



UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE ZOOTECNIA

Suplementação de enzima celulolítica (xilanase) em dietas a base de silagem de cana de açúcar ou milho para novilhas leiteiras: fermentação ruminal e síntese de proteína microbiana

Acadêmico(a): Anderson Pires Acosta

Dourados - MS

Agosta - 2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE ZOOTECNIA

Suplementação de enzima celulolítica (xilanase) em dietas a base de silagem de cana de açúcar ou milho para novilhas leiteiras: fermentação ruminal e síntese de proteína microbiana

Acadêmico(a): Anderson Pires Acosta
Orientador(a): Prof. Dr. Jefferson Rodrigues Gandra

Trabalho apresentado à Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Grande Dourados, como parte das exigências para obtenção do grau de bacharel em Zootecnia

Dourados - MS

Agosto - 2018

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

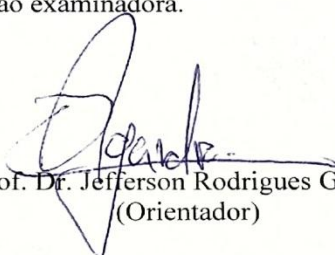
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Suplementação de enzima celulolítica (xilanase) em dietas a base de silagem de cana de açúcar ou milho para novilhas leiteiras: fermentação ruminal e síntese de proteína microbiana

AUTOR: Anderson Pires Acosta

ORIENTADOR: Prof. Dr Jefferson Rodrigues Gandra

Aprovado como parte das exigências para a obtenção do grau de bacharel em **ZOOTECNIA** pela comissão examinadora.



Prof. Dr. Jefferson Rodrigues Gandra
(Orientador)

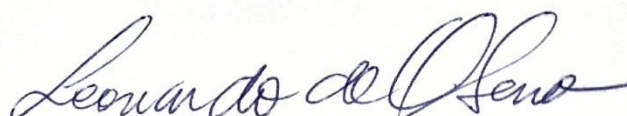


Prof Dr. Euclides Reuter de Oliveira



Zootecnista Andrei Zanini Escobar

Data de realização: 01 de agosto de 2018



Prof. Dr. Leonardo de Oliveira Seno

FICHA CATALOGRAFICA

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

A185s Acosta, Anderson Pires

SUPLEMENTAÇÃO DE ENZIMA CELULOLÍTICA (XILANASE) EM DIETAS A BASE DE SILAGEM DE CANA DE AÇUCAR OU MILHO PARA NOVILHAS LEITEIRAS: FERMENTAÇÃO RUMINAL E SÍNTESE DE PROTEÍNA MICROBIANA / Anderson Pires Acosta -- Dourados: UFGD, 2018.

39f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Jefferson Rodrigues Gandra

TCC (Graduação em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias,
Universidade Federal da Grande Dourados.

Inclui bibliografia

1. fibra. 2. consumo. 3. digestibilidade. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

Suplementação de enzima celulolítica (xilanase), em dietas a base de cana de açúcar ou silagem de milho para novilhas leiteiras: fermentação ruminal e síntese de proteína microbiana.

RESUMO

Objetivou-se avaliar a fermentação ruminal e a síntese de proteína microbiana de acordo as dietas experimentais de novilhas Jersey, suplementadas com enzimas celulolíticas (xilanase) silagem de milho ou silagem de cana-de-açúcar. Foram utilizadas 8 novilhas da raça Jersey, com idade de $8 \pm 2,5$ meses, com peso médio de 160 ± 15 kg. Os animais foram divididos aleatoriamente em 2 quadrados latinos 4×4 , balanceados e contemporâneos, em arranjo fatorial 2×2 . O período experimental foi de 25 dias sendo que 14 para a adaptação das dietas experimentais e 6 para a colheita de dados. As dietas experimentais foram: 1- Silagem de milho (SM); 2- Silagem de cana (SC); 3- Silagem de milho + fibrozyme (SMF) e 4- Silagem de cana + fibrozyme (SCF). As dietas experimentais foram formuladas de acordo com o NRC, (2001), visando ganho de peso de 800 a 900 gramas por dia, sendo estas isonitrogenadas. A suplementação com enzima celulolítica (Fibrozyme®) influenciou a fermentação ruminal e a síntese de proteína microbiana ($P < 0,05$). A enzima celulolítica (Fibrozyme®) aumentou ($P < 0,05$) o propionato.

Palavras-chave: fibra, consumo, digestibilidade

ABSTRACT

The objective was to evaluate the ruminal fermentation and the synthesis of microbial protein according to the experimental diets of Jersey heifers supplemented with cellulolytic enzymes (xylanase) corn silage or sugarcane silage. Eight Jersey heifers with initial average weight of 160 ± 15 kg, and age of $8 \pm 2,5$ months were used. The animals were randomly distributed into two latin square design 4×4 , balanced and contemporary, 2×2 factorial arrangement. The experimental period was 25 days, and 14 days for the adaptation to the experimental diets and 6 days for data collection. The experimental diets were: 1 - Corn silage (CS); 2 - Sugarcane silage (SS); 3 - Corn Silage + fibrozyme (CSF) and 4 - Sugarcane silage + fibrozyme (SSF). The diets were

formulated to be isonitrogenous according to NRC (2001), aiming a daily gain of 800 to 900 g. Cellulolytic enzyme supplementation (Fibrozyme®) infused rumen fermentation and microbial protein synthesis ($P < 0.05$). The cellulolytic enzyme (Fibrozyme®) increased ($P < 0.05$) the propionate.

Keywords: fiber, intake, digestibility

1 - INTRODUÇÃO

A fase de recria, que se estende da desmama ou desaleitamento até a primeira cobrição, é menos complexa que a fase de cria, mas nem por isso exige menor atenção dos produtores de leite. A composição do corpo da bezerra modifica-se com o tempo. De início, há crescimento ósseo e altas taxas de formação de proteína, seguida por uma fase de maior formação de tecido adiposo (gordura). Os fatores que influenciam a composição do ganho de peso são o peso do animal, estágio do crescimento, consumo de energia acima daquela necessária para manter os processos fisiológicos normais, como circulação, digestão, respiração, etc. (manutenção), "status" protéico e o tamanho que o animal terá na idade adulta (Mendes Neto et al., 2007).

O sistema de criação interfere no desenvolvimento da novilha, são os fatores dietéticos que causam grande impacto no desempenho ponderal as mesmas. O tipo de alimento que é fornecido às novilhas afetam diretamente a eficiência com que estes são utilizados para o crescimento e desenvolvimento das estruturas orgânicas, dentre elas a glândula mamária (SARTORI, 2007).

Em programas mais avançados de nutrição de bovinos, como o NRC, os teores de fibras para novilhas leiteiras ainda não foram exatamente explicadas pelos experimentos científicos. Historicamente o nível de fibra depende principalmente da qualidade do alimento, e conseqüentemente interfere na densidade energética da dieta (NRC, 2001).

Os requerimentos por FDN (fibra em Detergente Neutro) para novilhas em crescimento ainda não estão completamente estabelecidos, principalmente no que se refere ao limite mínimo. Portanto, prudência é requerida, não fornecendo dieta com FDN menor que 19%, visando evitar problemas de laminite, dentre outros. Entretanto, recomendações abaixo de 19% de FDN não são recomendados devido aos poucos experimentos realizados, o que é importante, pois o teor de FDN da dieta é um dos fatores que controla o consumo de alimento (NRC, 2001).

Pesquisas têm demonstrado que a suplementação com dietas fibrolíticas tem um potencial significativo para melhorar a utilização de alimentos e o desempenho animal. Enzimas fibrolíticas para alimentação animal, principalmente xilanases e

celulases, são extratos concentrados resultantes de bactérias ou fermentações fúngicas com atividades enzimáticas específicas. Melhorias no desempenho dos animais devido a utilização de aditivo enzimático pode ser atribuída, principalmente, a melhoria da digestão da fibra, resultando no aumento da ingestão calórica de fácil digestão (Beauchemin, et al.1998).

Quando visto através de uma variedade de produtos enzimáticos e condições experimentais, a resposta para a enzima fibrolítica para animal tem sido variável. Esta variação pode ser atribuída às condições experimentais, bem como às atividades e características das enzimas ou sobre a suplementação de atividades enzimáticas e no método adequado de fornecer o produto enzimático para o animal (Gomez-Vasquez et al.2003).

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 – Silagens de milho e silagem de cana-de-açúcar

A silagem é nada mais que uma forragem verde, succulenta, armazenada em silos e conservada por meio de um processo de fermentação sem a presença do O₂ (anaeróbica), para que em período de escassez se tenha alimento suficiente ao animal (Cardoso& Silva, 1995).

Tradicionalmente o material mais utilizado para ensilagem é a planta de milho, devido sua composição bromatológica preencher os requisitos para confecção de uma boa silagem como: teor de matéria seca (MS) entre 30% a 35%, e no mínimo de 3% de carboidratos solúveis na matéria original, baixo poder tampão e por proporcionar uma boa fermentação microbiana.

Na produção de silagem de milho de boa qualidade deve-se considerar não somente o percentual de grãos na massa ensilada, mas também os demais componentes da planta como um todo, com isso a obtenção de produtos finais de qualidade o que propiciará melhor resposta animal nos diversos sistemas de produção, quer seja de leite

ou de carne, bem como sua viabilidade econômica (RENTERO, 1998). Nesse contexto, NUSSIO e MANZANO (1999) sugerem que em programas de seleção de cultivares de milho para a produção de silagem, os modelos de previsão de qualidade da silagem devem ser estabelecidos com base em dois fatores: percentagem de grãos na massa ensilada (% na MS) e valor nutritivo da porção haste+folhas (% da digestibilidade verdadeira in vitro da MS).

O estágio de desenvolvimento em que a planta de milho é colhida, além do cultivar utilizado, afeta a percentagem de MS e de grãos na silagem de milho. Muitos autores recomendam que a planta de milho deva ser colhida nos intervalos de 30 a 35% de MS para confecção de silagens. Teores de MS abaixo de 30% estariam relacionados com menor produção de MS, perdas de matéria seca por lixiviação, baixa qualidade da silagem e redução no consumo por animais (LAUER, 1996a).

NUSSIO e MANZANO (1999) relataram que os teores de 30 a 35% são obtidos nas plantas de milho no momento em que a consistência dos grãos estiver variando entre o estágio pastoso e o farináceo duro, o que corresponde à visualização da linha de leite entre 1/3 e 2/3.

A silagem de milho tem teores de carboidratos solúveis, que permitem à fermentação láctica, conservando alto valor nutritivo do alimento, grande quantidade de massa verde, teor de MS, de fácil preparo e que tem uma boa aceitação dos animais (Caetano, 2001). Em estudo com silagem de milho, Tomich et al. (2006) encontraram valores de 27,3% de MS, 7,2% de PB, 51,5% de FDN, 32,4% de FDA e 4,0% de lignina.

A cana de açúcar é um volumoso que se destaca na alimentação de bovinos, e tem despertado grande interesse tanto de produtores quanto de pesquisadores, em virtude de seus benefícios em logística e operacionalidade. Segundo Nussio (2003) o destaque se deve pela razão da pequena taxa de risco na utilização, o baixo custo por unidade de matéria seca produzida, a manutenção do valor nutritivo, maior disponibilidade nos períodos de escassez de forragens e do melhor desempenho econômico em comparação a outras forrageiras, dependendo da categoria animal. Existem restrições quanto ao consumo da silagem de cana-de-açúcar para bovinos, principalmente as de raças leiteiras de nível médio e alta produção, decorrentes,

principalmente, da baixa digestibilidade da fibra (Magalhães et al., 2004), o que pode comprometer o consumo voluntário. Segundo Nussio et al. (2005), o acúmulo de etanol pode não somente representar perdas do material ensilado, mas também perdas decorrentes da recusa dos animais.

Além disso, entre outras limitações, encontram-se o baixo teor de proteína, o alto teor de carboidratos solúveis, o pequeno aporte pós-ruminal de aminoácidos e de glicose, o aumento na quantidade de protozoários no rúmen e o desbalanço de minerais (Preston & Leng, 1978; Preston, 1982).

Segundo Valadares Filho et al. (2002), a principal limitação da cana-de-açúcar é a redução de consumo, ocasionada principalmente pela baixa digestibilidade da fibra, uma vez que seu teor médio em FDN é menor que o da silagem de milho (47 vs 60). No caso da cana-de-açúcar, a saída para sua utilização pode ser a redução de seu uso na dieta de acordo com o aumento da participação de concentrado. Estas mudanças podem proporcionar maior aporte de matéria orgânica digestível, o que levaria a um aumento da concentração de energia, diminuição da concentração de fibra de baixa digestibilidade e, conseqüentemente, ao maior consumo de matéria seca para atender às exigências energéticas do animal. Por outro lado, excesso de concentrado na dieta pode provocar diversos distúrbios metabólicos, como conseqüência do rápido abaixamento do pH ruminal, que vão desde acidoses subclínicas até casos mais severos, levando à morte, principalmente porque a cana-de-açúcar apresenta alto teor de carboidratos prontamente fermentáveis. Além disso, como o custo do concentrado geralmente é alto, elevadas proporções na dieta podem não ser economicamente viáveis.

Segundo Freitas et al (2006) assim como qualquer outra forrageira a cana-de-açúcar tem suas particularidade e suas características para sofrer o processo de ensilagem são elas : teor de matéria seca (MS) em torno de 25 a 30%, teor de carboidratos solúveis (CHOs) próximos a 10% da matéria natural (MN) e poder tampão que permite a queda do pH para valores próximos a 3,5.

Segundo pesquisas realizadas por Andrade et al.,(2004) e Bonomo et al.,(2009), a maior dificuldade em se adotar dietas incluindo a cana como volumoso na dieta , são os valores da proteína bruta que tem uma grande variação 1,91 a 3,81%. A concentração

de nitrogênio muito baixa nessa forrageira, comparada aos resíduos pós-colheita de semente de capim- Marandu, que tem valor próximo a 3% de PB. (Roth et al. 2010).

A baixa digestibilidade da fração fibrosa da cana-de-açúcar está relacionada à alta concentração de lignina e a sua ligação com os carboidratos estruturais (hemicelulose e celulose) que impede a ação dos microrganismos ruminais sobre estes carboidratos. No entanto, essas ligações do tipo éster, nas gramíneas, são particularmente susceptíveis a ação hidrolítica, justificando a utilização de álcalis no tratamento da cana-de-açúcar, promovendo solubilização de parte da lignina pelo aumento de pH (Van Soest, 1994).

Aroeira et al., (1993) diz que a cana-de-açúcar com uréia tem seu uso difundido na alimentação do gado leiteiro, devido a mesma apresentar valor baixo de proteína, devido a esse empecilho o uso de aditivos no processo de ensilagem, com a finalidade de melhorar a qualidade do produto.

Vários aditivos vêm sendo estudados e avaliados para a estabilidade aeróbia e controle da fermentação alcoólica, assim como, inoculantes com bactérias homoláticas, como *Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus pentosaceus* e inoculantes com bactérias produtoras de ácido propiônico. Estudos realizados por Pedrosa et al., (2007), foi possível observar que o uso destes inoculantes na ensilagem da cana-de-açúcar houve efeito negativo, sobre a população de leveduras, sobre a produção de etanol e estabilidade aeróbia das silagens. Mas quando se trata de inoculantes contendo bactérias heterofermentativas, da espécie *Lactobacillus buchneri*, os efeitos do tratamento são positivos na ensilagem, há diminuição no teor de etanol, das perdas de MS e no número de leveduras, com aumento da estabilidade aeróbia das silagens (Pedrosa et al., 2008).

Costa (2005) avaliou desempenho produtivo de vacas leiteiras alimentadas com diferentes proporções de cana-de-açúcar e concentrado ou silagem de milho na dieta, foi observado maior consumo de carboidratos não-fibrosos para o tratamento com 40% de cana-de-açúcar em relação às dietas de 60% e 50%, já a dieta de silagem de milho não deferiu, indicando também maior participação de alimento concentrado na dieta. Nesse mesmo estudo avaliou se o coeficiente de digestibilidade (CD) da matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), carboidratos totais

(CHO), fibra em detergente neutro (FDN) e carboidratos não-fibrosos (CNF), porém não houve diferença entre MS, MO e CHO nas dietas. A silagem de milho teve um valor maior de coeficiente de digestibilidade de PB dentre as dietas devido o valor proteico da dieta. O coeficiente de digestibilidade do EE para silagem de milho foi maior ($P < 0,05$) que nas dietas contendo 60 e 50% de cana-de-açúcar, porém não houve diferença na dieta com 40% pois tem uma maior proporção de concentrado. No FDN a silagem de milho teve um valor maior comparado às três dietas explicado pela taxa de passagem. CDCNF para silagem de milho foi menor do que os obtidos em todas as dietas à base de cana-de-açúcar, em razão do menor teor de CNF dessa dieta.

Comparando uma dieta à base de silagem de milho com uma dita com $> 50\%$ de cana-de-açúcar, há uma diferença entre produção de leite devido ao menor consumo de matéria seca, consequentemente menor consumo de nutrientes.

2.2 – Digestibilidade de fibra

A avaliação do valor nutritivo dos alimentos consumidos pelos animais, em condições de pastejo ou confinados, tem sido um desafio para os nutricionistas. A digestibilidade é um dos parâmetros importantes para essa avaliação; entretanto, a determinação desta por intermédio do método tradicional de coleta total de fezes requer controle rigoroso da ingestão e excreção, o que o torna trabalhoso e oneroso. Isto levou à idealização de outros métodos nomeados de métodos indiretos dos indicadores ou dos marcadores (SILVA, 1990), os quais apresentam certas vantagens sobre o da coleta total de fezes, a exemplo da simplicidade e conveniência de utilização, e podem proporcionar uma série de informações, incluindo-se a quantidade ingerida de alimentos ou nutrientes específicos, a taxa de passagem da digesta por todo o trato digestivo e a digestibilidade de todo alimento ou nutrientes específicos. Nessas condições, a estimativa da digestibilidade por intermédio de indicadores pode ser desejável (VAN SOEST, 1994).

WEISS (1999) define a fibra como sendo o componente estrutural das plantas, que é a parede celular, e a fração menos digerível do alimento, ou seja aquela que não é digerida por enzimas de mamíferos, além de ser componente essencial para estimular a mastigação e ruminação.

A fibra é fonte de carboidrato, usado pelos microrganismos do rúmen como fonte de energia e pode ser usado para caracterizar alimentos e para determinar limites máximos e mínimos de ingredientes na ração. As forragens são importantes pois além de proteína e energia elas provêm as fibras necessárias das rações para promover a mastigação, ruminação e saúde do rúmen. Na formulação de dietas para bovinos a qualidade e a quantidade de forragem é o primeiro fator a ser analisado, para atender as exigências nutricionais e de fibras, e os concentrados são usados para complementar as contribuições nutricionais das forragens.

O consumo e a digestibilidade são parâmetros chaves em vários sistemas de formulação de dietas para ruminantes. A medição desses parâmetros faz-se necessária, pois, possuem alta correlação com a ingestão de matéria seca e eficiência na absorção e aproveitamento dos nutrientes.

Fibra constitui-se da parede celular dos vegetais. Neste caso, temos os seguintes polímeros que compõem a parede celular, portanto, a fibra: celulose, hemicelulose, lignina, proteína e outros compostos minoritários.

Celulose

A celulose é o polissacarídeo mais abundante na natureza e o principal constituinte da maioria das paredes celulares vegetais, exceto de algumas sementes (McDOUGALL et al., 1993), seu teor varia de 20 a 40% na base seca das plantas superiores (VAN SOEST, 1994), mas quando comparadas diferentes partes da planta ou subproduto vegetal esta variação torna-se mais ampla.

Hemicelulose

Em células maduras, as hemiceluloses encontram-se mais associadas à lignina por ligações covalentes do que os outros polissacarídeos, tornando-se indisponíveis à solubilização. As hemiceluloses são divididas em quatro subgrupos: as xilanas, as â-glicanas, as xiloglicanas e as mananas, apresentando diversidade estrutural e sendo nomeadas de acordo com o monossacarídeo predominante (GOODWIN & MERCER, 1988).

Lignina

As ligninas são polímeros complexos de estrutura não totalmente conhecida. De modo geral, são conceituados como polímeros condensados formados a partir de redução enzimática dos ácidos *o*-cumárico, ferúlico e sinápico em seus respectivos álcoois cumarílico, coniferílico e sinapílico, que irão condensar-se por processo oxidativo formando macromoléculas reticuladas, as ligninas (GRENET & BESLE, 1991). Sua composição, estrutura e quantidade variam de acordo com o tecido, os órgãos, a origem botânica, a idade da planta e os fatores ambientais.

Como um novo método para substituir a FB era necessário para que se pudesse descrever fibra em termos nutricionais (disponibilidade nutricional, ao invés de uniformidade química), o conceito de entidade nutricional ideal levou VAN SOEST (1967) e VAN SOEST & WINE (1967) a desenvolverem o hoje conhecido sistema de detergentes para análise da fibra dos alimentos. Neste sistema, o alimento é dividido na fração solúvel, a qual é rapidamente e completamente disponível, e a fração insolúvel, que é lenta e incompletamente disponível.

A FDN isola celulose, hemicelulose e lignina, com alguma contaminação de pectina, proteína e cinzas. Como meio de quantificar os componentes isolados da fibra, VAN SOEST adicionalmente, criou a fibra insolúvel em detergente ácido, a qual é composta de celulose, lignina, sílica e proteína insolúvel em detergente ácido (NIDA). Desta forma, a hemicelulose pode ser estimada através da diferença entre FDN e fibra detergente ácida (FDA), e a lignina e a celulose podem ser quantificadas, sequencialmente, a partir da oxidação da FDA em solução de permanganato de potássio, e através da queima deste resíduo em mufla, respectivamente. Dos três métodos utilizados para quantificar a fibra (FDN, FDA, FB), somente a FDN mensura os três maiores componentes indigestíveis ou incompletamente digestíveis das plantas: hemicelulose, celulose e lignina (MERTENS, 1997).

Efetividade e fibrosidade

Efetividade é a capacidade de um alimento ou dieta em promover a atividade física motora do trato gastrointestinal (TGI), pois seletivamente os ruminantes retêm fibra no rúmen por um tempo adequado para digestão, isso ocorre devido à ingestão de

partículas longas durante a alimentação. Estas partículas longas formam um material flutuante no rúmen e proporciona o estímulo necessário para se desencadear a atividade de ruminação.

A fibra efetiva (Fe) tem sido definida como a capacidade da fonte de fibra da dieta em estimular a mastigação (MERTENS, 1997). Por isso, geralmente, Fe se refere à capacidade da dieta em manter a saúde geral do rúmen e do animal. Conforme MOONEY e ALLEN (1997), um nível mínimo de fibra na dieta é necessário para ótima produção e saúde de vacas leiteiras. Insuficiente quantidade de fibra ou a falta de uma determinada quantidade de fibra efetiva na dieta, pode resultar em um baixo pH ruminal, decréscimo da eficiência microbiana, diminuição da percentagem de gordura do leite, e pode ameaçar a saúde das vacas.

A digestibilidade da fibra tem sido definida como a proporção da fibra ingerida, que não é excretada nas fezes, a fibra possui uma fração digestível e uma indigestível. O processo de digestão da fibra consiste na hidrólise de polissacarídeos, e a conversão dos monossacarídeos resultantes em AGV, gases da fermentação e calor.

A fração indigestível da FDN é a que mais afeta a utilização da fibra, podendo-se exceder a metade da FDN total no rúmen. HUHTANEN & KHALILI (1986) mostraram uma relação negativa entre a digestibilidade in vivo da FDN e a quantidade de FDN total no rúmen. Como a digestibilidade da FDN no rúmen aumenta com o passar do tempo, a quantidade de FDN total e de FDN digestível diminui numa taxa similar, mas a fração de FDN indigestível diminui mais lentamente. Então, os fatores da dieta que afetam o ambiente ruminal diminuindo a degradação da FDN, aumentam a quantidade (pool) de FDN, especialmente da fração digestível. A diminuição na digestibilidade da fibra pode reduzir o consumo da fibra quando o enchimento ruminal é o fator limitante, tal como ocorre no início da lactação.

A taxa de passagem do material particulado é afetada primeiramente pelo consumo, embora o tamanho da partícula, a fibra na dieta, os carboidratos não-estruturais (CNE) e a taxa de digestão da fibra potencialmente digestível também afetem a taxa de passagem. A interferência dos CNE na digestão da fibra tem sido observada freqüentemente. Os principais efeitos são a redução do pH ruminal e um efeito negativo na digestão da fibra, que pode ser decorrente da preferência dos microrganismos por

CNE, através da sobreposição das bactérias amilolíticas em relação às aquelas que digerem a fibra, na competição pelos mesmos substratos ou pelas enzimas que degradam a fibra, que podem ser inibidas pelos CNE ou pelos produtos de sua digestão (HOOVER, 1986).

A concentração de FDN na dieta está negativamente correlacionada com o CMS em razão da fermentação mais lenta e de maior tempo de permanência no rúmen. Porém, fibra mais digestível pode estimular o consumo, pelo aumento da taxa de passagem, criando espaço para uma outra refeição.

2.3 – Enzimas na nutrição de ruminantes

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

A principal fonte de energia para os animais ruminantes provém das forragens (celuloses e hemiceluloses), hidrolisadas pela ação de enzimática provenientes de bactérias, fungos e protozoários (Schingoethe et al., 1999).

A quantidade e disponibilidade de energia e proteínas para os ruminantes são influenciadas pela lenta e incompleta degradação dos substratos, prejudicando o desempenho animal, com consequências no custo de produção (Yang et al., 2000; Colombatto et al., 2003). As enzimas fibrolíticas exógenas é uma estratégia que busca aumentar a utilização dos nutrientes e a eficiência produtiva animal na suplementação da dieta de ruminantes com aditivos, (Schingoethe et al., 1999; Nsereko et al., 2000; Beauchemin et al., 2003).

Como a maioria das enzimas, o produto de suas hidrólises pode inibir sua ação. Esta informação é muito importante na discussão de suplementação de enzimas comerciais para ruminantes, mostrando que há um desafio para os pesquisadores em formular produtos com proporções ideais de cada tipo de enzima (celulases e

hemicelulases, por exemplo) para que a inibição do produto não ocorra, assegurando desta maneira, a eficácia da enzima suplementada.

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

A classificação dos aditivos enzimáticos é apartir dos compostos que são degradados, são nomeados em celulase, xilanase e ligninase as enzimas que degradam celulose, xilana e lignina, respectivamente se tratando de ruminantes. Ressaltando a importância dos produtos das enzimas fibrolíticas, que geralmente, são combinações de atividades enzimáticas. (McAllister et al., 2001).

Mesmo que no rúmen a proporção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas é alta, pode ocorrer exposição de sítios da parede celular á aderência bacteriana, o qual permite a melhor digestão da dieta animal, devido as atividades de enzimas fibrolíticas exógenas (Beauchemin et al., 2000).

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

Após a alimentação a redução do pH e menor atividade proteolítica ajuda aumentar a estabilidade das enzimas (Morgavi et al., 2001). Geralmente as enzimas

exógenas atuam mais eficientemente no ambiente ruminal com pH em torno de 5,5-6,8. Entretanto, enzimas de *Trichoderma* spp., podem atuar eficientemente com pH menores e temperaturas maiores do que são encontrados tipicamente (Beauchemin; Holtshausen, 2011).

A suplementação de enzimas fibrolíticas exógenas pode aumentar a atividade enzimática no rúmen como visto por Beauchemin e Rode (1996) que obtiveram aumento de 15% na atividade da celulase, e Wallace (2001) que obteve aumento de 5% da atividade xilanase. Mas este efeito é dependente da quantidade de enzimas que são inseridas nas dietas. Morgavi et al. (2000) demonstraram significativa sinergia entre enzimas exógenas e enzimas microbianas, em que uma potencializa a ação da outra. Estes autores combinaram enzimas de *Trichoderma longibrachiatum* com extrato de enzimas ruminais de bovinos recebendo alta concentração de fibra ou alta concentração de concentrado. Observaram que a hidrólise da celulose e da xilana aumentaram 35 e 100%, respectivamente. Além disso, a hidrólise da silagem de milho aumentou 40%.

As enzimas podem também ser aplicadas como aditivo em ração para ruminantes no cocho, no intuito de aumentar a digestibilidade de alimentos fibrosos e, consequentemente, o desempenho do animal. Quando fornecidas dessa maneira, as enzimas fibrolíticas formam ligações com os substratos, que as protegem da degradação ruminal e podem aumentar a digestibilidade da forragem através de diferentes mecanismos, como: hidrólise direta, melhoria da aceitabilidade, alterações na viscosidade intestinal e mudanças do local de digestão (Beauchemin et al., 2003; Martins, 2003; Loures, 2004).

Os níveis de enzima normalmente utilizados como aditivos para a alimentação de ruminantes variam de 0,5 a 2,0 mg/g (ou g/Kg) da dieta total, em MS, como salientado por Beauchemin et al. (2003). Porém, estes níveis são dependentes das características específicas de cada produto, como tipo de atividade das enzimas presentes.

2.4 – Fermentação Ruminal

A fermentação e síntese de nutrientes no rúmen são realizadas pelos diferentes microrganismos existentes no ambiente ruminal.

Entre os fatores que afetam o crescimento e a eficiência das bactérias ruminais, a energia e a proteína são os principais, contudo, outros fatores contribuem com a fermentação ruminal, como o pH e a taxa de passagem, que por sua vez são determinados pelo nível de consumo, sistema de alimentação, tamanho de partícula, qualidade e proporção do volumoso na dieta total, tipo e processamento dos carboidratos dos alimentos (Van Soest, 1994).

O pH ruminal está diretamente relacionado com os produtos finais da fermentação e também com a taxa de crescimento dos microrganismos ruminais. Tal fato é demonstrado com o uso de dietas ricas em volumosos, as quais geralmente proporcionam pH ruminal mais elevado, permitindo o crescimento de bactérias celulolíticas (Church, 1979). Segundo Ørskov (1986), o abaixamento do pH ruminal ocorre, principalmente, após a ingestão de alimentos, especialmente concentrados, devido à sua rápida taxa de fermentação. O pH do fluido ruminal pode variar de 6,2 a 7,0 para dietas constituídas exclusivamente de volumosos.

Na maioria dos casos, o pH do líquido ruminal pode oscilar de 5,5 a 7,5, de acordo com a dieta. Fox et al. (1992) citaram o pH 6,46 como ótimo para síntese microbiana, com prejuízo severo à degradação de parede celular pelas bactérias fibrolíticas quando diminui abaixo de 5,43.

Mertens (1992) sugeriu que a digestão da fibra declinaria, quando o pH ruminal estivesse abaixo de 6,7. Ørskov (1982) e Mould et al. (1983) indicaram que o pH ruminal abaixo de 6,2 reduziria a atividade de bactérias celulolíticas e a digestão de palhas. Esses pesquisadores indicaram que a depressão no pH ruminal poderia ser responsável pela redução na digestibilidade da fibra associada com suplementação de grãos. Church (1979) observou que ruminantes consumindo dietas à base de volumoso mantinham o pH ruminal entre 6,2 e 6,8, ao passo que aqueles que consumiram concentrado, entre 5,8 e 6,6. Mould et al. (1983) demonstraram que o efeito do pH na digestão da fibra é bifásico. Na primeira fase, pode haver acidificação de 6,8 para 6,0,

provocando redução na digestão da porção fibrosa do alimento. Após o pH do ambiente ruminal alcançar valores abaixo de 6,0; segunda fase; pode ocorrer uma parada na digestão devido à sensibilidade das bactérias fibrolíticas neste nível de acidez.

Nesse sentido, Russell et al. (1979) indicaram que a população de bactérias celulolíticas diminuiu, quando o pH variou de 5,7 a 6,2. Já as bactérias fermentadoras de carboidratos solúveis persistiram até em variações de 4,6 a 4,9. Mudanças nas populações bacterianas em resposta ao reduzido pH, devido à sensibilidade de bactérias ruminais, poderiam ser uma das razões para a redução na ingestão e digestão do volumoso.

A natureza da dieta fornecida ao animal influencia diretamente nos parâmetros ruminais, bem como a taxa de passagem que a dieta possui, podendo modificar a atividade metabólica dos microrganismos ruminais, alterando os produtos gerados pela fermentação ruminal. De acordo com Manella et al. (2003), o tipo de alimento altera os produtos da fermentação ruminal, por conta da especificidade dos microrganismos em digerir determinados nutrientes da dieta. Esses autores afirmam que, dietas ricas em forragens resultam em maior atividade de bactérias celulolíticas e sacarolíticas, aumentando a produção de ácido acético. Já as dietas ricas em amido e/ou proteína, aumentam ação das bactérias amilolíticas e/ou proteolíticas, que são produtoras de ácido propiônico (CHURCH, 1988). A granulometria do alimento fornecido ao animal influencia na taxa de passagem da dieta e na fermentação ruminal. Segundo Valadares Filho & Pina (2006), dietas com moagem fina, aumentam a densidade e a ingestão, promovendo rápida passagem do material insolúvel. De acordo com esses autores, dietas totalmente moídas, leva ao desaparecimento da estratificação do conteúdo ruminal, que é encontrada normalmente em animais alimentados com forragem, permitindo dessa forma rápida passagem de partículas grosseiras, diminuindo sua degradação e aproveitamento por parte dos microrganismos ruminais.

Os ruminantes matam os níveis de pH do meio ruminal adequados, através da saliva, que é rica em bicarbonato de sódio e possui pH em torno de 8,1. A secreção de saliva depende do tipo de dieta que o animal é alimentado, dietas com alto teor de umidade diminuem a produção de saliva, no entanto alimentos ricos em fibra induzem maior secreção de saliva (BERCHIELLI et al., 2006). Segundo Valadares Filho & Pina

(2006), dietas com menos de 40% de forragem, reduzem a produção salivar, diminuindo o crescimento da flora microbiana.

Os ácidos graxos voláteis (AGVs) são os principais subprodutos da fermentação dos carboidratos, e são utilizados como fontes de energia para o metabolismo dos ruminantes (BALDWIN, 1998; OLSON et al., 1999; BERCHIELLI et al., 2006). Segundo Van Soest (1994), os AGVs produzidos pelos microrganismos do rúmen através das suas vias metabólicas, suprem 85% das exigências de energia dos ruminantes. Os AGVs predominantes no fluido ruminal são os ácidos acéticos, propiônico e butírico, sendo isobutírico, valérico, isovalérico, 2-metilbutírico e outros geralmente presentes em quantidades relativamente pequenas (DIJKSTRA, 1993). De acordo com esse autor os ácidos acéticos, propiônico e butírico podem ser usados para gerar ATP no metabolismo intermediário. O ácido propiônico é um precursor de glicose, entrando no ciclo da gliconeogênese hepática (HUNTINGTON, 1990). E O metano que é um gás composto de carbono e hidrogênio, produzido pela fermentação ruminal, na concentração de 30% a 40%, juntamente com CO₂ (60%), e quantidades variáveis de nitrogênio (N₂) e traços de H₂S, H₂ e O₂ (VALADARES FILHO & PINA, 2006). A proporção de cada produto da fermentação ruminal, depende da espécie bacteriana, que possui especificidade para cada tipo de produto, da dieta e principalmente da concentração de nicotinamida adenosina difosfato (NADH) e H₂ na célula (KOZLOSKI, 2002).

2.5 – Síntese de proteína microbiana

Os ruminantes com expressiva atividade fermentativa pré-gástrica evoluíram há 14 milhões de anos e seu sucesso no processo evolutivo têm sido atribuídos à existência da relação simbiótica com os microrganismos ruminais, onde os animais contribuem com o alimento e o habitat, enquanto os microrganismos fornecem ácidos graxos voláteis e aminoácidos formados a partir de substratos que não seriam aproveitados (fibra e nitrogênio não-protéico) pelo animal hospedeiro (Kozloski, 2002). A maior parte dos aminoácidos absorvidos pelos ruminantes é proveniente da proteína microbiana sintetizada no rúmen, sendo as exigências dietéticas de proteína metabolizável para ruminantes, atendidas mediante a absorção intestinal de aminoácidos

provenientes da proteína dietética não degradada no rúmen e proteína microbiana verdadeira digestíveis. Dessa forma, tem sido objetivo da nutrição dos ruminantes, maximizar o fluxo de proteína microbiana para o intestino delgado, aumentando assim a eficiência produtiva.

O suprimento de aminoácidos a partir da proteína microbiana é fundamental para o metabolismo proteico dos ruminantes, uma vez que a maior parte dos aminoácidos absorvidos no intestino delgado é proveniente da proteína microbiana. A eficiência de produção microbiana e o fluxo microbiano são fatores determinantes da quantidade de proteína microbiana que alcança o intestino delgado. De acordo com o NRC (2001), a proteína sintetizada pelos microrganismos rumina possui excelente perfil aminoácido e composição pouco variável. Dessa forma, o estudo dos mecanismos de síntese proteica microbiana e dos fatores relacionados são de grande importância.

As disponibilidades ruminais de nitrogênio (N) e energia são os principais fatores que limitam o crescimento microbiano (Clark et al., 1992). A maioria dos microrganismos presentes no rúmen utiliza amônia como fonte de N para seu crescimento. A uréia é rapidamente hidrolisada pelas bactérias aderidas ao epitélio ruminal e a amônia resultante é incorporada ao N bacteriano, sendo a disponibilidade de energia o principal fator que determina a taxa de assimilação desse N (Huntington & Archibeque, 1999). Russell et al. (1992) comprovaram que a produção excessiva de amônia e sua consequente absorção ruminal aumenta a excreção urinária de compostos nitrogenados. Nocek & Russell (1988) afirmaram que, se a taxa de degradação de proteína exceder a de fermentação de carboidratos, grande quantidade de compostos nitrogenados pode ser perdida na urina, como a uréia. Se a taxa de fermentação de carboidratos for maior que a degradação da proteína, ocorre redução na produção de proteína microbiana.

A proteína microbiana pode suprir de 50% (NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC, 1985) à totalidade de proteína metabolizável requerida, dependendo do teor de proteína não degradável no rúmen ingerida (NRC, 1996), e, devido à economicidade em suplementos proteicos nas dietas, sua estimativa é importante.

O NRC (1985) discute o crescimento microbiano em três contextos: eficiência microbiana, massa microbiana e fluxo microbiano. A eficiência e massa microbiana são

dependentes do substrato disponível para fermentação no rúmen, composição e taxa de fermentação do substrato e fatores intrínsecos ao ambiente ruminal. O fluxo microbiano é dependente das relações entre o tamanho de partícula, o volume e a taxa de passagem no rúmen. O fluxo microbiano torna-se importante por causa dos requerimentos de manutenção dos microorganismos ruminais, os quais aumentam sob lentas taxas de passagem, resultando em relativo aumento na ineficiência da energia fermentada (POLAN, 1988).

Vários fatores que afetam a síntese de proteína microbiana no rúmen têm sido abordados por diversos autores, como o teor e a fonte de N e de carboidratos na dieta, a taxa de diluição ruminal, a frequência de alimentação, o consumo de alimento, a relação volumoso:concentrado, a ensilagem, os aditivos da silagem, os ionóforos e o teor de minerais como P, S e Mg na dieta (STERN e HOOVER, 1979; SNIFFEN e ROBINSON, 1987; DURAND e KOMISARCZUK, 1988).

O N amoniacal pode servir como a principal fonte de N para a síntese de proteína microbiana, em bactérias fermentadoras de carboidratos estruturais, entretanto, algumas espécies, como as de bactérias fermentadoras de carboidratos não-estruturais, requerem aminoácidos e peptídeos (NRC, 1985). As bactérias ruminais podem incorporar aminoácidos em proteína microbiana ou fermentá-los como fonte de energia. A fermentação de aminoácidos também origina amônia ruminal. Como o crescimento microbiano é dependente do suprimento de carboidratos fermentáveis, os produtos finais do metabolismo de proteínas são influenciados pela disponibilidade de carboidratos. Quando o ATP originado da fermentação de carboidratos é disponível, os aminoácidos podem ser incorporados em proteína microbiana. Se o ATP não é suficiente para permitir a síntese protéica, os aminoácidos serão fermentados como fonte de energia e a amônia se acumulará. Se a produção de amônia no rúmen é grande, o aumento da atividade de reciclagem da uréia no fígado e rim é necessário para proteger o animal do seu efeito tóxico (NOCEK e RUSSELL, 1988). A determinação das concentrações de amônia permite o conhecimento do desbalanceamento na digestão de proteína, pois, quando ocorrem altas concentrações de amônia, pode estar havendo excesso de proteína dietética degradada no rúmen e, ou, baixa concentração de carboidratos degradados no rúmen. Segundo HOOVER (1986).

A proteína microbiana que chega ao intestino é uma função da eficiência microbiana, resultante da produção de massa microbiana, e sua saída do rúmen (SNIFFEN e ROBINSON, 1987).

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Animais e dietas

O experimento foi conduzido no setor de Zootecnia da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), localizada nas coordenadas *22°11'43.49'' de Latitude Sul e 54°55'77'' de Longitude Oeste*, com período experimental total de 80 dias.

Foram utilizadas 12 novilhas da raça Jersey, com idade de $8 \pm 2,5$ meses, com peso médio de 160 ± 15 kg. Os animais foram divididos aleatoriamente em 2 quadrados latinos 4X4, balanceados e contemporâneos, em arranjo fatorial 2X2. O período experimental foi de 25 dias sendo que 14 para a adaptação das dietas experimentais e 6 para a colheita de dados.

As dietas experimentais foram: 1- Silagem de Cana sem **Fibrozyme®**; 2 - Silagem de Cana sem **Fibrozyme®**; 3-Silagem de Milho sem **Fibrozyme®**; 4-Silagem de Milho com **Fibrozyme®**. Os animais receberão 15g de **Fibrozyme®** /dia As dietas experimentais foram formuladas de acordo com o NRC, 2001 visando ganho de peso de 800 a 900 gramas por dia, sendo isonitrogenadas e terão a mesma concentração em fibra em detergente neutro (Tabela 1).

Tabela 1. Ingredientes e composição química das dietas experimentais.

Item	Dietas*			
	SM	SC	SMF	SCF
Ingredientes (% MS)				
Silagem de milho	65.34	-	65.34	-
Silagem de cana	-	54.96	-	54.96
Milhofubá	20.08	23.87	20.08	23.87
Grão de soja cru inteiro	10.04	16.39	10.04	16.39
Uréia	2.12	2.34	2.12	2.34
Mineral mix†	2.42	2.44	2.42	2.44
Fibrozyme (g /dia)	-	-	20.00	20.00
Composição química (%)				
Matéria seca	57.30	57.30	57.55	57.55
Matéria orgânica	95.03	95.03	94.82	94.82
Proteína bruta	16.3	16.4	16.3	16.4
Extrato etéreo	5.0	5.4	5.0	5.4
Fibra em detergente neutro	40.1	40.1	40.1	40.1
Carboidrato não fibroso‡	33.7	32.3	33.7	32.3
Cinzas	4.93	4.93	5.14	5.14
Nutrientes digestíveis totais§	69.00	66.00	69.00	66.00
Energia líquida§	1.57	1.51	1.57	1.51
Energia líquida de ganho§	1.00	0.90	1.00	0.90

*Silagem de milho (SM); Silagem de cana (SC); Silagem de milho + fibrozyme (SMF); Silagem de cana + fibrozyme (SCF).

†Contém por kilograma: 120.00 g Ca, 88.00 g P, 75.00 mg I, 1300.00 mg Mn, 126.00 g Na, 15.00mg Se, 12.00mg S, 3,630.00 mg Co, 55.50 mg Cu and 1800.00 mg Fe.

‡CNF = 100 – [(%PB - %PB from uréia + % uréia) + %EE + %cinzas + %FDN] de acordo com Hall (1998).

§Calculado de acordo com NRC (2001).

3.2- Análises bromatológicas

As amostras de silagem, ingredientes do concentrado e sobras foram analisadas quanto aos teores de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), fibra em detergente neutro (FDN) e ácido (FDA), lignina (LIG) e Cinzas (CZ), conforme técnicas descritas por (AOAC 2002). O teor de NDT foi calculado segundo o (NRC, 2001).

3.3- Fermentação Ruminal

As amostras de líquido ruminal foram coletadas no 20º dia de cada período, sendo a coleta realizada 4 horas após a alimentação. Logo após a coleta foram determinados os valores de pH ruminal utilizando potenciômetro.

No laboratório as amostras foram centrifugadas a 2.000 x g por 15 minutos, 1 mL do sobrenadante colocado em tubo de ensaio e adicionando-se 0,2 mL de ácido fórmico P.A., arrolhado e identificado e armazenado em congelador a -20°C para determinação de ácidos graxos de cadeia curta (Erwin et al. 1961). Da mesma amostra 2 mL do sobrenadante foi pipetado e armazenado em tubos de ensaio contendo 1 mL de ácido sulfúrico a 1 N, para posterior determinação da concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH₃).

3.4 – Síntese de Proteína Microbiana

A colheita de urina foi realizada no 16º dia de cada período experimental, 4 horas após a alimentação. Alíquotas de 50 mL de urina (amostra *spot*) foram obtidas durante micção estimulada por massagem na vulva. A urina foi filtrada e alíquotas de 10 mL foram diluídas imediatamente em 40 mL de ácido sulfúrico a 0,036 N para evitar destruição bacteriana dos derivados de purinas e precipitação do ácido úrico. Uma amostra de 50 mL urina pura acrescida a 1 mL de ácido sulfúrico PA foi armazenada para determinação dos compostos nitrogenados totais, de ureia e creatinina.

As concentrações de creatinina foram determinadas por meio de kits comerciais (Laborlab®), utilizando reação enzimática calorimétrica cinética. O volume urinário total diário foi estimado dividindo-se as excreções urinárias diárias de creatinina pelos valores observados de concentração de creatinina na urina das amostras *spot*, segundo Oliveira et al. (2001).

A excreção urinária diária de creatinina foi estimada a partir da equação $EC = 32,27 - 0,01093 \times PV$ em que: EC = excreção diária de creatinina (mg/kg PV); e PV = peso vivo (kg). Os níveis de alantoína na urina e os de ácido úrico na urina e alantoína

do foram determinados pelo método colorimétrico, conforme metodologia de Fujihara et al. (1987), descrita por Chen & Gomes (1992).

A excreção total de derivados de purinas foi calculada pela soma das quantidades de alantoína e ácido úrico excretadas na urina, expressas em mmol/dia. As purinas microbianas absorvidas (Pabs, mmol/dia) foram calculadas a partir da excreção de derivados de purinas (DP, mmol/dia), por meio da equação $Pabs = (DP - 0,236 \cdot PV^{0,75}) / 0,84$, em que 0,84 é a recuperação de purinas absorvidas como derivados de purina e $0,236 \cdot PV^{0,75}$, a excreção endógena de derivados de purina (Orellana Boero et al., 2001). A síntese ruminal de compostos nitrogenados (Nmic, gN/dia) foi calculada com base nas purinas absorvidas (Pabs, mmol/dia), utilizando-se a equação (Chen & Gomes, 1992): $Nmic = (70 \cdot Pabs) / (0,83 \cdot 0,134 \cdot 1.000)$, em que 70 é o conteúdo de N nas purinas (mgN/mol); 0,134, a relação N purina: N total nas bactérias (Valadares et al., 1999); e 0,83, a digestibilidade intestinal das purinas microbianas.

3.5 - Análises estatísticas

Os dados obtidos foram submetidos ao SAS (Version 9.1.3, SAS Institute, Cary, NC 2004), verificando a normalidade dos resíduos e a homogeneidade das variâncias pelo PROC UNIVARIATE.

Os dados foram analisados, pelo PROC MIXED de acordo com a seguinte modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + P_j + Q_k + S_l + E_m + S_l(E_m) + e_{ijklm}$$

onde: Y_{ijk} = variável dependente, μ = média geral, A_i = efeito de animal ($i = 1$ a 8), P_j = efeito do período ($j = 1$ a 4), Q_k = efeito do quadrado ($k = 1$ to 2), S_l = efeito de silagem ($l = 1$ a 2), E_m = efeito de enzima ($m = 1$ a 2), $S_l(E_m)$ = efeito de interação e e_{ijklm} = erro. O efeito aleatório do modelo (random) foi caracterizado por: A_i e P_j . Os graus de liberdade foram corrigidos por $DDFM = kr$. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo comando PROC MIXED do SAS, versão 9.0 (SAS, 2009), adotando-se nível de significância de 5%.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

A relação de propionato no perfil de ácidos graxos de cadeia curta na composição do rúmen foi alterada, demonstrando aumento de 19% nos tratamentos contendo silagem de milho (Tabela 2).

Tabela 2. Fermentação ruminal

Item	Dieta [*]				SEM [†]	<i>p</i> -value [‡]		
	SC	SM	SCE	SME		SIL	FIB	INT
Ph	6.83	6.77	6.89	6.73	0.05	0.219	0.772	0.551
N-NH ₃ , mg/dL	19.60	19.04	21.49	19.08	1.93	0.535	0.684	0.697
<i>Ácidos graxos de cadeia curta (mmol)</i>								
Acetato	62.66	61.56	60.52	61.34	1.22	0.212	0.833	0.549
Propionato	19.82	22.78	19.34	23.78	0.21	0.012	0.537	0.434
Butirato	10.62	9.88	10.76	9.67	0.28	0.234	0.460	0.297
Isobutirato	0.37	0.31	0.38	0.35	0.02	0.271	0.484	0.656
Valerato	1.46	1.37	1.37	1.40	0.12	0.517	0.477	0.147
Isovalerato	0.53	0.41	0.49	0.55	0.03	0.680	0.471	0.144
Total	95.46	96.31	92.85	97.10	1.45	0.672	0.239	0.554
C2/C3	3.16	2.70	3.10	2.58	0.41	0.267	0.950	0.889

^{*} Silagem de cana (SC); Silagem de milho (SM); Silagem de cana + enzima (atividade de Xilanase 600 UI/g) (SCE); Silagem de milho + enzima (atividade de Xilanase 600 UI/g) (SME).

[†] Erro padrão da média.

[‡] Efeito de silagem (SIL), enzima (ENZ) e interação da SIL e ENZ (INT).

^{a-c} Valores na mesma linha com diferentes letras subscritas diferem significativamente em $P \leq 0,05$ de acordo com PDIF.

A concentração de alantoina no tratamento com silagem de milho apresentou valor 77,6% ($P=0,008$) em relação ao tratamento com silagem de cana-de-açúcar (Tabela 4).

Houve efeito de enzima nos valores de ácido úrico, sendo 37% ($P=0,034$) mais aparente nos tratamentos com adição de enzima.

Efeito de silagem e enzima foram encontrados nos teores de purinas totais sobre os tratamentos. Os tratamentos com silagem de milho apresentaram valores 69% ($P=0,043$) maior em relação aos tratamentos com silagem de cana-de-açúcar. Enquanto os tratamentos com adição de enzima apresentaram superioridade de 4% ($P=0,003$) quando comparados aos tratamentos sem adição da enzima fibrolítica.

Houve efeito significativo de silagem nos valores de purinas absorvidas, sendo os tratamentos com silagem de milho apresentando valor 74,3% (P=0,004) maior em relação aos tratamentos com silagem de cana-de-açúcar.

Os valores de nitrogênio e PB nos tratamentos com silagem de milho foram 74% (P=0,003) maiores que os tratamentos com silagem de cana-de-açúcar, (tabela 3).

Tabela 3. Síntese de proteína microbiana

Item	Dietas experimentais				EPM	Valor de P		
	SC	SM	SCE	SME		SIL	ENZ	INT
	<i>mmol/L</i>							
Alantoina	7.65	11.24	7.94	10.61	1.56	0.253	0.950	0.864
Ácido Úrico	0.60	0.83	0.87	0.67	0.10	0.940	0.794	0.290
Purinas totais	8.25	12.08	8.81	11.28	1.6	0.273	0.967	0.811
	<i>mmol/dia</i>							
Alantoina	117.83	207.14	118.81	213.32	2.10	0.008	0.955	0.967
Ácido Úrico	9.59	9.24	14.67	11.28	1.55	0.552	0.034	0.629
Purinas totais	127.42	216.39	133.48	224.60	3.09	0.043	0.003	0.241
Purinas abs	140.59	246.48	147.85	256.36	0.21	0.004	0.913	0.986
	<i>g/dia</i>							
Nitrogênio	102.22	179.20	107.49	186.39	3.62	0.003	0.913	0.986
Proteína bruta	638.85	1119.99	671.83	1164.91	4.03	0.003	0.913	0.986

* Silagem de cana (SC); Silagem de milho (SM); Silagem de cana + enzima (atividade de Xilanase 600 UI/g) (SCE); Silagem de milho+enzima (atividade de Xilanase 600 UI/g) (SME).

† Erro padrão da média.

‡ Efeito de silagem (SIL), enzima (ENZ) e interação da SIL e ENZ (INT).

^{a-c} Valores na mesma linha com diferentes letras subscritas diferem significativamente em $P \leq 0,05$ de acordo com PDIFF.

Embora os efeitos da silagem e enzima tenham sido observados na digestibilidade dos nutrientes, observamos pequenos efeitos de tratamento na fermentação ruminal. A adição de enzimas fibrolíticas em silagens pode aumentar a razão entre acetato e propionato caracterizando condições mais favoráveis para a digestão ruminal Loures et al., (2005). O aumento na produção de propionato em novilhas alimentadas com silagem de milho pode estar associado ao alto teor de amido da silagem de milho em comparação à silagem de cana-de-açúcar, além da maior ingestão de novilhas alimentadas com dietas contendo silagem de milho em comparação

com aquelas alimentadas com silagem de cana-de-açúcar. Os experimentos contendo enzimas fibrolíticas, a maior efetividade desse complexo é caracterizada por redução da fração fibrosa e, conseqüentemente, aumento da digestibilidade da fibra da forragem (Kung Jr. et al., 2000). As dietas contendo silagem de milho melhoraram a síntese proteica microbiana devido à maior disponibilidade de nutrientes para fermentação ruminal, já que as novilhas alimentadas com dietas a base de milho apresentaram maior consumo de nutrientes e digestibilidade em comparação com aquelas alimentadas com silagem de cana-de-açúcar.

5 – CONCLUSÃO

A adição da enzima não influenciou na fermentação ruminal e na síntese de proteína microbiana de novilhas leiteiras contendo silagem de cana e ou silagem de milho com dieta base.

6 – REFERENCIA BIBLIOGRAFICAS

BERAN, Fernando Henrique Brussi et al. Avaliação da digestibilidade de nutrientes, em bovinos, de alguns alimentos concentrados pela técnica de três estádios. **Revista Brasileira de Zootecnia**, p. 130-137, 2007.

BERCHIELLI, Telma Teresinha; ANDRADE, Pedro de; FURLAN, Claudia Lopes. Avaliação de indicadores internos em ensaios de digestibilidade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, p. 830-833, 2000.

BIANCHINI, Waldmaryan et al. Importância da fibra na nutrição de bovinos. **REDVET. Revista electrónica de Veterinaria**, v. 8, n. 2, 2007.

CAMPESTRINI, Evandro; SILVA, V. T. M.; APPELT, Matias Djalma. Utilização de enzimas na alimentação animal. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 2, n. 6, p. 254-267, 2005.

CORDEIRO, Carla Fabrícia de Araujo et al. Consumo e digestibilidade total dos nutrientes e produção e composição do leite de vacas alimentadas com teores crescentes de proteína bruta na dieta contendo cana-de-açúcar e concentrados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, p. 2118-2126, 2007.

COSTA, Marcone Geraldo et al. Desempenho produtivo de vacas leiteiras alimentadas com diferentes proporções de cana-de-açúcar e concentrado ou silagem de milho na dieta. **Revista brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 6, p. 2437-2445, 2005.

COSTA, Marcos Antonio Lana et al. Desempenho, digestibilidade e características de carcaça de novilhos zebuínos alimentados com dietas contendo diferentes níveis de concentrado. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 34, n. 1, p. 268-279, 2005.

DA SILVA CABRAL, Luciano et al. Eficiência microbiana e parâmetros ruminais em bovinos alimentados com dietas à base de volumosos tropicais. **R. Bras. Zootec**, v. 37, n. 5, p. 919-925, 2008.

DE BRITO, Rodolfo Marques et al. Degradabilidade in situ e parâmetros ruminais em bovinos alimentados com dietas balanceadas para diferentes ganhos de peso e potenciais de fermentação microbiana¹. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 5, p. 1639-1650, 2007.

DE LIMA JÚNIOR, Dorgival Moraes et al. Fatores anti-nutricionais para ruminantes. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 4, n. 3, p. 132-143, 2010.

DE QUEIROZ, Ralf Cezar et al. Uso de Produto à Base de Enzima e Levedura na Dieta de Bovinos: Digestibilidade dos Nutrientes e Desempenho em Confinamento¹. **R. Bras. Zootec**, v. 33, n. 6, p. 1548-1556, 2004.

DE SOUZA MARTINS, Adriana et al. Consumo e digestibilidade aparente total em bovinos sob suplementação com enzimas fibrolíticas¹. **R. Bras. Zootec**, v. 35, n. 5, p. 2118-2124, 2006.

DE SOUZA MARTINS, Adriana et al. Degradabilidade in situ e observações microscópicas de volumosos em bovinos suplementados com enzimas fibrolíticas exógenas¹. **R. Bras. Zootec**, v. 36, n. 6, p. 1927-1936, 2007.

EZEQUIEL, Jane Maria Bertocco et al. Processamento da cana-de-açúcar: efeitos sobre a digestibilidade, o consumo e a taxa de passagem. **Revista Brasileira de Zootecnia**, p. 1704-1710, 2005.

FAGUNDES, Nadia Simarro et al. Enzimas na alimentação de ruminantes. **Revista Nutritime**, v. 5, n. 1, p. 498-503, 2008.

FERELI, Fernanda et al. Monensina sódica e *Saccharomyces cerevisiae* em dietas para bovinos: fermentação ruminal, digestibilidade dos nutrientes e eficiência de síntese microbiana. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 1, p. 183-190, 2010.

ÍTAVO, Luís Carlos Vinhas et al. Produção microbiana e parâmetros ruminais de novilhos alimentados com dietas contendo vários níveis de concentrado. 2002.

JÚNIOR, G. L. et al. Qualidade da fibra para a dieta de ruminantes. **Ciência Animal**, v. 17, n. 7, 2007.

LAERTE, José Nörnberg et al. Prebióticos na nutrição de não ruminantes. **Ciência Rural**, v. 33, n. 5, p. 983-990, 2003.

LAVEZZO, Mendes et al. Estádio de desenvolvimento do milho. 3. Avaliação de silagens por intermédio de parâmetros de fermentação ruminal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, p. 171-178, 1998.

MAGALHÃES, André Luiz Rodrigues et al. Cana-de-açúcar em substituição à silagem de milho em dietas para vacas em lactação: parâmetros digestivos e ruminais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 2, p. 591-599, 2006.

MAGALHÃES, André Luiz Rodrigues et al. Cana-de-açúcar em substituição à silagem de milho em dietas para vacas em lactação: desempenho e viabilidade econômica. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 5, p. 1292-1302, 2004.

MAGALHÃES, Karla Alves et al. Produção de proteína microbiana, concentração plasmática de uréia e excreções de uréia em novilhos alimentados com diferentes níveis de uréia ou casca de algodão. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 4, p. 1400-1407, 2005.

MARTINS, Adriana de Souza et al. Eficiência de síntese microbiana e atividade enzimática em bovinos submetidos à suplementação com enzimas fibrolíticas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, p. 1194-1200, 2006.

MARTINS, Adriana de Souza et al. Taxa de passagem e parâmetros ruminais em bovinos suplementados com enzimas fibrolíticas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, p. 1186-1193, 2006.

MIZUBUTI, Ivone Yurika et al. Consumo e digestibilidade aparente das silagens de milho (*Zea mays* L.), sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) e girassol (*Helianthus annuus* L.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 1, p. 267-272, 2002.

NETO, Saul Ferreira Caldas et al. Proteína degradável no rúmen na dieta de bovinos: digestibilidades total e parcial dos nutrientes e parâmetros ruminais. **R. Bras. Zootec**, v. 37, n. 6, p. 1094-1102, 2008.

NUSSIO, Luiz Gustavo; CAMPOS, FP de; DIAS, Francisco Nogueira. Importância da qualidade da porção vegetativa no valor alimentício da silagem de milho. **Simpósio sobre produção e utilização de forragens conservadas**, v. 1, p. 127-145, 2001.

OLIVEIRA, Vinicius da Silva; SANTANA NETO, J. A.; VALENÇA, R. de L. Características químicas e fisiológicas da fermentação ruminal de bovinos em pastejo– Revisão de Literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, ano **XI**, n. 20, p. 1-21, 2013.

ORDEIRO, Carla Fabrícia de Araujo et al. Consumo e digestibilidade total dos nutrientes e produção e composição do leite de vacas alimentadas com teores crescentes de proteína bruta na dieta contendo cana-de-açúcar e concentrados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, p. 2118-2126, 2007.

PASSINI, Roberta et al. Parâmetros de fermentação ruminal em bovinos alimentados com grãos de milho ou sorgo de alta umidade ensilados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, p. 1266-1274, 2003.

PEREIRA, Mara Lúcia Albuquerque et al. Consumo, digestibilidade aparente total, produção e composição do leite em vacas no terço inicial da lactação alimentadas com

níveis crescentes de proteína bruta no concentrado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 3, p. 1029-1039, 2005.

PESSOA, Ricardo Alexandre Silva et al. Balanço de compostos nitrogenados e produção de proteína microbiana em novilhas leiteiras alimentadas com palma forrageira, bagaço de cana-de-açúcar e ureia associados a diferentes suplementos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 5, p. 941-947, 2009.

PIAGGIO, Lúcia M. et al. Avaliação das cinzas insolúveis em ácido, fibra em Detergente ácido indigestível e lignina em detergente ácido indigestível como indicadores internos da digestibilidade. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v. 20, n. 3, p. 306-312, 1991.

PINA, D. dos S. et al. Degradação ruminal da proteína dos alimentos e síntese de proteína microbiana. **Exigências Nutricionais de Zebuínos Puros e Cruzados BR CORTE**, 2ª ed, Viçosa: Sebastião de Campos Valadares Filho, Marcos Inácio Marcondes, Mário Luiz Chizzotti, Pedro Veiga Rodrigues Paulino, p. 13-46, 2010.

RIBEIRO, Karina Guimarães et al. Eficiência microbiana, fluxo de compostos nitrogenados no abomaso, amônia e pH ruminais, em bovinos recebendo dietas contendo feno de capim-tifton 85 de diferentes idades de rebrota. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 2, p. 581-588, 2001.

SCHMIDT, Patrick et al. Aditivos químicos e biológicos na ensilagem de cana-de-açúcar: 1. Composição química das silagens, ingestão, digestibilidade e comportamento ingestivo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, p. 1666-1675, 2007.

VELHO, João Pedro et al. Composição bromatológica de silagens de milho produzidas com diferentes densidades de compactação. **Revista brasileira de zootecnia= Brazilian journal of animal science**. Viçosa, MG. Vol. 36, n. 5 supl.(set./out. 2007), p. 1532-1538, 2007.