4 - Abundância relativa de bactérias fibrolíticas no presente estudo. Os valores são expressos em relação à população de *B. fibrisolvens*

Fonte: (OLIVEIRA, C. A. de, 2017)

7 DISCUSSÃO

O aumento da inclusão de levedura nas dietas de bovinos de corte aumentou linearmente a ingestão de MS e FDN, levando ao aumento da massa ruminal, concomitante ao efeito de interação para *turnover* da FDN e taxa de passagem. Sabe-se que em dietas com elevada inclusão de volumoso o grande desafio é o aumento da ingestão de matéria seca, já que os ruminantes possuem dois mecanismos regulatórios de limitação de consumo: enchimento físico do rúmen e metabólico-hormonal. O físico é devido à distensão da parede rúmen – retículo (ALLEN, 2000), ocorrendo inibição do CMS antes que seja atendida a demanda total de energia do animal. Este mecanismo de enchimento, é o principal fator de regulação do consumo principalmente de dietas à base de forragem. Sobre o efeito metabólico-hormonal, a ingestão é proporcional à demanda energética para a produção, dessa forma, com a melhoria do valor nutritivo da dieta, ocorre um aumento do consumo, até que o ponto estabelecido pela demanda nutricional e fisiológica seja alcançado. Onde, os ácidos resultantes da fermentação ruminal limitam o CMS, devido o aumento da osmolaridade no retículo-rúmen, principalmente pelo o efeito do propionato (ALLEN, 2000), em que o mecanismo pelo qual isso ocorre seja pela teoria da oxidação hepática, onde o fígado seja um sensor primário do estado energético dos ruminantes, metabolizando vários combustíveis derivados da dieta, através da oxidação hepática desses combustíveis, sinais são enviados para os centros de alimentação no cérebro estimulando ou inibindo a alimentação, dependendo do estado energético do animal. (ALLEN, 2014).

Em sistemas de pastejo ou em dietas ricas em alimentos volumosos, o mecanismo que mais predomina é o de limitação física, já que a maior parte da sua ingestão são fibras longas, geralmente de baixa digestibilidade, que requerem mais tempo de permanência no rúmen do animal para serem degradadas. As bactérias que degradam as fibras longas ou de baixa digestibilidade, tem ampliação do tempo de colonização “*lag time*”, que reflete negativamente sobre o percentual de desaparecimento da fibra em períodos fixos de tempo após o início da atividade microbiana, contribuindo, efetivamente, para o efeito de enchimento ruminal pelo excesso de FDN no rúmen (VAN SOEST, 1994). Desta forma, quando há aumento da

taxa de digestão dessas fibras, há maior taxa de passagem, e consequentemente aumento da ingestão de MS e FDN. Este efeito foi observado no presente estudo com a inclusão de doses crescentes de leveduras vivas, que também influenciou o ambiente ruminal, evitando quedas do mesmo com a inclusão a suplementação energética, proporcionando ambiente ruminal mais adequado para o melhor desenvolvimento e ação de bactérias celulolíticas, levando assim a maior digestão das fibras.

As leveduras, como a *S. cerevisiae* vem sendo utilizada na alimentação de ruminantes como modulador da fermentação ruminal, agindo basicamente de duas formas: A primeira delas seria fornecimento de fatores estimulatórios para bactérias ruminais e colonização de fungos (CHAUCHEYRAS et al., 1995, DURAND et al., 2008), como os ácidos dicarboxílicos, os ácidos orgânicos, as vitaminas do complexo B e os aminoácidos, que favorecerem o crescimento e a atividade de bactérias consumidoras de lactato, prevenindo assim flutuações bruscas de pH ruminal (CHAUCHEYRAS-DURAND; WALKER; BACH, 2008). A segunda forma de atuação das leveduras, se dá pelo sequestro de oxigênio que entra no rúmen pela alimentação e ingestão de água, criando um ambiente ainda mais anaeróbio, o que é favorável para o desenvolvimento de bactérias celulolíticas, que são anaeróbias estritas, estimulando sua proliferação e sua fixação às partículas de forragem e diminuindo o tempo de latência no processo de celulólise (CHAUCHEYRAS-DURAND; WALKER; BACH, 2008). Devido à melhora no ambiente ruminal pela ação das leveduras, o crescimento bacteriano é favorecido, além de melhora da digestão de fibras, há também, aumento do fluxo de proteína microbiana para o duodeno (YOON; STERN, 1996; HRISTOV et al., 2010).

Quando adicionado aditivos que melhoram o ambiente ruminal como as leveduras, tornando-o propício para o crescimento e melhor eficiência para esses microrganismos, estes conseguem digerir as fibras mais rapidamente, diminuindo os efeitos do enchimento ruminal, proporcionando aumento no consumo destes animais. Os alimentos que são ingeridos possuem dois caminhos de saída do rúmen, ou por absorção (digestão) ou por desaparecimento do rúmen (fração indigestível ou não digerida), quando há melhora no ambiente ruminal para as bactérias celulolíticas, há maior eficiência, e estas degradam o alimento mais rápido, proporcionando maior taxa de renovação (*turnover*) consequentemente, maior taxa de passagem, já que as fibras

são mais rapidamente digeridas, o que concorda com os dados de cinética ruminal apresentados, onde com a adição de leveduras nas dietas de bovinos de corte juntamente com a suplementação energética, promoveu o aumento no *turnover* da FDN e da taxa de passagem.

Os valores de taxa de passagem não foram alterados no estudo, no entanto, no tratamento com a Dose 40, houve maior consumo comparado com o controle, mostrando que no mesmo período o animal ingeriu mais alimento neste tratamento, evidenciando o aumento na massa ruminal de MS e FDN, devido a adição crescente das leveduras, e o efeito no ambiente ruminal que estas causam na digestibilidade de fibras aumentando a taxa de digestão destas.

O efeito de melhora na digestibilidade da fibra pode ser observado na digestibilidade da FDN durante 24 h de incubação, para as fontes: silagem de milho e feno de Tifton-85. Não havendo diferenças para os diferentes níveis de inclusão de concentrado. Durante as 48 h de incubação, houve uma tendência de aumento na digestibilidade somente para o capim Mombaça. Sugere-se que esses efeitos sejam em decorrência da estabilidade do pH ruminal, tornando o processo de celulólise mais eficiente, quando adicionado *S. cerevisiae*.

Os mecanismos que as leveduras realizam para melhorar esse ambiente ruminal ainda são pouco elucidados, estes mecanismos podem estar ligados ao consumo de oxigênio e a capacidade destas de estimular o crescimento de microrganismos consumidores de ácido láctico, evitando assim quedas de pH, já que as bactérias celulolíticas são mais sensíveis a pH mais baixos, tornando-as menos eficientes. A adição de leveduras vivas em dietas de bovinos de corte ingerindo alta concentração de fibras foi eficiente em manter pH ruminal acima de 6,0, mesmo com suplementação energética com consumo de 0,8% PC.

As bactérias celulolíticas são mais eficientes em pH ruminal mais estável (>6), as bactérias produtoras de ácido láctico tem menor ação, e as utilizadoras de lactato como a *Meghasphaera elsdenii*, são mais eficazes, reduzindo o acúmulo deste ácido, com isso evita-se quedas bruscas de pH, mantendo a neutralidade constante e pH ótimo no rúmen, estimulando o crescimento de bactérias celulolíticas, proporcionando maior digestibilidade da fibra e maior fluxo de proteína microbiana para o duodeno, em decorrência do maior crescimento bacteriano, levando a uma maior taxa de digestão de fibras, principalmente na fração de FDA. Estas frações correspondem a

maior parte das forrageiras brasileiras, devido a falta de manejo destas pastagens e investimentos com adubações e correções de solo, diminuindo a qualidade das pastagens.

Não houve aumento das bactérias celulolíticas aqui estudadas, no entanto houve aumento expressivo na população de bactérias *R. albus*, que produz enzimas hidrolíticas extracelulares que quebram celulose e hemicelulose, enquanto não podem quebrar a pectina e o amido (THURSTON; DAWSON; STROBEL, 1993). No entanto, podem se desenvolver na presença de glicose, quando não há disponibilidade de celobiose, em ambientes contendo tanto glicose como celobiose, estas têm preferência por este substrato (THURSTON; DAWSON; STROBEL, 1993), mostrando que com a maior disponibilidade deste substrato fibroso, houve maior proliferação desta bactéria, colaborando para maior aumento da digestão de fibras. A população de bactérias celulolíticas aqui estudada, não teve aumento expressivo, talvez por esses animais já manterem essas populações altas devido as dietas serem mais volumosas, no entanto, com a melhora do ambiente ruminal causado pela adição das leveduras, essas populações possivelmente se tornaram mais efetivas, com menor tempo de colonização, causando o efeito no aumento da digestibilidade das fibras.

Em bovinos confinados alimentados com silagem de cana-de-açúcar e diferentes níveis de concentrado (60% e 80%), a suplementação com *S. cerevisiae* promoveu mudanças na fermentação ruminal associada com a melhor digestibilidade da fibra, em que os grupos suplementados com *S. cerevisiae* mantiveram pH mais elevados em comparação com os grupos controle. Além disto, houve aumento de acetato e na relação acetato:propionato para os grupos suplementados com a levedura (SOUSA et al. 2014). Em outro estudo foi demonstrado que a suplementação diária com *S. cerevisiae* aumentou a digestibilidade da fibra de forragens em novilhos mantidos em sistema de pastejo em gramíneas tropicais, e este efeito foi relacionado ao aumento da população de *Ruminococcus flavefaciens* no rúmen (SOUSA et al., 2015), diferente dos dados obtidos no presente estudo, em que a inclusão da levedura não aumentou a população de *R. flavefaciens*, porém, houve notório aumento na população de *R. albus*.

A suplementação com *S. cerevisiae* tem muitos benefícios, principalmente relacionados com o ambiente ruminal, entretanto os mecanismos de ação e os benefícios efetivos para bovinos de corte, ainda não estão claramente estabelecidos,

apesar do grande número de estudos realizados avaliando os efeitos da suplementação com as leveduras, os resultados ainda são inconclusivos, devido a grande variação das respostas. Uma causa provável dessa variação nos resultados, são as diferentes doses que são utilizadas, desta forma há a necessidade de padronizar as doses utilizadas nas pesquisas, no intuito de fornecer resultados consistentes, aos pesquisadores, nutricionistas e produtores, para se entender melhor os mecanismos de ação deste produto e seus benefícios.

CONCLUSÕES

8 CONCLUSÕES

Diante dos resultados apresentados, concluímos que a suplementação com doses crescentes de *S. cerevisiae* promoveu estabilidade no pH ruminal, em consequência houve aumento linear no consumo e digestibilidade ruminal da fibra, porém este efeito não pode ser explicado por mudanças na população de bactérias celulolíticas no rúmen. Sobre a inclusão de 0,8% do PC de concentrado, esta aumentou o consumo de MS e FDN, melhorando o desempenho dos animais, no entanto houve efeito sobre o ambiente ruminal, e na redução da população de *F. succinogenes*.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

AKIN, D. E. Histological and physical factors affecting digestibility of forages. **Agronomy of Journal**, v. 81, n. 1, p. 17-25, 1989.

AKIN, D. E.; AMOS, H. E.; BARTON, F. E.; BURDICK, D. Rumen microbial degradation of grass tissue by scanning electron microscopy. **Agronomy of Journal**, v. 65, n. 5, p. 825-828, 1973.

ALLEN, M. S. Drives and limits to feed intake in ruminants. **Animal Production Science**, v.54, p. 1513-1524, 2014.

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.

ANUALPEC 2013: anuário da pecuária brasileira. São Paulo: Instituto FNP, 2013.

ASSOCIATION OF ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official methods of analysis**. Washington: AOAC, D.C. 2000.

BARBOSA, F. A.; FARIA, G. A.; VILELA, H. Leveduras vivas na alimentação de bovinos. **Bioscience journal**, v. 20, n. 1, p. 143-150, 2004.

BEAUCHEMIN, K. A.; RODE, L. M.; YANG, W. Z.; NEWBOLD, C. J. Enzymes and direct fed microbials in diets for dairy cows. In: TRI-STATE DAIRY NUTRITION CONFERENCE, 2000, Fort Wayne. **Proceedings...** Columbus: [s.n.], 2000. p. 85-95.

BEESON, W. M.; PERRY, T. W. Balancing the nutritional deficiencies of roughages for beef steers. **Journal of Animal Science**, v. 11, p. 501-515, 1952.

BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal-SP: Funep, 2006, 583 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Assessoria de Gestão Estratégica. **Plano mais pecuária/Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Brasília: MAPA/ACS, 2014. 32 p.

BUENO, A. A. O. **Características estruturais do dossel forrageiro, valor nutritivo e produção de forragem em pastos de capim-Mombaça submetidos a regimes de desfolhação intermitente**. 2003. 124 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2003.

BUXTON, D. R.; REDFEARN, D. D. Plant limitations to fiber digestion and utilization. **Journal Nutrition**, v. 127, p. 814-818, 1997.

CABRERA, E. J. I.; MENDONZA, M. G. D.; ARANDA, I. E.; GARCIA-BOJALIL, C.; BARCENA, G. R.; RAMOS, J. J. A. *Facchavomyces cevevisiae* and nitrogenous supplementation in growing steers grazing tropical pastures. **Animal Feed Science Technology**, Amsterdam, v. 83, n. 1, p. 49-55, 2000.

CALLAWAY, E. S.; MARTIN, S. A. Effects of a *Facchavomyces cevevisiae* culture on ruminal bacteria that utilize lactato and digest cellulose. **Journal Dairy Science**, Savoy, v. 80, n. 9, p. 2035-2044, 1997. Supplement 1.

CHAUCHEYRAS, F.; FONTY, G.; BERTIN, G.; GOUET, P. In vitro H₂ utilization by a ruminal acetogenic bacterium cultivated alone or in association with na *archea methanogen* is stimulated y a probiotic strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 61, p. 3466-3469, 1995.

CHAUCHEYRAS–DURAND, F.; WALKER, N. D.; BACH, A. Effects of active dry yeasts on the rumen microbial ecosystem: past, present and future. **Animal Feed Science and Technology**, v. 145, p. 5-26, 2008.

COSTA, D. F. A. **Respostas de bovinos de corte à suplementação energética em pastos de capim-marandu submetidos a intensidades de pastejo rotativo durante o verão**. 2007. 24 f. Dissertação (Mestrado Ciência Animal e Pastagens) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba – SP, 2007.

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

DAWSON, K. A. Some limestone in our understanding of yeast culture supplementation in ruminants and their implications in animal productions systems. In: ANNUAL SYMPOSIUM ON BIOTECHNOLOGY IN THE FEED INDUSTRY, 16., 2000, Nottingham, 2000. **Proceedings...** Nottingham: Nottingham University, 2000. p. 473-486.)

DESNOYERS, M.; GIGER-REVERDIN, S.; BERTIN, G.; DUVAUX-PONTER, C.; SAUVANT, D. Meta-analysis of the influence of *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on ruminal parameters and Milk production of ruminants. **Journal of Animal Science**, v. 92, p. 1620-1632, 2009.

DETMANN, E. Fibra na nutrição de novilhas leiteiras. In: PEREIRA, E. S.; PIMENTEL, P. G.; QUEIROZ, A. C. de; MIZUBUTI, I. Y. (Ed.). **Novilhas leiteiras**. Fortaleza: Imprece, 2010.

DETMANN, E.; PAULINO, M. F.; VALADARES FILHO, S. C. Avaliação nutricional de alimentos ou de dietas? Uma abordagem conceitual. In: SIMPÓSIO DE PRODUÇÃO DE GADO DE CORTE, 6., 2008, Viçosa, **Anais...** Viçosa: DZO/UFV, 2008. p. 21-52.

DETMANN, E.; VALENTE, E. E. L.; BATISTA, E. D.; HUHTANEN, P. An evaluation of the performance and efficiency if nitrogen utilization in cattle fed tropical grass pastures with supplementation. **Livestock Science**, v. 162, p. 141-153, 2014.

DIFANTE, G. S. **Desempenho de novilhos, comportamento ingestivo e consumo voluntário em pastagem de *Panicum maximum* Jacq. cv. Tanzânia**. 2005. 74 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2005.

ECKLES, C. H.; WILLIAMS, V. M.; WILBUR, J. W.; PALMER, L. S.; HARSHAW, H. M. Yeast as supplementary feed for calves. **Journal of Dairy Science**, v. 7, p. 421-439, 1924.

ERASMUS, L. J.; COERTZE, M. N.; LEVITON, M. N.; CHEVAUX, E. A meta-analysis of the effect of monensin or live yeast or a combination thereof on performance of beef cattle. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 87, p. 281, 2009. Supplement, 87.

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

FERRAZ, J. B. S.; FELÍCIO, P. E. Production systems – an example from Brazil. **Meat Science**, v. 84, p. 238-243, 2010.

FERREIRA, L. H.; SIQUEIRA, G. R.; POLETO, C. L. Terminação de bovinos de corte em confinamento com dietas contendo leveduras vivas (*Saccharomyces cerevisiae*). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 46., 2009, Maringá, **Anais...** Maringá: SBZ, 2009.

FULTON, W. R.; KLOPFENSTEIN, T. J.; BRITTON, R. A. Adaptation to high concentrate diets by beef cattle. 2. Effect of ruminal pH alteration on rumen fermentation and voluntary intake of wheat diets. **Journal of Animal Science**, v. 49, p. 785-789, 1979.

HASSAN, S. M.; NEWBOLD, C. J.; EDWARDS, I. E.; TOPPS, J. H.; WALLACE, R. J. Effect of yeast culture on rumen fermentation, microbial protein flow from the rumen and live-weight gain in bulls given high cereal diets. **Animal Science**, Neston, v. 62, n. 2, p. 43-48, 1996.

HODGSON, J. **Grazing management: science into practice**. Inglaterra: Ed. Longman Scientific & Technical, 1990. 203 p.

HRISTOV, A. N.; BARGA, G.; CASSIDY, T.; LONG, M.; HEYLER, K.; KARNATI, S. K.; CORL, B.; HOVDE, C. J.; YOON, I. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on ruminal fermentation and nutrient utilization in dairy cows. **Journal Dairy Science**, v. 93, p. 682-692, 2010.

KAMALAMMA, U.; KRISHNAMOORTHY, U.; KRISHNAPPA, P. Effect of feeding yeast culture (Yea-sacc1026) on rumen fermentation in vitro and production performance in crossbred dairy cows. **Animal Feed Science Technology**, v. 57, n. 3, p. 247-256, 1996.

KOIKE, S.; KOBAYASHI, Y. Development and use of competitive PCR assays for the rumen cellulolytic bacteria: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefaciens*. **Fems Microbiology Letters**, v. 204, n. 2, p. 361-366, 2001.

MARTIN, C.; BROSSARD, L.; DOREAU, M. Mécanismes d'apparition de l'acidose ruminale latente et conséquences physiopathologiques et zootechniques. **Animal Production**, v. 19, p. 93-108, 2006.

MIRANDA, L. F.; CARVALHO, M. A. G.; TAROUÇO, J. U.; TAVARES, F. S.; ZANINI, S. F.; RIBEIRO, G. V.; LOUREIRO NETTO, A. C.; MATTOS, F. M.; GIUBERT, G. R.; PAULINO NETO, D.; SOARES JÚNIOR, E. Desempenho e características das carcaças de novilhos Simental suplementados com probióticos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38., 2001, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 2001. p. 1035-1037.

MONNERAT, J. P. I.; PAULINO, P. V. R.; DUARTE, M. S.; et al. Influência da levedura na fermentação ruminal de bovinos de corte. In: INTERNACIONAL CONGRESSO DE ZOOTECNIA – ZOOTECH, 10., 2008, João Pessoa, **Anais...** [S.l]: ZOOTECH, 2008.

MOTT, G.; MOORE, J. E. Forage evaluation techniques in perspective. In: NATIONAL CONFERENCE ON FORAGE EVALUATION AND UTILIZATION, 1970, Nebraska. **Proceedings...** Lincoln, Nebraska: Center of Continuing Education, 1970. p. 1-10.

MULLAHEY, J. J.; WALLER, S. S.; MOORE, K. J.; MOORE, K. J.; MOSER, L. E.; KLOPFENSTEIN, T. J. In situ ruminal protein degradation of switchgrass and smooth bromegrass. **Agronomy Journal**, v. 84, p. 183-188, 1992.

MUTSVANGWA, T.; EDWARDS, I. E.; TOPPS, J. H.; PATERSON, G. F. M. The effects of dietary inclusion of yeast culture (Yea-Sacc) on patterns of rumen fermentation, food intake and growth of intensively fed bulls. **Animal Production**, Edinburgh, v. 55, n. 1, p. 35-40, 1992.

MUYZER G.; DE WAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain

reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied Environmental Microbiology**, v. 59, p. 695-700, 1993.

NEWBOLD, C. J.; WALLACE, R. J.; CHEN, X. B. Different strains of *Saccharomyces cerevisiae* differ in their effects on ruminal bacterial numbers in vitro and in sheep. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 73, p. 1811-1818, 1995.

NEWBOLD, C. J.; WALLACE, R. J.; McINTOSH, F. M. Mode of action of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a feed additive for ruminants. **British Journal of Nutrition**, London, v. 76, n. 2, p. 249-261, 1996.

NISBET, D. J.; MARTIN, S. A. Effect of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on lactate utilization by the ruminal bacterium *Selenomonas ruminantium*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 69, p. 4628-4633, 1991.

NOCEK, J. E. Bovine acidosis: implications of laminitis. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 1005, 1997.

PACIULLO, D. S. C. Características anatômicas relacionadas ao valor nutritivo de gramíneas forrageiras. **Revista Ciência Rural**, v. 32, n. 2, p. 357-364, 2002.

PARRA, I.; DeCONSTANZO, A. Influence of yeast culture supplementation during the initial 23 d on feed, or throughout a 59-d feeding period on performance of yearling bulls. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 70, p. 287, 1992. Supplement 1.

PATRA, A. K. The use of live yeast products as microbial feed additives in ruminant nutrition. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 7, p. 366-375, 2012.

PAULINO, M. F.; DETMANN, E.; VALENTE, E. E. L.; BARROS, L. V. Nutrição de bovinos em pastejo. In: SYMPOSIUM ON STRATEGIC MANAGEMENT OF PASTURE, 4., 2008, Viçosa, Brazil. **Proceedings...** Viçosa, 2008. p. 131-169.

PEREIRA, E. S.; QUEIROZ, A. C.; PAULINO, M. F.; CECON, P. R.; VALADARES FILHO, S. C.; MIRANDA, L. F.; ARRUDA, A. M. V.; FERNANDES, A. M.; CABRAL, L. S. Fontes nitrogenadas e uso de *Fachavomyces cevevisiae* em dietas à base de cana-de açúcar para novilhos: consumo, digestibilidade, balanço nitrogenado e parâmetros ruminais. **Revista Brasileira Zootecnia**, Viçosa, v. 30, n. 2, p. 563-572, 2001.

POPPI, D.; McLENNAN, S. R. Otimizando o desempenho de bovinos em pastejo com suplementação protéica e energética. In: SIMPÓSIO SOBRE BOVINOCULTURA DE CORTE: REQUISITOS DE QUALIDADE NA BOVINOCULTURA DE CORTE. 6., 2007, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, Piracicaba, 2007. p. 163-181.

POPPI, D. P.; McLENNAN, S. R. Protein and energy utilization by ruminants at pasture. **Journal of Animal Science**, v. 73, p. 278-290, 1995.

PRESTON, T. R. Biological and chemical analytical methods. In: PRESTON, T. R. (Ed.). **Tropical animal feeding**: a manual for research workers. Rome: FAO, 1995. p. 191-264.

PRYCE, J. D. A modification of Barker-Summerson method for the determination of lactic acid. **Analyst**, v. 94, p.1151-1152, 1969.

RAMALHO, T. R. **Suplementação proteíca ou energética para bovinos recriados em pastagens tropicais**. 2006. 64 f. Dissertação (Mestrado Ciência Animal e Pastagens) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba – SP, 2006.

RENZ, F.; KOCH, A. Milk production with the active yeast concentrate “Astrol”. **Zuchtungskunde**, Berlin, v. 26, p. 228-304, 1954.

RINNE, M.; HUNTANEN, P.; JAAKKOLA, S. Digestive processes of dairy cows fed silages harvested at four stages of grass maturity. **Journal of animal Science**, v. 80, n. 7, p. 1986-1998, 2002.

RUGGIERI, A. C.; JANUSCKIEWICS, E. R.; CASAGRANDE, D. R.; REIS, R. A.; MAGALHAES, M. A. Morphological composition of marandu palisade grass pasture managed under different herbage allowance grazed by dairy cattle in rotational stocking system. In: JOINT ANNUAL ANIMAL SCIENCE MEETING; JOINT ADSA-ASAS ANNUAL MEETING, 2008, Indianapolis. **Proceedings...** Champaign, ASAS: American Society of Animal Science, 2008. v. 86, p. 372.

RUSSELL, J. B.; HINO, T. Regulation of lactate production in *Streptococcus bovis*: a spiraling effect that to rumen acidosis. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 68, p.1712-1721, 1985.

SIMAS, J. M.; NUSSIO, C. M. Uso de aditivos para vacas leiteiras. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL EM BOVINOCULTURA DE LEITE: NOVOS CONCEITOS EM NUTRIÇÃO, 2., Lavras, 2001. **Anais...** Lavras: UFLA- FAEPE, 2001. p. 285-298.

SNIFFEN, C. J.; O’CONNOR, J. D.; VAN SOEST, P. J. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 11, p. 3562-3577, 1992.

SOUSA, D. O.; ARCARI, M. A.; BIEHL, M. V.; PIRES, A. V.; CHEVAUX, E.; MARI, L. J.; SILVA, L. F. P. Effect of supplementing grazing cattle with *Saccharomyces cerevisiae* on fiber digestibility and rumen cellulolytic bacteria population. In: JAM ADSA ASAS ANNUAL MEET, 2015, Orlando. **Proceedings...** Orlando: [s.n.], 2015.

SOUSA, D. O.; VELASQUEZ, A. V.; OLIVEIRA, C. A.; SOUZA, J. M.; CHEVAUX, E.; MARI, L. J.; SILVA, L. F. P. Efeitos da suplementação com *Saccharomyces cerevisiae* viável sobre a digestibilidade da fibra e na microbiota ruminal em bovinos confinados. In: SIMPÓSIO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA EM NUTRIÇÃO E PRODUÇÃO ANIMAL - VNP, 8., 2014, Pirassununga. **Anais...** Pirassununga: FEZEA, 2014.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE - SAS. **Analysis system**: user's guide. Version 8. 6. ed. Cary, NC: SAS Institute, 2000.

TAJIMA, K.; AMINOV, R. I.; NAGAMINE, T.; MATSUI, H.; NAKAMURA, M.; BENNO, Y. Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. **Applied Environmental Microbiology**, v. 67, p. 2766–2774, 2001.

THURSTON, B.; DAWSON, K. A.; STROBEL, H. J. Cellobiose versus glucose utilization by the ruminal bacterium *Ruminococcus albus*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 59, p. 2631, 1993.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. New York: Cornell University Press, 1994. 476 p.

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

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

VIEIRA, B. R. **Manejo de pasto e suplementação nas águas e seus efeitos em sistemas de terminação de novilhas na seca**. 2011. 119 f. Tese (Doutorado Ciências Agrárias e Veterinárias) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Jaboticabal – SP, 2011.

WALDO, D. R.; SMITH, L. W.; COX, E. L. Model of cellulose disappearance from the rumen. **Journal of Dairy Science**, v. 55, n. 1, p. 125-129, 1972.

WALLACE, R. J. Manipulation of rumen function: ionophores, yeast culture and biotechnology. **Biotechnology in the Feed Industry**, v. 37, n. 1, p. 193-203, 1992.

WALLACE, R. J. Ruminant microbiology, biotechnology, and ruminant nutrition: progress and problems. **Journal Animal Science**, Savoy, v. 72, n. 11, p. 2992-3003, dec. 1994.

WALLACE, R. J.; NEWBOLD, C. J. Probiotics for ruminants. In: FULLER, R. (Ed.). **Probiotics, the scientific basis**. London: Chapman and Hall, 1994. p. 317-353.

WILSON, J. R.; JUNG, H. G.; BUXTON, D. R.; HATFIELD, R. D. Organization of forage plant tissues. In: JUNG, J. G.; BUXTON, D. R.; HATFIELD, R. D.; RALPH, J. (Ed.). **Forage cell wall structure and digestibility**. Madison: American Society of Agronomy, 1993. p. 1-32.

WILSON, J. R.; MERTENS, D. R. Cell wall accessibility and cell structure limitations to microbial digestion of forage. **Crop Science**, v. 35, p. 251-259, 1995.

YOON, I. K.; STERN, M. D. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* cultures on ruminal fermentation in dairy cows. **Journal Dairy Science**, v. 79, p. 411-417, 1996.

YU, Z.; MORRISON, M. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. **BioTechniques**, v. 36, p. 808-812, 2004.