



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**DIETAS DE MILHO GRÃO INTEIRO PARA BOVINOS COM ADIÇÃO DE DOSES  
DE *BLEND* ENZIMÁTICO**

**DOUGLAS GABRIEL ANSCHAU**

Dourados – MS

2024



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**DIETAS DE MILHO GRÃO INTEIRO PARA BOVINOS COM ADIÇÃO DE DOSES  
DE *BLEND* ENZIMÁTICO**

**DOUGLAS GABRIEL ANSCHAU**

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

Co-orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup>. Nara Regina Brandão Cômulo

Dourados – MS

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

A617d Anschau, Douglas Gabriel  
DIETAS DE MILHO GRÃO INTEIRO PARA BOVINOS COM ADIÇÃO DE DOSES DE  
BLEND ENZIMÁTICO [recurso eletrônico] / Douglas Gabriel Anschau. -- 2024.  
Arquivo em formato pdf

Orientador: Rafael Henrique de Tonissi e Buschinelli de Goes.  
Coorientadora: Nara Regina Brandão Cônsolo.  
Tese (Doutorado em Zootecnia)- Universidade Federal da Grande Dourados, 2024.  
Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:  
<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. DIGESTIBILIDADE. 2. FERMENTAÇÃO. 3. METABÓLITOS. I. Goes, Rafael Henrique  
De Tonissi E Buschinelli De. II. Cônsolo, Nara Regina Brandão. III. 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.



ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO APRESENTADA POR DOUGLAS GABRIEL ANSCHAU, ALUNO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO "PRODUÇÃO ANIMAL".

Aos vinte e oito dias do mês de junho do ano de dois mil e vinte e quatro, às quatorze horas, em sessão pública, realizou-se na Universidade Federal da Grande Dourados, a Defesa de Tese de Doutorado intitulada "DIETAS DE MILHO GRÃO INTEIRO PARA BOVINOS COM ADIÇÃO DE DOSES DE BLEND ENZIMÁTICO", apresentada pelo doutorando Douglas Gabriel Anschau, do Programa de Pós-graduação em Zootecnia, à Banca Examinadora constituída pelos membros: Prof. Dr. Rafael Henrique de Tonissi e Buschinelli de Goes/UFGD (presidente/orientador), Prof. Dr. Jefferson Rodrigues Gandra/UNIFESSPA (membro titular interno), Prof.ª Dr.ª Nara Regina Brandão Cônsolo/USP (membro titular externo), Prof. Dr. Antonio Campanha Martinez/UEM (membro titular externo), Prof.ª Dr.ª Danielly Beraldo dos Santos Silva/UNIFENAS (membro titular externo). Iniciados os trabalhos, a presidência deu a conhecer ao candidato e aos integrantes da banca as normas a serem observadas na apresentação da Tese. Após o candidato ter apresentado a sua Tese, os componentes da Banca Examinadora fizeram suas arguições. Terminada a Defesa, a Banca Examinadora, em sessão secreta, passou aos trabalhos de julgamento, tendo sido o candidato considerado APROVADO. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Dourados/MS, 28 de junho de 2024.

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** RAFAEL HENRIQUE DE TONISSI E BUSCHINELLI  
Data: 01/07/2024 23:30:58-0300  
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. Rafael Henrique de Tonissi e  
Buschinelli de Goes  
Presidente/orientador

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** JEFFERSON RODRIGUES GANDRA  
Data: 01/07/2024 09:18:55-0300  
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. Jefferson Rodrigues Gandra  
Membro Titular Interno

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** NARA REGINA BRANDAO CONSOLO  
Data: 01/07/2024 13:11:43-0300  
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof.ª Dr.ª Nara Regina Brandão Cônsolo  
Membro Titular Externo

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** ANTONIO CAMPANHA MARTINEZ  
Data: 01/07/2024 16:55:48-0300  
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. Antonio Campanha Martinez  
Membro Titular Externo

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** DANIELLY BERALDO DOS SANTOS SILVA  
Data: 01/07/2024 19:09:43-0300  
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof.ª Dr.ª Danielly Beraldo dos Santos Silva  
Membro Titular Externo

## **BIOGRAFIA DO AUTOR**

Douglas Gabriel Anschau, filho de Carlos Ricardo Anschau e Márcia Lúcia Simon Anschau, nasceu em 25 de agosto de 1994, na cidade de Dourados-MS. Em abril de 2012, ingressou no curso de Zootecnia pela Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), onde se graduou em junho de 2017. Em 2020, concluiu a pós-graduação em Zootecnia, obtendo o título de Mestre. No mesmo ano, em março, iniciou o doutorado em Zootecnia, também pela UFGD, com foco em Produção de Ruminantes. Submeteu-se à qualificação de doutorado em 20 de dezembro de 2023. Foi bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) de março de 2021 até março de 2024.

***Dedico***

A Deus que sempre me aconselhou e me deu discernimento

A meus pais que sempre me amaram e confiaram

A meus irmãos minha cunhada e minha sobrinha

e minha esposa Luana que sempre me apoiaram

A todos que confiaram em mim

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela sabedoria, discernimento e amor que sempre me guiaram nos momentos felizes e nos difíceis.

Agradeço profundamente aos meus pais, Márcia e Carlos, por seu apoio incondicional e confiança em mim, mesmo diante das preocupações, proporcionando todo o suporte necessário para a conclusão da pós-graduação.

Aos meus irmãos, por sempre me apoiarem em minhas decisões e me auxiliarem nos momentos em que precisei.

À minha cunhada e minha sobrinha, que alegam meus dias e me fazem perceber quão maravilhosa é a vida.

Agradeço aos meus avós maternos por tudo o que fizeram por mim. À minha avó materna, em especial, por sempre demonstrar confiança e amor.

À minha esposa Luana, que me incentivou a ingressar na pós-graduação em Zootecnia e me deu todo o apoio durante o período, sendo sempre minha parceira em tudo.

Agradeço a todos os meus familiares pela confiança e disposição.

Aos professores da pós-graduação, pela dedicação e esforço em ensinar a cada um de seus alunos, e pela importância de seus ensinamentos.

Ao meu orientador, Professor Dr. Rafael Henrique de Tonissi e Buschinelli de Goes, pela paciência, respeito e dedicação, e principalmente por demonstrar tanto amor pela sua profissão, inspirando-me a seguir este caminho que tanto admiro.

Ao meu irmão Luiz Miguel, também integrante do grupo de pesquisa em Nutrição e Produção de Ruminantes, por seu auxílio em todas as atividades do experimento, tanto no campo quanto no laboratório. Meu muito obrigado, e lembre-se de que você é capaz de tudo.

Aos amigos de pós-graduação, especialmente Raquel Tenório, Hayne Mayumi, Nayara Gonçalves, Sullyvan Oliveira, Gleice Kelen, Fernanda Fogaça, Cibeli e Giuliano, por toda a parceria e alegria compartilhadas.

Aos alunos de graduação que me auxiliaram durante o doutorado: Paloma Rufino e Iriadne, por toda a ajuda e alegria que trouxeram aos meus dias.

Ao Grupo de Estudo em Nutrição e Produção de Ruminantes, e às técnicas do Laboratório de Nutrição Animal, Giza e Phaena, pela dedicação e amizade de todos.

À CAPES, pelo financiamento e pela bolsa concedida.

À Universidade Federal da Grande Dourados, por tornar este sonho possível.

A todos, meu muito obrigado e respeito. Vocês foram fundamentais em minha formação pessoal e profissional.

## SUMÁRIO

CAPÍTULO 1- DIETAS DE MILHO GRÃO INTEIRO PARA BOVINOS COM ADIÇÃO DE DOSES DE <i>BLEND</i> ENZIMÁTICO .....	17
1. INTRODUÇÃO.....	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 Dietas de alto grão em confinamentos.....	19
2.2 Características das Dietas com Elevada Proporção de Grãos.....	21
2.3. Digestão do Amido em Ruminantes.....	23
2.4 Enzimas na nutrição de ruminantes .....	24
3. HIPÓTESE .....	26
3.1 OBJETIVO GERAL.....	26
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	26
4. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO .....	26
CAPÍTULO 2 – DEGRADABILIDADE E DIGESTIBILIDADE <i>IN-VITRO</i> DE DIFERENTES TIPOS DE DIETA EM DISTINTAS DOSAGENS DE <i>BLEND</i> ENZIMÁTICO .....	30
1. INTRODUÇÃO.....	31
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
2.1.Desenho experimental .....	31
2.2.Dietas e coleta de líquido ruminal .....	32
2.3.Degradabilidade e Digestibilidade <i>in vitro</i> .....	32
2.4.Análise Estatística .....	33
3. RESULTADOS .....	33
4. DISCUSSÃO.....	34
5. CONCLUSÃO.....	35
6. REFERÊNCIAS .....	35
CAPÍTULO 3- AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS FERMENTATIVOS E DA DIGESTIBILIDADE EM BOVINOS COM DIFERENTES DOSES DE <i>BLEND</i> ENZIMÁTICO .....	37
1. INTRODUÇÃO.....	38
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
2.1.Local, animais e tratamentos .....	39
2.2. Ingestão de nutrientes e digestibilidade aparente total .....	40
2.3. Fermentação ruminal .....	41
2.4. Síntese de proteína microbiana.....	42

2.5. Metabolismo da ureia e creatinina.....	43
2.6. Degradabilidade <i>In situ</i> .....	44
2.7. Análise estatística .....	45
3. RESULTADOS .....	45
4. DISCUSSÃO.....	47
5. CONCLUSÃO.....	49
6. REFERENCIAS .....	49
<b>CAPÍTULO 4- METABOLÔMICA DO LÍQUIDO RUMINAL E PLASMA SANGUÍNEO EM BOVINOS MESTIÇOS CONFINADOS: EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO ENZIMÁTICA .....</b>	
	52
1. INTRODUÇÃO.....	53
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	54
2.1 Local, animais e tratamentos .....	54
2.2 Coleta de Amostras.....	55
2.3 Análise em RMN de alto campo (600MHz).....	55
3. RESULTADOS .....	56
4. DISCUSSÃO.....	56
5. CONCLUSÃO.....	58
6. REFERÊNCIAS .....	59
LISTA DE TABELAS .....	61
LISTA DE FIGURAS .....	65

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 DEGRADABILIDADE <i>IN VITRO</i> DA MATÉRIA SECA DO MILHO GRÃO QUEBRADO E FLOCULADO, COM ADIÇÃO DE BLEND ENZIMÁTICO. ....	61
TABELA 2 DIGESTIBILIDADE <i>IN VITRO</i> DA MATÉRIA SECA DO MILHO GRÃO QUEBRADO E FLOCULADO, COM ADIÇÃO DE BLEND ENZIMÁTICO. ....	61
TABELA 3 CONSUMO E DIGESTIBILIDADE APARENTE DE NUTRIENTES DE BOVINOS CONFINADOS COM DIETAS MILHO GRÃO INTEIRO RECEBENDO COM DOSES CRESCENTES DE BLEND ENZIMÁTICO. ....	61
TABELA 4 PARÂMETROS DE FERMENTAÇÃO RUMINAL EM BOVINOS CONFINADOS COM DIETAS MILHO GRÃO INTEIRO RECEBENDO COM DOSES CRESCENTES DE BLEND ENZIMÁTICO. ....	62
TABELA 5 VALORES MÉDIOS DO BALANÇO DE NITROGÊNIO EM NOVILHOS RECEBENDO DIETAS A BASE DE MILHO GRÃO INTEIRO E NÍVEIS CRESCENTES DE BLEND ENZIMÁTICO. ....	62
TABELA 6 COMPORTAMENTO DOS ANIMAIS SUPLEMENTADOS COM DIETA CONTENDO MILHO EM GRÃO E ADIÇÃO DE DOSES CRESCENTES DE BLEND ENZIMÁTICO (G/DIA). ....	63
TABELA 7 PARÂMETROS CINÉTICOS DE DEGRADAÇÃO <i>IN SITU</i> DA MATÉRIA SECA DO GRÃO DE MILHO INTEIRO, COM ADIÇÃO DE DOSES CRESCENTES DE BLEND ENZIMÁTICO. ....	63
TABELA 8 PARÂMETROS CINÉTICOS DE DEGRADAÇÃO <i>IN SITU</i> DA MATÉRIA SECA DO GRÃO DE MILHO QUEBRADO, COM ADIÇÃO DE DOSES CRESCENTES DE BLEND ENZIMÁTICO. ....	64
TABELA 9 PARÂMETROS CINÉTICOS DE DEGRADAÇÃO <i>IN SITU</i> DA MATÉRIA SECA, DE PELLETS-PROTEICO-VITAMÍNICO-MINERAL, UTILIZADOS EM DIETAS DE MILHO GRÃO-INTEIRO, COM ADIÇÃO DE BLEND ENZIMÁTICO. ....	64

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 DEGRADABILIDADE IN VITRO DA MATÉRIA SECA DO MILHO FLOCULADO (MF), MILHO FLOCULADO COM ENZIMA (MFE), MILHO QUEBRADO (MQ), MILHO QUEBRADO COM ENZIMA (MQE). .....	65
FIGURA 2 DIGESTIBILIDADE IN VITRO DA MATÉRIA SECA DO MILHO FLOCULADO (MF), MILHO FLOCULADO COM ENZIMA (MFE), MILHO QUEBRADO (MQ), MILHO QUEBRADO COM ENZIMA (MQE). .....	65
FIGURA 3 VALORES DE PH DO LÍQUIDO RUMINAL DE BOVINOS CONFINADOS COM DIETAS MILHO GRÃO INTEIRO RECEBENDO COM DOSES CRESCENTES DE BLEND ENZIMÁTICO EM FUNÇÃO DO TEMPO DE COLHEITA DO LÍQUIDO. ....	66
FIGURA 4 CONCENTRAÇÕES DE AMÔNIA RUMINAL DE RUMINAL DE BOVINOS CONFINADOS COM DIETAS MILHO GRÃO INTEIRO RECEBENDO COM DOSES CRESCENTES DE BLEND ENZIMÁTICO EM FUNÇÃO DO TEMPO DE COLHEITA. ....	66
FIGURA 5 DEGRADABILIDADE POTENCIAL DA MS DO GRÃO DE MILHO QUEBRADO EM BOVINOS ALIMENTADOS COM NÍVEIS CRESCENTES DE BLEND ENZIMÁTICO.....	67
FIGURA 6 DEGRADABILIDADE POTENCIAL DA MS DO GRÃO DE MILHO INTEIRO EM BOVINOS ALIMENTADOS COM NÍVEIS CRESCENTES DE BLEND ENZIMÁTICO.....	67
FIGURA 7 DEGRADABILIDADE POTENCIAL DA MS DE PELLETS-PROTEICO-VITAMÍNICO-MINERAL, UTILIZADOS EM DIETAS DE MILHO GRÃO-INTEIRO, COM ADIÇÃO DE NÍVEIS CRESCENTES DE BLEND ENZIMÁTICO. ....	68
FIGURA 8 G PRINCIPAIS COMPONENTES DO METABOLOMA DO PLASMA SANGUÍNEO DE BOVINOS MESTIÇOS CONFINADOS COM DIETAS DE MILHO INTEIRO COM DOSES CRESCENTES DE BLEND ENZIMÁTICO, DOSES ENZIMÁTICAS FORNECIDAS DIARIAMENTE TRATAMENTO 1 CONTROLE DIETA SEM ADIÇÃO DE ENZIMA; T2 = DIETA +2,5 GRAMAS DE ENZIMA; T3 = DIETA + 5,0 GRAMAS DE ENZIMA; T4 = DIETA +7,5 GRAMAS DE ENZIMA; T = DIETA +10,0 GRAMAS DE ENZIMA. ....	68
FIGURA 9 . VIP SCORE DOS METABÓLITOS DO PLASMA SANGUÍNEO DE BOVINOS MESTIÇOS CONFINADOS COM DIETAS DE MILHO INTEIRO COM DOSES CRESCENTES DE BLEND ENZIMÁTICO, T1 TRATAMENTO CONTROLE E T3 TRATAMENTO COM 5,0 GRAMAS DE BLEND ENZIMÁTICO DIÁRIO.....	69
FIGURA 10 PRINCIPAIS COMPONENTES DO METABOLOMA DO LÍQUIDO RUMINAL DE BOVINOS MESTIÇOS CONFINADOS COM DIETAS DE MILHO INTEIRO COM DOSES CRESCENTES DE BLEND ENZIMÁTICO, DOSES ENZIMÁTICAS FORNECIDAS DIARIAMENTE TRATAMENTO 1 CONTROLE DIETA SEM ADIÇÃO DE ENZIMA; T2 = DIETA +2,5 GRAMAS DE ENZIMA; T3 = DIETA + 5,0 GRAMAS DE ENZIMA; T4 = DIETA +7,5 GRAMAS DE ENZIMA; T = DIETA +10,0 GRAMAS DE ENZIMA. ....	69
FIGURA 11 VIP SCORE DOS METABÓLITOS DO LÍQUIDO RUMINAL DE BOVINOS MESTIÇOS CONFINADOS COM DIETAS DE MILHO INTEIRO COM DOSES CRESCENTES DE BLEND ENZIMÁTICO, T1 TRATAMENTO CONTROLE, T3 TRATAMENTO COM 5,0 GRAMAS DE BLEND ENZIMÁTICO DIÁRIO. METABÓLITOS PRINCIPAIS (MUDANÇA DO ESPECTRO QUÍMICO - PPM) SELECIONADOS PELO VIP SCORES.....	70

## **ABREVIATÓES**

AGCC – Ácido graxo de cadeia curta

AOAC - Association Of Analytical Chemists

BN - Balanço de compostos nitrogenados

CHODR - Carboidratos degradados no rúmen

CON - Controle

CZ - Cinza

DIVMS - Digestibilidade *in vitro* da matéria seca

FDA - Fibra em detergente ácido

FDN - Fibra em detergente neutro

FDNi – Fibra em detergente neutro indigestível

HCl - Ácido clorídrico

MM - Matéria mineral

MO - Matéria orgânica

MS - Matéria seca

MS - Espectrometria de Massas

NaOH - Hidróxido de sódio

NAR - Nitrogênio amoniacal do líquido ruminal

NBE - Nitrogênio endógeno basal

N-NH<sub>3</sub> – Nitrogênio amoniacal

Nret - Nitrogênio retido

NMR - Ressonância Magnética Nuclear

PB - Proteína bruta

TiO<sub>2</sub> - Dióxido de titânio

## DIETAS DE MILHO GRÃO INTEIRO PARA BOVINOS COM ADIÇÃO DE DOSES DE *BLEND* ENZIMÁTICO

RESUMO - O objetivo da presente proposta de pesquisa visa avaliar o efeito da inclusão de doses crescentes do *blend* enzimático sobre a digestibilidade, parâmetros fermentativos e rede de metabólitos de bovinos de corte confinados, recebendo grão inteiro de milho e diferentes doses de enzimas. No capítulo 2 foram encontrados os seguintes resultados da degradabilidade *in vitro* da matéria seca revelou que não houve diferença significativa entre o milho floculado com e sem a adição do *blend* enzimático. No entanto, para o milho quebrado, houve uma diferença significativa entre os tratamentos. O milho quebrado com a adição de enzima apresentou uma degradabilidade superior, alcançando 70,06%. Isso também é evidenciado na Figura 1, onde se observa uma maior amplitude na variação dos dados quando comparada à média do milho quebrado com adição do *blend* enzimático. Embora o milho floculado tenha mostrado maior degradabilidade em ambos os tratamentos, com uma média superior de 90,52%, a digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) com a adição do *blend* enzimático se sobressaiu independentemente do tipo de processamento utilizado, com digestibilidade 93,78% sobre matéria seca do alimento. No capítulo 3 consumo, independentemente dos níveis de enzimas fornecidos ( $P > 0,05$ ). No entanto, ao avaliar a digestibilidade em relação aos níveis de enzima, observou-se efeito significativo ( $P < 0,05$ ) na Digestibilidade da Matéria Seca (DMS) e na Digestibilidade da Fibra em Detergente Neutro (DFDN) com a dosagem de 7,5 g de enzima. A DMS alcançou 0,8550 g/kg, enquanto a DFDN foi de 0,0836 g/kg. Não houve efeito sobre o pH com as doses crescentes da inclusão do *blend* enzimático. O teor de N-NH<sub>3</sub> foi superior na dose 7,5g de enzima, com valores de 30,88 mg/dL. Sobre o tempo de colheita do líquido ruminal, o pH mostrou-se superior a 6,9 no tempo de 6h com uso da dose de enzima de 5g. No capítulo 4 o perfil metabólico do plasma sanguíneo de bovinos confinados, submetidos a diferentes dosagens de *blend* enzimático. Os metabólitos identificados com maior concentração foram acetato, lactato, alanina, 3-hidroxi-butarato, treonina, ribose, creatina, glicose, glicina e pantotenato. A maioria desses metabólitos apresentou uma maior incidência no tratamento 1 (controle), indicando que a suplementação enzimática não resultou em aumentos significativos na concentração desses compostos no plasma sanguíneo. Para a avaliação do líquido ruminal apenas o succinato e a inosina tiveram maior incidência no tratamento 3 (5 g/dia), enquanto os outros metabólitos foram mais presentes no tratamento controle.

**Palavras-chave:** Digestibilidade, Fermentação, Metabólitos

## **WHOLE CORN GRAIN DIETS FOR CATTLE WITH ADDITION OF ENZYMATICAL BLEND DOSES**

**ABSTRACT** - The objective of this research proposal is to evaluate the effect of increasing doses of an enzyme blend on the digestibility, fermentation parameters, and metabolite network of confined beef cattle receiving whole corn grain and different doses of enzymes. In Chapter 2, the following results were found: the *in vitro* dry matter degradability revealed no significant difference between flaked corn with and without the addition of the enzyme blend. However, for cracked corn, there was a significant difference between treatments. Cracked corn with the addition of the enzyme showed higher degradability, reaching 70.06%. This is also evidenced in Figure 1, where a greater range in data variation is observed compared to the average of cracked corn with the addition of the enzyme blend. Although flaked corn showed higher degradability in both treatments, with an average exceeding 90.52%, the *in vitro* dry matter digestibility (IVDMD) with the addition of the enzyme blend stood out regardless of the processing type used, with a digestibility of 93.78% on a dry matter basis. In Chapter 3, intake was not affected regardless of the enzyme levels provided ( $P>0.05$ ). However, when evaluating digestibility in relation to enzyme levels, a significant effect ( $P<0.05$ ) was observed on Dry Matter Digestibility (DMD) and Neutral Detergent Fiber Digestibility (NDFD) with a dosage of 7.5 g of enzyme. DMD reached 0.8550 g/kg, while NDFD was 0.0836 g/kg. There was no effect on pH with increasing doses of the enzyme blend. The N-NH<sub>3</sub> content was higher at a dose of 7.5g of enzyme, with values of 30.88 mg/dL. Regarding the collection time of ruminal fluid, pH was higher than 6.9 at the 6-hour mark with the use of a 5g enzyme dose. In Chapter 4, the metabolic profile of the blood plasma of confined cattle subjected to different dosages of the enzyme blend was analyzed. The metabolites identified in higher concentration were acetate, lactate, alanine, 3-hydroxybutyrate, threonine, ribose, creatine, glucose, glycine, and pantothenate. Most of these metabolites showed a higher incidence in treatment 1 (control), indicating that enzyme supplementation did not result in significant increases in the concentration of these compounds in the blood plasma. For the evaluation of ruminal fluid, only succinate and inosine had higher incidence in treatment 3 (5 g/day), while the other metabolites were more present in the control treatment.

**Keywords:** Digestibility, Fermentation, Metabolite

**CAPÍTULO 1- DIETAS DE MILHO GRÃO INTEIRO PARA BOVINOS COM ADIÇÃO  
DE DOSES DE *BLEND* ENZIMÁTICO**

## 1. INTRODUÇÃO

Dietas de alta densidade energética têm sido amplamente adotadas por muitos confinamentos no Brasil, visando acelerar o processo de abate e otimizar a operação do sistema de produção (Silvestre & Millen, 2021). O uso de dietas com elevada inclusão de grãos, como o milho, promove maior ganho de peso, melhor eficiência alimentar e características de carcaça superiores, potencializando a rentabilidade da atividade (Preston, 1998; Nunez, 2008).

Nesse contexto, o uso de alto teor de carboidratos não fibrosos (Igarasi et al., 2008) em dietas de acabamento tem como objetivo melhorar a eficiência produtiva, aumentar a densidade energética para atender às exigências de deposição de gordura na carcaça e possibilitar maior desempenho.

Além disso, o uso de aditivos é essencial para melhorar a eficiência do processo fermentativo (Bell et al., 2017) e minimizar distúrbios metabólicos (Azzaz et al., 2015). Portanto, os aditivos devem ser encarados como complementos a programas de alimentação eficazes e não como substitutos de rações balanceadas e boas práticas de manejo alimentar (Mohammed et al., 2018).

No entanto, o aumento das concentrações de amido nas dietas de confinamento pode causar mudanças no trato digestório e minimizar a digestão desse nutriente, resultando em perdas de amido pelas fezes e diminuindo a eficácia na utilização do alimento. Observou-se um aumento de 13,9% no ganho de peso diário em animais suplementados com a adição de amilase em dietas de cordeiros, resultando no melhor aproveitamento do amido (Rubio et al., 2001).

No ambiente ruminal, as enzimas podem agir diretamente sobre as ligações a serem catalisadas ou atuar de forma sinérgica com os microrganismos, potencializando a degradação enzimática microbiana. McAllister et al. (2001) verificaram sinergismo entre enzimas exógenas e microbianas pelo aumento do potencial hidrolítico no meio ruminal. Além disso, algumas enzimas são muito resistentes, transpondo o ambiente ruminal e continuando ativas no abomaso e intestino, auxiliando a digestão dos materiais que sobrevivem à fermentação ruminal (Hristov et al., 2008).

Conseqüentemente, acréscimos da taxa de degradação do alimento no rúmen estão associados à melhora da colonização pelos microrganismos ruminais em função da ação enzimática (Colombatto, 2008). A ação das enzimas promove uma maior disponibilidade de

carboidratos fermentáveis, elevando assim a taxa de fermentação e reprodução microbiana. Essa maior quantidade de microrganismos no rúmen promove uma digestão mais completa da dieta total (Beauchemin et al., 2000).

Além disso, os microrganismos ruminais fazem primeiro a digestão dos carboidratos para subsequentemente utilizar metabólitos de interesse, como glicose, dextrose, pentoses e lactatos, como fonte de energia. Segundo Canuto et al. (2017), metabólitos são produtos intermediários ou finais do metabolismo em uma amostra biológica.

Ademais, utilizando o estudo da Ressonância Magnética Nuclear (RMN), é possível identificar os metabólitos que estão atrelados às características de interesse econômico, sendo uma ferramenta importante para identificar tanto os metabólitos quanto observar a sua dinâmica (Osorio et al., 2012). Analisando a metabolômica, é observada a concentração dos metabólitos, possibilitando correlacionar os metabólitos com as características de interesse dos produtores. O sangue é um dos mais importantes biofluidos para a metabolômica, permitindo observar os metabólitos mais instantâneos que transmitem informações sobre a dinâmica dos nutrientes e de seus metabólitos no metabolismo. O plasma é considerado a amostra que mais traz resultados precisos ao estudo de redes biológicas de micronutrientes.

Contudo, o objetivo da presente proposta de pesquisa visa avaliar o efeito da inclusão do *blend* enzimático sobre a digestibilidade, parâmetros fermentativos e rede de metabólitos de bovinos de corte confinados, recebendo grão inteiro de milho e diferentes doses de enzimas.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Dietas de alto grão em confinamentos**

O destaque dos confinamentos de bovinos destinados à produção de carne no Brasil teve início na década de 80, inicialmente adotando-se uma estratégia produtiva durante o período de entressafra, com um número reduzido de animais. Ao longo dos anos, esse sistema de produção foi impulsionado pela interação entre a agroindústria e a pecuária, sendo amplamente desenvolvido por pecuaristas de médio e grande porte em vários estados do país (Moreira et al., 2009).

A região Centro-Oeste destaca-se como o principal polo de confinamentos devido à logística eficiente na produção de alimentos, custo mais baixo da terra e a disponibilidade de mão de obra mais qualificada (Malafaia, 2014).

Na alimentação e nutrição de bovinos, é importante observar que o milho inteiro apresenta uma menor digestibilidade ruminal (70,8%) em comparação com o amido do milho triturado (91,7%). Vale ressaltar que a digestão do amido no intestino geralmente é baixa, especialmente para grãos triturados. Entretanto, na dieta que inclui o grão inteiro de milho, destaca-se sua importância em estimular o processo de ruminação, sendo que a quantidade de amido presente nessa dieta é significativamente maior do que naquela com silagem (Galyean et al., 1979).

A mastigação do grão de milho se revela como um fator necessário para maximizar a digestão do amido. Para alcançar uma maior produção por animal e aprimorar a eficiência alimentar, tem-se incentivado o uso de uma quantidade substancial de energia na dieta. Um dos fatores que impacta a eficiência de conversão é a redução da utilização do amido em situações de alto consumo de alimento (Wheeler; Noller, 1977).

A dieta adotada destaca-se pela praticidade ao oferecer apenas dois ingredientes aos animais confinados: milho e o pellet composto por concentrado proteico, vitamínico e mineral. Uma estratégia crescentemente empregada pelos confinadores é a utilização de dietas sem volumoso, especialmente durante os últimos 30-40 dias da fase de terminação. Inicialmente, os animais recebem a dieta tradicional de terminação no início do confinamento e, ao se aproximarem do final desta fase, fazem a transição para a dieta de alto grão (Paulino et al., 2013).

A inclusão significativa de milho em dietas de confinamento é motivada pelo elevado teor energético e valor nutricional desse grão (Millen et al., 2009). A opção por dietas de alto grão resulta em um aumento considerável no valor energético, promovendo uma melhoria na eficiência produtiva do rebanho. Isso ocorre devido à redução na quantidade total de matéria seca necessária para atender às demandas de manutenção e produtividade do animal (Santana et al., 2014). Considerando os custos da matéria-prima em cada região, a adoção dessa estratégia pode se tornar uma alternativa economicamente viável (Paulo e Rigo, 2012).

Nas principais regiões produtoras do país, verifica-se que o custo por unidade de energia é geralmente inferior para os grãos, o que favorece a utilização de dietas mais densas ou

"quentes", conforme comumente referido por nutricionistas e pecuaristas envolvidos com confinamento (Paulino et al., 2010). Essa estratégia não apenas otimiza o desempenho dos animais confinados, mas também se destaca como uma abordagem eficaz para maximizar a eficiência alimentar durante o período de confinamento.

## **2.2 Características das Dietas com Elevada Proporção de Grãos**

Os alimentos como milho, trigo, cevada, sorgo e arroz desempenham um papel crucial na alimentação de animais de produção, servindo como fonte primária de energia para impulsionar a produção de carne e leite. Os cereais apresentam teores significativos de amido, variando de 40% da matéria seca (MS), como no trigo, a até 80% da MS, como no arroz. Essa variação nos teores de amido está sujeita a influências do local, condições climáticas e práticas agronômicas específicas (Nozière et al., 2010; Giuberti et al., 2014).

Além disso, dietas com maior concentração energética possibilitam uma maior eficiência na utilização da energia metabolizável para o ganho, resultando em uma maior proporção da energia consumida sendo depositada no corpo, seja na forma de proteína ou gordura (Paulino et al., 2013). A inclusão de quantidades substanciais de grãos de cereais na dieta de bovinos é fundamentada na sua riqueza em amido, o qual desempenha um papel crucial na provisão de energia essencial para a manutenção e o crescimento das bactérias ruminais (Passini et al., 2003).

Nesse contexto, o grão de milho inteiro desempenha uma função essencial nessas rações, não apenas fornecendo energia, mas também promovendo a ruminação, salivação e tamponamento do rúmen. Essa ação reduz o risco de acidose e a queda na taxa de consumo, sem impactar adversamente a produção. O fornecimento de milho inteiro oferece uma camada adicional de segurança, pois a liberação de energia dos grãos está diretamente ligada à extensão da ruminação, além da influência da estrutura física da dieta, que, por seu tamanho de partícula, estimula a ruminação (Grandini, 2009).

Quando se trata de digestão eficiente de grãos de cereais por microorganismos ruminais, faz-se necessária uma adaptação à dieta, onde ocorrerá um equilíbrio de enzimas fibrolíticas, proteolíticas e amilolíticas. O aumento na produção de amilase microbiana em resposta ao fornecimento de grãos de cereais não garante automaticamente uma alta taxa de digestão do amido, pois isso depende da resistência do carboidrato estrutural e de barreiras proteicas que

afetam a digestão microbiana. O amido, componente energético predominante no grão de milho, pode ser fermentado no rúmen ou intestino grosso, além de sofrer digestão no intestino delgado (Henrique et al., 2007).

Adicionalmente, a mastigação desempenha um papel fundamental na otimização do uso do grão, pois, quando não danificados, a digestão pode ser severamente comprometida. A mastigação reduz o tamanho das partículas, liberando nutrientes solúveis para a fermentação, expondo o interior do alimento para a colonização bacteriana e promovendo a hidratação da ingesta durante a salivação. Isso resulta em uma digestão mais eficiente (Berchielli et al., 2011). Durante a ruminação, ocorre a produção significativa de saliva, que é posteriormente deglutida e incorporada ao conteúdo ruminal. O tempo dedicado à ruminação está diretamente relacionado ao teor de fibras na dieta. A presença abundante de tampões endógenos, como bicarbonatos e fosfatos, destaca a saliva como um dos principais mecanismos para manter o pH ruminal.

Além disso, a inclusão de volumoso na dieta proporciona um estímulo mecânico na mucosa, favorecendo o desenvolvimento das papilas e aprimorando a absorção de ácidos graxos voláteis. Portanto, é crucial ajustar o teor de fibras na dieta para equilibrar a saúde do rúmen, minimizando o impacto nos nutrientes e na produtividade do animal (Nagaraja, 2011).

Por outro lado, dietas altamente concentradas provocam alterações significativas no ambiente ruminal, incluindo uma redução notável de bactérias fibrolíticas, um rápido crescimento de bactérias amilolíticas e a diminuição do pH ruminal (Bevans et al., 2005). Dietas com 60% ou mais de concentrados, como grãos, frequentemente resultam em uma redução do pH ruminal abaixo de 6,0. Esse fenômeno pode levar à diminuição das concentrações totais, e, em alguns casos, à eliminação completa de protozoários, embora o *Streptococcus bovis* seja relativamente tolerante à acidez, não sendo tão resistente quanto os *Lactobacillus* sp., cujo crescimento é prejudicado quando o pH está abaixo de 6,0 (Nagaraja e Lechtenberg, 2007).

Portanto, o período de adaptação a uma nova dieta, que implica na modificação do equilíbrio entre volumoso e concentrado, é crucial, pois os microrganismos ruminais envolvidos na metabolização de alimentos fibrosos e amilolíticos demandam diferentes faixas de pH para seu desenvolvimento. Protozoários e bactérias celulolíticas requerem um pH de 6,2 ou mais elevado, enquanto as bactérias amilolíticas são mais ativas em condições ácidas, com um pH em torno de 5,8. Assim, o pH do fluido ruminal influencia diretamente a degradação dos

alimentos, e o valor ideal varia de 5,5 a 7,0. A salivação é uma estratégia utilizada pelos ruminantes para manter o pH do rúmen em níveis mais neutros (Berchielli et al., 2011).

Finalmente, alterações abruptas na dieta podem resultar em acidose aguda ou subaguda. Para mitigar os problemas relacionados à acidose, é crucial implementar o aumento de concentrado na dieta de forma gradual, ao longo de um período de 3 a 4 semanas (Bevans et al., 2005).

### **2.3. Digestão do Amido em Ruminantes**

A digestibilidade do amido em ruminantes é uma característica que exibe considerável variabilidade, sendo influenciada por diversos fatores. A natureza do cereal, a proporção de amilopectina e amilose, a composição da camada externa do grânulo, a presença de uma matriz proteica envolvendo o grânulo de amido e o método de processamento do grão são elementos cruciais. O processo de beneficiamento do grão, capaz de aumentar a área de superfície, intensifica a suscetibilidade do amido à ação enzimática. Essa transformação resulta em um significativo aumento da digestibilidade, tanto no ambiente ruminal quanto no intestino, contribuindo para uma compreensão mais abrangente da eficiência alimentar (Zeoula; Caldas Neto, 2001).

Além disso, compreender os aspectos que afetam a digestibilidade do amido em ruminantes é essencial para o desenvolvimento de estratégias nutricionais mais precisas e eficientes. O reconhecimento da inter-relação entre a composição do grão, métodos de processamento e suas implicações na digestão oferece insights valiosos para aprimorar a qualidade das dietas destinadas a esses animais, promovendo, assim, um aproveitamento mais eficaz dos nutrientes essenciais.

Por outro lado, a degradação do amido em ruminantes constitui um processo intrincado que envolve uma sucessão coordenada de enzimas e eventos mecânicos. Inicialmente, inicia-se com a mastigação, desencadeando a ação da amilase salivar, seguida pela influência da microbiota ruminal. Posteriormente, desdobra-se a hidrólise ácida no abomaso, complementada pela atividade enzimática e a participação de microrganismos ao longo do lúmen intestinal (Swenson; Reece, 1986).

No ecossistema do rúmen, o amido é habilmente degradado e aproveitado por bactérias e protozoários, destacando-se *Ruminobacter amylophilus* e *Streptococcus bovis* como agentes

preeminentes, seguidos por *Prevotella ruminicola* e cepas específicas de *Butyrivibrio fibrisolvens* (cepas 49 e A38; Cotta, 1988). Em adição a estas, outras bactérias como *Bacteroides amylophilus*, *Bacteroides ruminicola*, *Selenomona lactylitica*, *Eubacterium ruminantium*, *Ruminococcus bromii*, *Succinimonas amylolytica* e diversas espécies de *Lactobacillus spp.* também são reconhecidas como fermentadoras de amido (Church, 1979; Kotarski et al., 1992).

Por conseguinte, os processos bioquímicos que conduzem à formação do piruvato e, posteriormente, dos AGCC, geram ATP, sendo este último identificado como a principal fonte de energia para o metabolismo bacteriano. A partir da digestão de carboidratos, como o amido, as bactérias utilizam esses substratos para a síntese de proteína microbiana, bem como para a produção de CO<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub> (Yokohama e Johnson, 1988; Koslosky, 2017).

Apesar de o rúmen ser o principal local de digestão do amido, uma parte desse componente pode escapar da fermentação ruminal. Esse fenômeno pode ser atribuído ao tipo de processamento dos grãos, aos níveis de nutrientes na dieta total e à taxa de passagem, o que possibilita a ocorrência de digestão pós-ruminal (Foley et al., 2006). No intestino delgado, o amido pode ser decomposto até glicose por enzimas de origem pancreática ou pelas enzimas maltase e isomaltase produzidas pela própria mucosa (Huntington et al., 2006). Assim, o processo de degradação do amido em ruminantes, além de evidenciar a complexidade do sistema digestivo desses animais, destaca a notável diversidade de microrganismos que desempenham papéis cruciais na eficiente conversão do amido em substratos metabolicamente acessíveis. Essa compreensão aprofundada do panorama microbiano envolvido nesse processo é crucial para pensar em estratégias nutricionais visando a maximização da eficiência alimentar em sistemas de produção pecuária.

## **2.4 Enzimas na nutrição de ruminantes**

As enzimas são produzidas por células vivas com o propósito de catalisar reações bioquímicas específicas (Gurung et al., 2013). Quando aplicadas como aditivos alimentares, seu objetivo é acelerar reações que resultam na degradação dos substratos em componentes químicos como açúcares simples, aminoácidos e ácidos graxos. Esses componentes são essenciais para promover o crescimento celular, seja dos microrganismos ruminais ou do animal hospedeiro. A ação das enzimas nos processos digestivos desperta grande interesse entre pesquisadores e nutricionistas, que buscam otimizar a produtividade animal através da utilização de preparações enzimáticas (Barletta, 2011).

Desde os anos 80, as enzimas desempenham um papel crucial na melhoria da eficiência na produção de carne e ovos, modificando o perfil nutricional dos ingredientes. Ao degradar componentes específicos da dieta, essas enzimas permitem um maior aproveitamento dos nutrientes, resultando em uma maior eficiência alimentar (Barletta, 2011). Entretanto, o uso de enzimas na alimentação de ruminantes é relativamente limitado, devido à variabilidade nas respostas observadas nos estudos e à diversidade de produtos disponíveis no mercado (Arriola et al., 2017).

O uso de enzimas exógenas pode aumentar a atividade enzimática total no rúmen (Nozière et al., 2014). Contudo, essa capacidade é condicionada à quantidade de enzima aplicada e à sua atividade nas condições ruminais específicas, com pH variando entre 5,5 e 6,8 e temperaturas de  $39 \pm 1^\circ\text{C}$ . Por exemplo, enzimas como as provenientes do *Trichoderma spp.* apresentam atividade ótima em temperaturas mais elevadas e pH mais baixos do que os encontrados no rúmen, o que pode limitar sua eficácia quando aplicadas diretamente (Nozière et al., 2014).

Ao incorporar enzimas exógenas à dieta de vacas em lactação, a população microbiana no rúmen interage de maneira colaborativa com essas enzimas, melhorando fatores como a fixação microbiana ao substrato (Beauchemin et al., 2003; Immanuel et al., 2006). Isso resulta em uma digestibilidade aprimorada da dieta, beneficiando diretamente a produção animal (Sell; Ravindran, 2007).

As considerações sobre as formas de aplicação das enzimas são cruciais, pois algumas enzimas demonstram maior eficiência quando aplicadas em alimentos com maior umidade, como as silagens, enquanto outras são mais eficazes quando adicionadas de forma líquida a alimentos mais secos, como os fenos (Beauchemin et al., 2003; Reddy et al., 2016). De maneira geral, as enzimas mantêm estabilidade no rúmen quando incorporadas aos alimentos, como no concentrado ou na mistura total da ração (TMR), o que contribui para a sua eficácia (Hristov; Mcallister; Cheng, 1998; Morgavi et al., 2001).

A origem das enzimas pode variar entre bactérias, fungos ou leveduras. Por exemplo, a enzima amilolítica, cuja extração da amilase é frequentemente realizada a partir do *Aspergillus oryzae*, desempenha um papel crucial na quebra do amido em açúcares simples como glicose e maltose (Tricarico et al., 2008). Estudos indicam que a suplementação com  $\alpha$ -amilase em dietas

ricas em amido pode modular a fermentação ruminal, alterando as proporções de acetato, butirato e propionato (Tricarico et al., 2005; Klingerman et al., 2009).

A presença de  $\alpha$ -amilase também influencia a dinâmica da população microbiana no rúmen, promovendo um aumento relativo de bactérias produtoras de acetato e butirato, o que pode contribuir para melhorias na eficiência alimentar dos ruminantes (Cotta et al., 1988). Assim, o uso estratégico de enzimas exógenas continua a ser um campo de pesquisa e aplicação importante na nutrição animal, oferecendo potencial para otimizar o desempenho dos animais de produção através da melhoria na digestibilidade e na utilização de nutrientes.

### 3. HIPÓTESE

O uso de enzimas na dieta de milho inteiro para bovinos confinados melhora os processos fermentativos.

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da inclusão do *blend* enzimático sobre a digestibilidade, parâmetros fermentativos e rede de metabólitos de bovinos de corte alimentados com dietas à base de grãos inteiros.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o consumo e digestibilidade de bovinos alimentados com dietas de milho grão inteiro com uso de doses crescentes de *blend* enzimático;
- Avaliar os parâmetros de fermentação ruminal, concentração de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), N-amoniaco (N-NH<sub>3</sub>) e pH;
- Avaliar o perfil metabólico (Untarget) do plasma dos bovinos alimentados com dietas de milho grão inteiro com uso de doses crescentes de *blend* enzimático.

### 4. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

ARRIOLA, K. G.; OLIVEIRA, A. S.; MA, X. Z.; LEAN, I. J.; GIURCANU, M. C.; ADESOGAN, A. T. A meta-analysis on the effect of dietary application of exogenous fibrolytic enzymes on the performance of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 100, p. 1-15, 2017.

- AZZAZ, H.H., MURAD, H.A., MORSY, T.A. Utility of ionophores for ruminant animals: a review. *Asian Journal of Animal Sciences*. v.9, p.254-265, 2015.3
- BARLETTA, A. Introduction: current market and expected developments. In: BEDFORD, M. R.; PARTRIDGE, G. G. (Ed.). *Enzymes in farm animal nutrition*. 2. ed. London, UK: CAB International, p. 1-11.2011.
- BEAUCHEMIN, K. A.; RODE, L. M.; MAEKAWA, M.; MORGAVI, D. P.; KAMPEN, R. Evaluation of a Nonstarch Polysaccharidase Feed Enzyme in Dairy Cow Diets. *Journal of Dairy Science*, v. 83, n. 3, p. 543–553, mar. 2000.
- BEAUCHEMIN, K. et al. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. *Journal of Animal Science*, v. 81, n. 14\_suppl\_2, p. E37–E47, 1 fev. 2003.
- BELL, N.L., ANDERSON, R.C., CALLAWAY, T.R., FRANCO, M.O., SAWYER, J.E., WICKERSHAM, T. A. Effect of monensin inclusion on intake, digestion, and ruminal fermentation parameters by *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* steers consuming bermudagrass hay. *Journal of Animal Science*, v.95, n.6, 2736–2746, 2017.
- BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. (Eds). *Nutrição de Ruminantes*. 2.ed. Jaboticabal: Funep, 2011.
- BEVANS, D. W.; BEAUCHEMIN, K. A.; MCKINNON, J. J.; MCALLISTER, T. A. Effect of rapid or gradual grain adaptation on subacute acidosis and feed intake by feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* v. 83, p. 1116–1132, 2005.
- CANUTO, B. A. G.; COSTA, L. J.; SOUZA, L. R. A.; FACCIO, T. A.; KLASSEN, A.; RODRIGUES, T. K.; TAVARES, M. F. M. *Metabolômica: Definições, Estado – da – arte e aplicações representativas*. 18f. *Quim. Nova*, vol. XY, No. 00,1-17, 200\_ São Paulo. 2017.
- CHURCH, D. C. *Digestive physiology and nutrition of ruminants: digestive physiology*. 2 ed. Corvallis, OR, EUA: [s. n.], 1979.
- COLOMBATTO, D. *Enzymes, direct-fed microbials and plant extracts in ruminant nutrition*. *Animal Feed Science and Technology*, 2008.
- COTTA, M. Amyolytic of selected species of ruminal bacteria. *Applied Environmental Microbiology*, v. 54, p. 772-776, 1988.
- FOLEY, A. E., HRISTOV, A. N., MELGAR, A., ROPP, J. K., ETTER, R. P., ZAMAN, S., HUNT, C. W., HUBER, K., PRICE, W. J. Effect of barley and its amylopectin content on ruminal fermentation and nitrogen utilization in lactating dairy cows. *Journal of Dairy science*, v. 89, p. 4321–4335, 2006.
- GALYEAN, M.L., WAGNER, D.G., OWENS, F.N. Corn particle size and extent of digestion by steers. *J. Anim. Sci.*, 49(1):204-210.1979.
- GIUBERTI, G.; MASOERO, F.; FERRARETO, L. F.; HOFFMAN, P. C.; SHAVER, R. D. Factors affecting starch utilization in large animal food production system: A review. *Starch /Starke*, v. 66, p. 72-90, 2014.
- GRANDINI, D.V. Dietas Contendo Grãos de Milho Inteiro sem Fonte de Volumoso para Bovinos Confinados. In: II SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE NUTRIÇÃO DE RUMINANTES. Anais... Botucatu: FCA-UNESP-FMVZ, p.90-102, 2009.
- GURUNG, N.; RAY, S.; BOSE, S.; RAI, V. A broader view: Microbial enzymes and their relevance in industries medicine, and beyond. *BioMed Research International* ,18 p, 2013
- HENRIQUE, W.; BELTRAME FILHO, J. A.; LEME, P. R.; LANNA, D. P. D.; ALLEONI, G. F.; COUTINHO FILHO, J. L. V.; SAMPAIO, A. A. M. Avaliação da silagem de grãos de milho úmido com diferentes volumosos para tourinhos em terminação. *Desempenho e características de carcaça*. *Rev. Bras. de Zootecnia*, v. 36, n. 1, p. 183–190, 2007.
- HRISTOV, A. N.; BASEL, C. E.; MELGAR, A.; FOLEY, A. E.; ROPP, J. K.; HUNT, C. W.; TRICARICO, J. M. Effect of exogenous polysaccharide-degrading enzyme preparations on ruminal fermentation and digestibility of nutrients in dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*, v. 145, n. 1, p. 182–193, 2008.

- HRISTOV, A. N.; MCALLISTER, T. A.; CHENG, K. J. Stability of exogenous polysaccharide-degrading enzymes in the rumen. *Animal Feed Science and Technology*, v. 76, n. 1–2, p. 161–168, 1 dez. 1998.
- HUNTINGTON, G. B. Starch Utilization by Ruminants: From Basics to the Bunk. *Journal of Animal Science*, v. 75, n. 3, p. 852–867, 1 mar. 1997.
- IGARASI, M.S., ARRIGONI, M.B., SOUZA, A.A SILVEIRA, A.C, MARTINS, C.L., OLIVEIRA, H.N. Desempenho de bovinos jovens alimentados com dietas contendo grão úmido de milho ou sorgo. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.37, n.3, p.513-519, 2008.
- IMMANUEL, G.; DHANUSHA, R.; PREMA, P.; PALAVESAM, A. Effect of different growth parameters on endoglucanase enzyme activity by bacteria isolated from coir retting effluents of estuarine environment. *International Journal of Environmental Science and Technology*, v. 3, p. 25-34, 2006.
- KLINGERMAN, C. M. et al. An evaluation of exogenous enzymes with amylolytic activity for dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 92, n. 3, p. 1050 – 1059, 1 mar. 2009.
- KOTARSKI, S.F.; WANISKA, R.D.; THURN, K.K. Starch hydrolysis by the ruminal
- KOZLOSKI, G.V. *Bioquímica dos ruminantes*. 2 ed. Santa Maria: UFSM. 2009. 214p.
- MALAFAIA, P. A. M. Aspectos nutricionais e clínico-patológicos de bovinos de corte criados sob dois sistemas de confinamento e seu impacto econômico. 60p. Tese 65 (Doutorado). Instituto de Veterinária Programa de pós-graduação em Medicina Veterinária. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2014.
- MCALLISTER, T. A., GIBB, D. J., BEAUCHEMIN, K. A. AND WANG, Y. Starch type, structure and ruminal digestion. In *Cattle Grain Processing Symposium*. Nov. 15\_17, Oklahoma State University, Tulsa. 2006.
- MCALLISTER, T. A.; HRISTOV, A. N.; BEAUCHEMIN, K. A.; RODE, L. M.; CHENG, K.-J. Enzymes in Ruminant Diets. *Enzymes in Farm Animal Nutrition*, p. 273–298, 2001.
- microflora. *Journal of Nutrition*, v.122, p.178-190, 1992.
- MILLEN D, PACHECO R, ARRIGONI M, GALYEAN M, VASCONCELOS J. A. snapshot of management practices and nutritional recommendations used by feedlot nutritionists in Brazil. *Journal of Animal Science*. 87(10):3427-39. 2009.
- MOHAMMED, S. F.; MAHMOOD, F. A.; ABAS, E. R. A review on effects of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as feed additives in ruminants performance. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, v. 2, n. 6, p. 629-635, 2018.
- MOREIRA, S. A.; THOMÉ, K. M.; FERREIRA, P. S.; BOTELHO FILHO, F. B. Análise econômica da terminação de gado de corte em confinamento dentro da dinâmica de uma propriedade agrícola. *Custos e agronegócio on line*, v.5, n.3, p. 132–152, 2009.
- MORGAVI, D. P. et al. Synergy between ruminal fibrolytic enzymes and enzymes from *Trichoderma longibrachiatum*. *Journal of Dairy Science*, v. 83, n. 6, p. 1310 – 1321, 2000.
- NAGARAJA, T. G. Rumen health. In: *Simpósio de Nutrição de Ruminantes – Saúde do Rúmen*, Botucatu. Anais eletrônicos, Botucatu: UNESP, 2011.
- NAGARAJA, T. G.; LECHTENBERG, K. F. Acidosis in Feedlot Cattle. *Veterinary Clinics of North America*, v.23, n.2, p.333–350, 2007.
- NOZIÈRE, P.; STEINBERG, W.; SILBERBERG, M.; MORGAVI, D. P. Amylase addition increases starch ruminal digestion in first-lactation cows fed high and low starch diets. *Journal of Dairy Science*, v. 97, p. 1-10, 2014.
- NUNEZ, A. J. C.; CAETANO, M.; BERNDT, A.; DEMARCHI, J. J. A.; LEME, P. R.; LANNA, D. P. D. Uso combinado de ionóforo e virginamicina em Novilhos Nelore confinados com dietas de alto concentrado. In: *REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA*, 45., 2008, Lavras. Anais... Lavras: Apor Software, 2008. 1 CD-ROM.

- OSORIO, M. T. ET AL. Authentication of beef production systems using a metabolomic-based approach. *Animal*, Cambridge, v. 6, n. 1, p. 167-172, 2012.
- PASSINI, R. et al. Parâmetros de fermentação ruminal em bovinos alimentados com grãos de milho ou sorgo de alta umidade ensilados. *R. Brás. Zootec.*, v.32, n.5, p.1266-1274, out. 2003.
- PAULINO, P. V. R.; OLIVEIRA, T. S.; GIONBELI, M. P.; GALLO, S. B. Dietas Sem Forragem para Terminação de Animais Ruminantes. *Rev. Cient. Prod. Anim*, v. 15, n. 2, p. 161–172, 2013.
- PAULINO, P.V.R.; CARVALHO, J.C.F.; CERVIERI, R.C.; TERÊNCIO, P. VARGAS, A. Estratégias de adaptação de bovinos de corte às rações com teores elevados de concentrado. In: IV CLANA - IV Congresso Latino-Americano de Nutrição Animal. Anais... p.351-362, 2010.
- PAULO, R.E.C; RIGO, J.E. Dietas com milho grão inteiro como alternativa em confinamento sem volumoso. *Cadernos de Pós-Graduação da FAZU/Faculdades Associadas de Uberaba*. Uberaba, MG: FAZU.v.3, 2012.
- PRAKASH, B., VIDYASAGAR, M., MADHUKUMAR, M. S., MURALIKRISHNA, G., SREERAMULU, K. Production, purification, and characterization of two extremely halotolerant, thermostable, and alkali-stable  $\alpha$ -amylases from *Chromohalobacter* sp. *TVSP 101. Process Biochemistry*, 44, 210-215, 2009.
- PRESTON, R. L. Management of high concentrate diets in feedlot. In: SIMPÓSIO SOBRE PRODUÇÃO INTENSIVA DE GADO DE CORTE, 1998, Campinas. Anais... Campinas: CBNA, 1998. p. 82-91.
- ROJO, R., MENDOZA, G. D.; GONZALEZ, S. S; LANDOIS, L.; BARCENA, R.; CROSBY, M. M. Effects of exogenous amylases from *Bacillus licheniformis* and *Aspergillus niger* on ruminal starch digestion and lamb performance. *Animal Feed Science and Technology* , v. 123, p. 655 - 665, 2005.
- RUBIO, R.; MARTÍNEZ, M.; GERMÁN, D.; GALVÁN, C.; MAGDALENA, M. Uso de la amilasa termoestable de *Bacillus licheniformis* en la digestibilidad in vitro del almidón de sorgo y maíz. *Agrociencia*, vol. 35, n4,p. 423-427, 2001.
- SANTANA, A.E. M.; NEIVA, J.N.M.; RESTLE, J.; SOUSA, L. F.; MIOTTO, F.R.C.; ALENCAR, W.M.; SILVA, R.O.; ARAÚJO, V.L. Feeding behavior of crossbred steers fed diets containing babassu mesocarp meal and corn in kernels or ground. *Revista Brasileira de Zootecnia (Online)* v. 43, p. 266-272, 2014.
- SELLE, P. H.; RAVINDRAN, V. Microbial phytase in poultry nutrition. *Animal Feed Science and Technology*, v. 135, p. 1– 41, 2007.
- SILVESTRE, A. M.; MILLEN, D. D. The 2019 Brazilian survey on nutritional practices provided by feedlot cattle consulting nutritionists. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 50, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.37496/rbz5020200189>. Acesso em: 16 jun. 2024.
- SWENSON, M. J.; REECE, W. O. *Dukes: fisiologia dos animais domésticos*. Rio de Janeiro: Guanabara, 856 p, 1986.
- TRICARICO, J. M. et al. Dietary supplementation of ruminant diets with an *Aspergillus Oryzae* - amylase. *Animal Feed Science and Technology* , v. 145, p. 136 – 150, 2008.
- WHEELER, W.E.; NOLLER, C.H. Gastrointestinal tract pH and starch in feces of ruminants. *Journal of Animal Science*, v.44, n.1, p.131-135, 1977.
- ZEOULA, L.M, CALDAS NETO,S.F., Recentes avanços em amido na nutrição de gado leiteiro. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL EM BOVINOCULTURA LEITEIRA, 2., Lavras. Anais...Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2001. p. 249-284,2001.

## **CAPÍTULO 2 – DEGRADABILIDADE E DIGESTIBILIDADE *IN-VITRO* DE DIFERENTES TIPOS DE DIETA EM DISTINTAS DOSAGENS DE *BLEND* ENZIMÁTICO**

**RESUMO** - Este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito do *blend* enzimático comercial Rumizyme® sobre a degradabilidade e digestibilidade *in vitro* em diferentes tipos de dieta (milho floculado e milho quebrado). O experimento foi realizado no Laboratório de Análises de Alimentos (LANA) do setor de Zootecnia da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), no período de junho a agosto de 2021. Foi utilizado um delineamento experimental de blocos ao acaso com arranjo fatorial 2x2, considerando dois tipos de milho (floculado e quebrado) e dois níveis de enzima (5,0g e 0,0g). O produto comercial empregado foi o Rumizyme®, A análise da degradabilidade *in vitro* da matéria seca revelou que não houve diferença significativa entre o milho floculado com e sem a adição do *blend* enzimático. No entanto, para o milho quebrado, houve uma diferença significativa entre os tratamentos. O milho quebrado com a adição de enzima apresentou uma degradabilidade superior, alcançando 70,06%. Isso também é evidenciado nos dados, onde se observa uma maior amplitude na variação dos dados quando comparada à média do milho quebrado com adição do *blend* enzimático. Embora o milho floculado tenha mostrado maior degradabilidade em ambos os tratamentos, com uma média superior de 90,52%, a digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) com a adição do *blend* enzimático se sobressaiu independentemente do tipo de processamento utilizado, com digestibilidade 93,78% sobre matéria seca do alimento. O uso de enzimas exógenas pode realmente fazer a diferença na digestão do milho, especialmente quando consideramos diferentes métodos de processamento. Para o milho floculado, que já tinha uma digestibilidade naturalmente alta, a adição do *blend* enzimático elevou os níveis de aproveitamento ainda mais, superando 90%. Já no caso do milho quebrado, a presença da enzima foi essencial, melhorando a sua digestibilidade. Esses achados ressaltam a importância de entender como a combinação de técnicas de processamento e a suplementação enzimática pode otimizar a nutrição animal, permitindo um melhor aproveitamento dos nutrientes do milho.

**Palavras-chave:** Milho, Enzimas, Nutrição Animal

## 1. INTRODUÇÃO

A pesquisa sobre a suplementação com enzimas exógenas na produção animal visa criar uma sinergia entre as enzimas endógenas e exógenas para melhorar a degradação, digestibilidade e, conseqüentemente, a utilização dos alimentos. Isso resulta em um aumento do valor nutritivo das dietas, especialmente aquelas que incluem silagens e cereais (Young et al., 2012), ingredientes predominantes na alimentação de ruminantes. Enquanto as enzimas fibrolíticas têm recebido maior atenção, há também estudos investigando enzimas amilolíticas e proteolíticas para otimizar a degradação do amido no rúmen, quebrando sua estrutura em partículas menores e reduzindo a proteção da matriz proteica nos grânulos de amido (Rojo et al., 2005; Van Soest et al., 1991).

Devido à diversidade de produtos enzimáticos disponíveis e às condições experimentais variáveis, os resultados do uso de enzimas em ruminantes podem ser inconsistentes. Essas variações vão desde um aumento na liberação de carboidratos solúveis e melhoria na digestibilidade dos alimentos até respostas neutras ou negativas. Tais resultados podem ser atribuídos à não-limitação energética em certos casos, às diferentes características das enzimas suplementadas e à dosagem inadequada da atividade enzimática, bem como ao método inadequado de administração aos animais (Beauchemin et al., 2003).

Todos os animais dependem de enzimas para a digestão dos alimentos, que são produzidas pelo organismo ou por microrganismos no trato digestório. No entanto, a digestão não é um processo completamente eficiente. A inclusão de enzimas amilolíticas na dieta de ruminantes pode melhorar a digestibilidade ruminal do amido e de outros carboidratos (Tricarico et al., 2008; DiLorenzo et al., 2011). Estudos *in vitro* e *in vivo* fornecem diversas evidências de que a adição de enzimas amilolíticas pode aprimorar o desempenho produtivo dos animais.

Com isso, este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito do *blend* enzimático comercial Rumizyme® sobre a degradabilidade e digestibilidade *in vitro* em diferentes tipos de dieta (milho floculado e milho quebrado).

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Desenho experimental

O experimento foi realizado no Laboratório de Análises de Alimentos (LANA) do setor de Zootecnia da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), no período de junho a agosto de 2021. Foi utilizado um delineamento experimental de blocos ao acaso com arranjo fatorial 2x2, considerando dois tipos de milho (floculado e quebrado) e dois níveis de enzima (5,0g e 0,0g). O produto comercial empregado foi o Rumizyme®, composto por Amido de Milho, Alfa Amilase (*Aspergillus niger* - CGMCC 16272), Beta Glucanase (*Trichoderma longibrachiatum* - CGMCC 16278), Celulase (*Trichoderma longibrachiatum* - CGMCC 16277) e Xilanase (*Tricorderma longibrachiatum* - CGMCC 16279).

## **2.2. Dietas e coleta de líquido ruminal**

O inóculo ruminal foi obtido de dois bovinos mestiços adultos, castrados, com peso corporal aproximado de 450 kg. A coleta do líquido ruminal foi realizada pela manhã, antes da primeira refeição, através de cânula ruminal. O líquido ruminal foi mantido em banho-maria a 39 °C e o recipiente foi purgado com CO<sub>2</sub> antes e após a coleta. Foram coletados 4 litros de líquido ruminal, sendo dois litros por animal, misturados e incluindo uma fração sólida do conteúdo ruminal. O material coletado foi transferido para uma garrafa térmica pré-aquecida, previamente purgada com CO<sub>2</sub> e fechada hermeticamente. Em seguida, o material foi filtrado em quatro camadas de tecido de algodão (gaze) e utilizado nas incubações.

Para preparar as soluções de incubação, as soluções A e B foram misturadas na proporção de 1:5, alcançando um pH de 6,8 a uma temperatura constante de 39 °C. Os reagentes utilizados foram os seguintes:

- Solução A: Dihidrogenofosfato de potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 10 g), sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O – 0,5 g), cloreto de cálcio di-hidratado (CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O – 0,1 g) e ureia (0,5 g).
- Solução B: Carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> – 15 g) e sulfeto de sódio (Na<sub>2</sub>S.9H<sub>2</sub>O – 1,0 g).

## **2.3. Degradabilidade e Digestibilidade *in vitro***

A DIVMS das dietas foi determinada de acordo com metodologia descrita por Tilley e Terry (1963) modificada Goering e Van Soest (1970), utilizando o rúmen artificial (DaisyII Fermenter®, Ankom). Foram pesados 0,5 gramas de amostra em saquinhos e TNT - 100 g/m,

cortados e selados a um tamanho de  $5,0 \times 5,0$  cm, conforme Casali *et al.* (2008). Foram utilizados dois saquinhos sem amostra (brancos) em cada jarro para correção dos dados. Os saquinhos com amostra foram colocados nos jarros (duas máquinas de digestibilidade com 4 jarros cada totalizando 8 jarros), distribuídas equitativamente 16 saquinhos/jarro com amostra e 1 saquinho sem amostra (brancos). Em seguida, foi adicionado a solução tampão e o inóculo ruminal e, acrescentado CO<sub>2</sub> para manter as condições anaeróbias. Após este procedimento, os jarros permaneceram no rúmen artificial DaisyII Fermenter® (Ankom) a 39 °C durante 48 horas com agitação contínua de acordo com o método descrito por Tilley and Terry (1963) modificada por Goering and Van Soest (1970).

A incubação foi interrompida após 48 horas, onde os mesmos foram lavados em água corrente para retirada de toda a solução e colocados em estufa de 65°C para secagem, após os mesmos foram pesados para avaliar o desaparecimento de material e identificar a degradabilidade, ao final das pesagens os saquinhos foram submetidos a solução de detergente neutro durante 1 hora. Após a lavagem com esta solução os mesmos foram lavados 2 vezes com água destilada quente e 1 vez com acetona, sendo transferidos para estufa 105 °C por 12 horas. A digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) foi obtida pelo cálculo da diferença entre a concentração do nutriente na amostra antes e depois da incubação.

#### **2.4. Análise Estatística**

Os valores encontrados foram submetidos à avaliação pelo software estatístico SAEG 9,1 (UFV, 2007), aplicando o teste de média de Tukey a 5% de probabilidade.

### **3. RESULTADOS**

A análise da degradabilidade *in vitro* da matéria seca (Tabela 1) revelou que não houve diferença significativa entre o milho floculado com e sem a adição do *blend* enzimático. No entanto, para o milho quebrado, houve uma diferença significativa entre os tratamentos. O milho quebrado com a adição de enzima apresentou uma degradabilidade superior, alcançando 70,06%. Isso também é evidenciado na Figura 1, onde se observa uma maior amplitude na variação dos dados quando comparada à média do milho quebrado com adição do *blend* enzimático.

Embora o milho floculado tenha mostrado maior degradabilidade em ambos os tratamentos, com uma média superior de 90,52%, a digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) com a adição do *blend* enzimático se sobressaiu independentemente do tipo de processamento utilizado, com digestibilidade 93,78% sobre matéria seca do alimento (Tabela 2).

#### 4. DISCUSSÃO

Na rotina de oferta dos cereais na alimentação animal torna-se necessário submê-los a métodos de processamento em moinhos ou rolos, podendo-se associar seu potencial de digestão às condições e o tipo de processamento utilizado. A degradabilidade *in vitro* da matéria seca pode ser relacionada de forma inversamente proporcional ao tamanho de partícula, onde tamanhos menores do grão de milho tem maior área de superfície potencialmente disponível para a ação das bactérias e hidrólise das enzimas (Gallo, et al. 2016).

O endosperma do grão de milho é composto por partículas de amido associados à matriz protéica, junção que ocasiona a formação de uma barreira físico-química que compromete o aproveitamento do amido pelos animais ruminantes. Com a utilização de enzimas exógenas, as barreiras estruturais são rompidas de modo a favorecer a digestibilidade do amido. A melhoria nos resultados da digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) pode ser atribuída à melhoria no aproveitamento do amido que corresponde a 86% da composição do endosperma que está associado à grande parte da matéria seca do grão (Amaro et al., 2021). Assim como a eficiência da digestão desses grãos depende, em grande parte, da intensidade e das condições do processamento (Hoffman et al., 2012).

Pittaluga et al. (2021) avaliou o efeito da adição de diferentes três doses (0; 0,24 e 0,72 unidades da enzima) de glucoamilase (GA) exógena sobre a digestibilidade *in vitro* do milho com dois tamanhos de partículas diferentes (2 e 4mm). Não foram identificadas interações entre as diferentes doses da enzima e o tamanho de partícula sobre a digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS), mas a inclusão da GA exógena aumentou em 13% a DIVMS do milho. A redução do tamanho da partícula aumentou a DIVMS, associando-se o resultado ao fato que o menor tamanho das partículas do milho aumentam a superfície de contato e a disponibilidade do substrato, favorecendo a ação das enzimas exógenas e microbianas.

## 5. CONCLUSÃO

O uso de enzimas exógenas pode realmente fazer a diferença na digestão do milho, especialmente quando consideramos diferentes métodos de processamento. Para o milho floculado, que já tinha uma digestibilidade naturalmente alta, a adição do *blend* enzimático elevou os níveis de aproveitamento ainda mais, superando 90%. Já no caso do milho quebrado, a presença da enzima foi essencial, melhorando a sua digestibilidade. Esses achados ressaltam a importância de entender como a combinação de técnicas de processamento e a suplementação enzimática pode otimizar a nutrição animal, permitindo um melhor aproveitamento dos nutrientes do milho.

## 6. REFERÊNCIAS

- AMARO, F. X. et al. Efeitos de  $\alpha$ -amilases, glucoamilases e proteases exógenas sobre a digestibilidade *in vitro* da matéria seca e do amido, produção de gases, e ácidos graxos voláteis do grão de milho dentado maduro. *Translational Animal Science*. v. 5. ed. 1. p. 222, 2021.
- BEAUCHEMIN, K. A. et al. Uso de enzimas fibrolíticas exógenas para melhorar a utilização de alimentos por ruminantes. *Journal of Animal Science*, v. 81, n. 2, p. 37-47, 2003.
- CASALI, A. O. et al. Influência do tempo de incubação e do tamanho de partículas sobre os teores de compostos indigestíveis em alimentos e fezes bovinas obtidos por procedimentos *in situ*. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 37, p. 335-342, 2008.
- DILORENZO, N. et al. Efeitos do processamento de grãos e suplementação com amilase exógena na digestibilidade de nutrientes em dietas de confinamento. *Livestock Science*, v. 137, p. 178-184, 2011.
- GALO, A. et al. Comunicação breve: O efeito de uma enzima exógena com atividade amilolítica na produção de gases e na degradabilidade ruminal *in vitro* de amido de grãos de milho ou cevada em partículas pequenas e grandes. *Journal of Dairy Science* Vol. 99 No. 5, 2016.
- GOERING, H. K.; VAN SOEST, P. J. Análise de fibras (aparelhos, reagentes, procedimentos e algumas aplicações). *Agricultural Handbook*, 379. USDA, Washington, DC, 1970.
- HOFFMAN, P. C. et al. Uma consulta sobre o tamanho médio efetivo de partículas em milhos secos e de alta umidade. *Journal of Dairy Science*, v. 95, p. 3467-3477, 2012.
- PITTALUGA, A. M. et al. Efeito da inclusão de glucoamilase exógena na fermentação *in vitro* e no desempenho de crescimento de novilhos alimentados com dieta baseada em milho rolado a seco. *Translational Animal Science*, v. 2, pág. txab082, 2021.
- ROJO, R. et al. Efeitos das amilases exógenas de *Bacillus licheniformis* e *Aspergillus niger* na digestão ruminal de amido e no desempenho de cordeiros. *Animal Feed Science and Technology*, v. 123-124, p. 655-665, 7 dez. 2005.
- TILLEY, J. M. A.; TERRY, R. A. Uma técnica de dois estágios para digestão de culturas forrageiras. *Journal of British Grassland Society*, v. 18, p. 104-111, 1963.
- TRICARICO, J. M. et al. Suplementação dietética de dietas de ruminantes com  $\alpha$ -amilase de *Aspergillus oryzae*. *Animal Feed Science and Technology*, v. 145, p. 136-150, 2008.
- VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Métodos para fibra dietética, fibra detergente neutra e polissacarídeos não amiláceos em relação à nutrição animal. *Journal of*

Dairy Science, v. 74, n. 10, p. 3583-3597, 1991. Disponível em:

[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2).

YOUNG, K. M. et al. Efeito de enzimas proteolíticas exógenas na fermentação e valor nutritivo de silagem de milho. *Journal of Dairy Science*, v. 95, n. 11, p. 6687-6694, 2012.

Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5628>.

### **CAPÍTULO 3- AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS FERMENTATIVOS E DA DIGESTIBILIDADE EM BOVINOS COM DIFERENTES DOSES DE BLEND ENZIMÁTICO**

**RESUMO** - O estudo proposto tem como objetivo avaliar os parâmetros fermentativos dos animais, a digestibilidade total aparente e os fatores que impactam a digestibilidade do amido, com doses crescentes de enzimas. Os animais alimentados com o *blend* enzimático não apresentaram variação significativa no consumo, independentemente dos níveis de enzimas fornecidos ( $P>0,05$ ). No entanto, ao avaliar a digestibilidade em relação aos níveis de enzima, observou-se efeito significativo ( $P<0,05$ ) na Digestibilidade da Matéria Seca (DMS) e na Digestibilidade da Fibra em Detergente Neutro (DFDN) com a dosagem de 7,5 g de enzima. A DMS alcançou 0,8550 g/kg, enquanto a DFDN foi de 0,0836 g/kg. Não houve efeito sobre o pH com as doses crescentes da inclusão do *blend* enzimático. O teor de N-NH<sub>3</sub> foi superior na dose 7,5g de enzima, com valores de 30,88 mg/dL. Sobre o tempo de colheita do líquido ruminal, o pH mostrou-se superior a 6,9 no tempo de 6h com uso da dose de enzima de 5g (Figura 3). O ácido acético (50,77mmol/dL) e ácido butírico (10,71mmol/dL) foram superiores na dose de 7,5g do *blend*; já o ácido propiônico (41,01mmol/dL) mostrou-se superior com o uso da dose de 10g do *blend* enzimático. Não houve efeito significativo ( $P>0,05$ ) sobre os parâmetros de fermentação ruminal independentemente das variações de níveis de *blend* enzimático. Os valores médios do balanço de nitrogênio, a excreção de nitrogênio na urina apresentou efeito significativo ( $P<0,05$ ) em relação às diferentes doses enzimáticas. A dose de 7,5g resultou em uma excreção de 2,86g/dia de nitrogênio. Observou-se um aumento na produção de N-NH<sub>3</sub> e doses específicas do *blend*. A digestibilidade da matéria seca e da fibra foi melhorada com a dosagem de 7,5g/dia do *blend* enzimático, a administração das enzimas influenciou o comportamento alimentar e os parâmetros de degradação ruminal *in situ*.

**Palavras-chave:** Amido, Rúmen, Aditivo

## 1. INTRODUÇÃO

Para aprimorar a eficiência produtiva sem causar impactos adversos na saúde ruminal ou induzir acidose ruminal, tecnologias como o processamento e a aplicação de enzimas exógenas podem ser empregadas, aproveitando a alta digestibilidade do amido (Correa et al., 2002). No contexto brasileiro, a escolha da variedade de milho desempenha um papel crucial, pois o milho tipo duro, predominante no país, apresenta menor degradabilidade ruminal em comparação ao milho farináceo. O uso de enzimas na alimentação animal no Brasil começou nos anos 1980, inicialmente focado em aves e suínos, apesar dos custos elevados e eficácia questionável dos aditivos (Barletta, 2011).

A principal fonte de energia para ruminantes é derivada principalmente de polissacarídeos encontrados na parede celular vegetal ou de polissacarídeos de reserva nas plantas, conhecidos como "carboidratos não estruturais". Esses carboidratos incluem frutanos, açúcares e principalmente amido, sendo classificados como carboidratos não fibrosos. O amido, considerado um polissacarídeo não estrutural, é sintetizado pelas plantas e atua como reserva de energia durante a germinação de grãos, períodos de dormência, crescimento, rebrota, além de ser armazenado em caules, raízes, tubérculos e grãos das plantas (Wang et al., 1998).

Beauchemin et al. (2003) destacam que as enzimas exógenas, consideradas extratos naturais, têm um potencial significativo para aprimorar a utilização de nutrientes na dieta, visando melhorar a eficiência produtiva de vacas leiteiras, sem apresentar efeitos prejudiciais à saúde humana. Contudo, a eficiência do processo digestivo não é completa, justificando a adição de enzimas amilolíticas à dieta para aumentar a digestibilidade ruminal de carboidratos, especialmente amido (Tricarico et al., 2008; Dilorenzo et al., 2011).

Animais utilizam enzimas para a digestão alimentar, seja produzidas por eles próprios ou por microrganismos no trato digestório. Enzimas são proteínas catalisadoras produzidas por organismos vivos que aceleram reações químicas específicas, contribuindo para a transformação de macromoléculas em precursores simples utilizados no crescimento celular, seja por microrganismos no rúmen ou pelo próprio animal (Gurung et al., 2013).

Dessa forma, a aplicação de amilase exógena emerge como uma estratégia para aprimorar a disponibilidade de carboidratos fermentáveis no rúmen. O estudo proposto tem como objetivo avaliar os parâmetros fermentativos dos animais, a digestibilidade total aparente e os fatores que impactam a digestibilidade do amido, com doses crescentes de enzimas.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Local, animais e tratamentos

A presente pesquisa foi desenvolvida conforme os princípios estabelecidos pelo Comitê de Ética da Universidade Federal da Grande Dourados (protocolo de aprovação: 023/2015 CEUA / UFGD). O ensaio experimental de campo foi realizado no setor de Nutrição de Ruminantes da Faculdade de Ciências Agrárias, da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), entre os meses de abril e julho de 2022. As demais análises foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal no Laboratório de avaliação de co-produtos de (LAPAC/FINEP).

Foram utilizados 5 novilhos mestiços (Taurino/Zebuino) com aproximadamente 18 meses de idade, castrados e com o peso corporal médio de 350 kg providos de cânula ruminal permanente. Os animais foram mantidos em baias individuais cobertas de 8 m<sup>2</sup> (2x4m), de piso de concreto, contendo comedouro e bebedouros individuais e distribuídos aleatoriamente em quadrado latino 5x5. Cada período experimental foi constituído com 19 dias experimentais, sendo 10 dias de adaptação às dietas e 9 dias de coleta de dados.

As dietas utilizadas foram compostas por 15% de pellet proteico-mineral-vitaminico e 85% de milho inteiro . Os animais foram distribuídos aleatoriamente nos seguintes tratamentos:

- ❖ (T0), tratamento controle;
- ❖ (T2,5), tratamento composto pela dosagem de 2,5g de Enzima;
- ❖ (T5,0), tratamento composto pela dosagem de 5,0 g de Enzima;
- ❖ (T7,5), tratamento composto pela dosagem de 7,5g de Enzima;
- ❖ (T10,0), tratamento composto pela dosagem de 10,0 g de Enzima.

O produto comercial Rumizyme® é composto pelos seguintes ingredientes: Amido de Milho, Alfa Amilase (*Aspergillus niger* - CGMCC 16272, Beta Glucanase (*Trichoderma longibrachiatum* - CGMCC 16278), Celulase (*Trichoderma longibrachiatum* - CGMCC 16277), Xilanase (*Tricorderma longibrachiatum* - CGMCC 16279).

Proporção, composição química dos ingredientes:

Proporção da dieta		
Ingredientes	Concentrados (g/Kg deMS)	
Milho inteiro	850	
Pellet	150	
Composição química (g/kg de MS)		
	Milho grão inteiro	Pellet
MS %	95,24	91,21
MO %	93,88	73,45
PB %	8,13	2,18
FDN %	65,07	41,50
FDA %	4,96	41,54

## 2.2. Ingestão de nutrientes e digestibilidade aparente total

O consumo de matéria seca foi determinada na diferença entre a quantidade da dieta ofertada e na coleta das sobras e também com base na excreção fecal total de MS. Para determinação diária da excreção fecal de MS, o dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) foi fornecido no rúmen via cânula, por dez dias consecutivos, com adaptação ao indicador externo de cinco dias e cinco dias para a coleta (Ferreira et al. 2009). O indicador dióxido de titânio foi acondicionado em cartuchos de papel, seu fornecimento iniciava no segundo dia de cada período experimental, sendo fornecidos 5g/dia às 08h00min.

As amostras fecais (200g) foram coletadas, a partir do 6º dia, diretamente no reto dos animais uma vez por dia em diferentes horários (08h00min, 10h00min, 12h00min, 14h00min e 16h00min) e acondicionadas em bandejas de plásticos, onde foram identificadas e transportadas para o Laboratório de Nutrição Animal e colocadas em estufa à 55° C. Ao final de cada período foi realizada uma amostra composta por animal, retirando-se uma amostra de cada animal por período.

As concentrações de TiO<sub>2</sub> foram analisadas por espectrofotometria UV/Vis, conforme metodologia descrita por Myers et al. (2004), adaptado por Costa (2018). Para a determinação da produção fecal foi utilizada a fórmula:  $EF = OF/COF$ . Em que: EF = Excreção Fecal diária (g/dia); OF = dióxido de titânio fornecido (g/dia) e COF = Concentração de dióxido de titânio nas fezes (g/g MS).

Para avaliação dos coeficientes de digestibilidade aparente total da matéria seca (MS: método 930.15), proteína bruta (PB:  $N \times 6,25$ ; método 984.13) e matéria mineral (MM: método 942.05) conforme metodologias da AOAC (1991). Os teores de fibra em detergente ácido (FDA) e fibra em detergente neutro (FDN) Van Soest et al. (1991) e amido conforme descrito por Hendrix (1993), foram calculados o consumo total de nutrientes e a excreção fecal dos mesmos.

Para determinação da excreção de grão de milho nas fezes, amostras fecais foram coletadas do reto de cada bovino no período da manhã, entre os horários das 9:00 às 11:00 horas, no 16º dia de cada período. Foi realizada pesagem de aproximadamente 300g de fezes em balança analítica, as amostras foram submetidas à lavagem em peneira (Granutest, 2,00 mm, Tyler 9, ABNT 10) de 2 mm com água corrente, as partículas de grão de milho foram coletadas manualmente, pesadas e levadas para estufa com circulação forçada de ar (55°C por 72 horas).

### **2.3. Fermentação ruminal**

No 19º dia, de cada período experimental foram coletadas manualmente amostras para determinação do pH, concentração de nitrogênio amoniacal do líquido ruminal (NAR) e ácidos graxos de cadeia curta, imediatamente antes do fornecimento da dieta e 2, 4, 6, e 8 horas após o fornecimento da dieta, na interface líquido/sólido do ambiente ruminal. Amostras de líquido foram coletadas utilizando uma camada tripla de gaze para filtrar o líquido.

O pH foi determinado imediatamente após a coleta, utilizando um pHmetro digital portátil (Meta Química, Meta 210P). Alíquotas (10-20 mL) dessas amostras foram centrifugadas a 3500 rpm por 5 minutos e coletado 1800uL de sobrenadante, sendo misturadas com 100 uL de uma solução de ácido orto-fosfórico a 20%, todas as amostras foram congeladas para posterior análise de ácidos graxos de cadeia curta. Para determinação do nitrogênio amoniacal, foi separada uma alíquota de 40 mL fixada a 1 ml de HCl 1:1, congelada a -18°C para posterior análise.

A determinação dos teores de N-NH<sub>3</sub> foi realizada conforme o método INCT-CA N-007/1, descrito por Detmann et al. (2012), sem digestão ácida e utilizando-se como base para destilação o hidróxido de potássio (2N), após centrifugação prévia da amostra a 1.000 x g, por 15 minutos.

As amostras para determinação de AGCC, foram encaminhadas para o Laboratório em São Carlos/SP. Na qual, alíquotas (1600 µL) dessas amostras foram misturadas com ácido metanóico (400 µL; 98–100% H<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>), sendo centrifugadas a 7000 × g por 15 min at 4 °C, e o sobrenadante de cada amostra foi congelado para posterior análise de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). Os AGCC do líquido ruminal foram determinados por cromatografia gasosa utilizando um cromatógrafo Shimadzu® GC-2010 Plus equipado com injetor automático AOC-20i, coluna capilar Stabilwax-DA™ (30m, 0,25mm ID, 0,25µm df, Restek®) e detector de ionização de chama (FID), após acidificação das mesmas com 1 M de ácido ortofosfórico p.a. (Ref. 100573, Merck®) e fortificação com mistura de ácidos voláteis livres (Ref. 46975, Supelco®). Após esse procedimento, uma alíquota de 1µL de cada amostra foi injetada com taxa de split de 40:1, utilizando hélio como gás de arraste à velocidade linear de 42 cm.s<sup>-1</sup>, obtendo-se a separação dos analitos em uma corrida cromatográfica de 11,5 minutos. As temperaturas do injetor e do detector foram, respectivamente, 250°C e 300°C e temperatura inicial da coluna de 40 °C. A rampa de temperatura da coluna se iniciou com um gradiente 40 até 120 °C à taxa de 40 °C.min<sup>-1</sup>, seguido de um gradiente de 120 até 180 °C à taxa de 10 °C.min<sup>-1</sup> e de 180 a 240 °C à taxa de 120 °C.min<sup>-1</sup>, mantendo-se a temperatura a 240 °C por mais 3 minutos ao final. Para a quantificação dos analitos, uma calibração do método foi feita com diluições do padrão WSFA-2 (Ref. 47056, Supelco®) e de ácido acético glacial (Ref. 33209, Sigma-Aldrich®) analisadas sob as condições descritas acima. A determinação e a integração dos picos foram feitas utilizando-se o software GCsolution v. 2.42.00 (Shimadzu®).

A produção de metano (mM/L) foi calculada segundo Moss et al. (2000) = 0.45 (C<sub>2</sub>) – 0.275 (C<sub>3</sub>) + 0.4 (C<sub>4</sub>).

#### 2.4. Síntese de proteína microbiana

A coleta de urina foi realizada no 18º dia de cada período experimental na forma “spot”, quatro horas após o fornecimento do suplemento, em micção espontânea dos animais (Chizzotti et al. 2006). Para a determinação da concentração de creatinina, ureia, ácido úrico e alantoína, foi separada uma alíquota com 10 mL de urina diluída em 40 mL de ácido sulfúrico (0,036 N), para evitar a degradação de derivados de purinas e a precipitação do ácido úrico. A segunda alíquota de 40 ml foi armazenada em 1 mL de ácido sulfúrico (36N) e analisada para a determinação da concentração de N total urinário. Todas as amostras foram identificadas e congeladas imediatamente a -18°C para posterior análise.

A determinação da alantoína foi realizada pelo método colorimétrico, conforme técnica de Fujihara et al. (1987), descrita por Chen e Gomes (1992). Para a determinação da concentração de creatinina e ácido úrico foram utilizados kits comerciais (Labtest, Lagoa Santa, Brasil; Gold Analisa Diagnóstica Ltda, Belo Horizonte, Brasil).

A soma das quantidades de alantoína e ácido úrico excretado na urina, expressas em mmol/dia, foi utilizada para calcular a excreção total de derivados de purina (DP). As purinas microbianas absorvidas (Pabs, mmol/dia) foram calculadas a partir da excreção de derivados de purinas na urina (DP, mmol/dia), por meio da equação:  $DP = 0,85 \cdot Pabs + 0,385 \cdot PC_{0,75}$ , em que 0,85 é a recuperação de purinas absorvidas como derivados urinários de purinas e 0,385  $PC_{0,75}$ , a contribuição endógena para a excreção de purinas (Verbic et al. 1990).

O volume total urinário foi determinado por intermédio da relação entre concentração de creatinina na urina e sua excreção por unidade de peso corporal, adotando-se como padrão o valor de 27,36 mg/kg PC (Rennó et al. 2000). As excreções diárias de N-ureia e N-creatinina foram obtidas por meio do produto das concentrações de ureia e creatinina pelo volume urinário de 24 horas, multiplicado por 0,466 ou 0,3715, correspondente aos teores de N na ureia e creatinina, respectivamente. A partir da excreção média diária de creatinina, obtida no experimento em mg/kg PC/dia, e da concentração de creatinina (mg/L) na amostra *spot* de urina, será estimado o volume diário de urina:  $VU \text{ (l/dia)} = (27,36 \times PC) / [\text{creatinina}]$ , onde 27,36 representa o valor da excreção diária média de creatinina, em ppm PC, obtido por Rennó et al. (2000) em novilhos cruzados e zebuínos, PC é o peso corporal do animal e [creatinina] é a concentração de creatinina, em mg/L, encontrada na amostra de urina *spot* dos animais.

O balanço de compostos nitrogenados (BN) foi obtido pela diferença entre o total de nitrogênio ingerido e o total excretado na urina e fezes. As concentrações de N nas amostras de fezes e urina foram determinadas segundo o sistema micro Kjeldahl. A partir destes valores, proceder-se o cálculo para quantificação do nitrogênio retido (NRet), descontando-se do BN o valor estimado da exigência para nitrogênio endógeno basal (NEB), que considera o N endógeno tecidual e as perdas dérmicas de N como 0,35 e 0,018 do peso metabólico, respectivamente.

## 2.5. Metabolismo da ureia e creatinina

No 17º dia experimental, quatro horas após o fornecimento do suplemento, ocorreu a coleta de sangue via punção da veia caudal, utilizando-se heparina como anticoagulante. As amostras foram imediatamente centrifugadas a 5.000 rpm por 15 minutos para separação do sobrenadante sérico, identificadas e armazenadas a -18°C. A determinação da ureia e creatinina plasmática foi realizada através de kit comercial (Gold Analisa® Diagnóstica Ltda).

## 2.6. Degradabilidade *In situ*

Para a determinação da degradabilidade *in situ* no último dia de experimento, os mesmos animais foram mantidos por mais dois dias no confinamento, recebendo as mesmas doses de enzimas do último período experimental (0,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 gramas por dia). Em cada dose, foram avaliados os seguintes alimentos: grão de milho inteiro, grão de milho quebrado e pellet. Os grãos foram quebrados utilizando um moinho de faca, sem peneira, em uma única passagem (Teixeira et al., 2002). Todos os alimentos foram secos em estufas com ventilação forçada a 65°C, por 24h, retirados, colocados em dessecador e pesados. Após pesagem foram colocados em sacos de náilon, de 5 x 10 cm de área livre, com porosidade conhecida de 50 µ, na quantidade aproximada de 5,0 g, respeitando a relação de 20 mg cm<sup>-2</sup> (Nocek, 1988). Os saquinhos foram fechados e colocados em estufa de ventilação forçada a 65°C por 24h, pesados, e colocados em sacolas de filó, com um pequeno peso de chumbo de 100 g, amarrada a linha de náilon de aproximadamente 1,0 m de comprimento livre.

As amostras foram alocadas no rúmen, em ordem decrescente de 48, 24, 12, 6 e 3h (Nrc, 2001), em triplicatas animal-1 tempo-1 de incubação. No tempo de 0h, os saquinhos que continham os alimentos foram pré-incubados num recipiente com água. Os sacos de náilon retirados ao mesmo tempo e lavados em água corrente; os resíduos remanescentes das incubações foram secos em estufa de ventilação forçada a 65°C, por 48h e armazenados, a fim de se determinar as variáveis em estudo.

Os dados sobre desaparecimento da matéria seca foram calculados baseando-se na diferença entre o peso incubado e os resíduos após a incubação. Para a estimativa dos parâmetros cinéticos da MS foi utilizado o modelo assintótico de primeira ordem, proposto por Orskov e McDonald (1979):  $DP = a + b(1 - e^{-ct})$ ; em que DP é a degradabilidade ruminal potencial dos alimentos; “a” é a fração solúvel; “b”, a fração potencialmente degradável da fração insolúvel que seria degradada a uma taxa “c”; “c”, que seria a taxa de degradação da fração “b”; e “t” o tempo de incubação em horas. A fração considerada

indegradável (I) foi calculada segundo:  $I = (100 - (a+b))$ .

Para se estimar a degradabilidade efetiva (DE), foi utilizado o modelo matemático:  $DE = a + [(b * c)/(c + K)]$ ; em que K é a taxa de passagem de sólidos pelo rúmen, definida aqui como sendo de 2, 5 e 8% h<sup>-1</sup>, que pode ser atribuído em nível de consumo alimentar baixo, médio e alto.

Após os dados serem ajustados e utilizando-se o valor de desaparecimento obtido no tempo zero (a'), foi estimado o tempo de colonização (TC) para a MS, PB, foram realizadas da mesma forma que Goes et al. (2008),  $TC = [-\ln(a'-a-b)/c]$ , em que os parâmetros a, b, e c foram estimados pelo algoritmo de Gaus Newton.

## 2.7. Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados através do uso do SAS (Version 9.2. SAS Institute, Cary, NC 2009), onde foi verificado a normalidade dos resíduos e a homogeneidade das variâncias pelo comando PROC UNIVARIATE.

Para os efeitos da avaliação da dieta adotou o seguinte modelo:  $Y_{ijl} = \mu + A_i + P_j + D_l + e_{ijl}$ ; onde  $Y_{ijl}$  = variável dependente,  $\mu$  = média geral,  $A_i$  = efeito de animal ( $i = 1$  a 5),  $P_j$  = efeito do período ( $j = 1$  a 5),  $D_l$  = efeito da dieta e  $e_{ijl}$  = erro experimental.

Os dados de fermentação ruminal foram analisados pelo comando REPEATED do PROC MIXED para avaliação de medidas repetidas no tempo, de acordo com o seguinte modelo:  $Y_{ijk} = \mu + A_i + P_j + D_k + T_y + T_y(D_k) + e_{ijk}$ ; onde:  $Y_{ijk}$  = variável dependente,  $\mu$  = media geral,  $A_i$  = efeito de animal ( $i = 1$  a 5),  $P_j$  = efeito do período ( $j = 1$  a 5),  $D_k$  = efeito do tratamento ( $k = 1$  to 5),  $T_k$  = efeito do tempo ( $k = 1$  a 5),  $T_y(D_k)$  = interação entre dieta e tempo e  $e_{ijk}$  = erro experimental.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo comando PROC MIXED, utilizando o LSMEANS, aplicando-se o teste de média de Tukey a 5% de probabilidade.

## 3. RESULTADOS

Os animais alimentados com o *blend* enzimático não apresentaram variação significativa no consumo, independentemente dos níveis de enzimas fornecidos ( $P > 0,05$ ). No

entanto, ao avaliar a digestibilidade em relação aos níveis de enzima, observou-se efeito significativo ( $P < 0,05$ ) na Digestibilidade da Matéria Seca (DMS) e na Digestibilidade da Fibra em Detergente Neutro (DFDN) com a dosagem de 7,5 g de enzima. A DMS alcançou 0,8550 g/kg, enquanto a DFDN foi de 0,0836 g/kg (Tabela 3).

Não houve efeito sobre o pH com as doses crescentes da inclusão do *blend* enzimático. O teor de N-NH<sub>3</sub> foi superior na dose 7,5g de enzima, com valores de 30,88 mg/dL (Tabela 4). Sobre o tempo de colheita do líquido ruminal, o pH mostrou-se superior a 6,9 no tempo de 6h com uso da dose de enzima de 5g (Figura 3). O ácido acético (50,77mmol/dL) e ácido butírico (10,71mmol/dL) foram superiores na dose de 7,5g do *blend*; já o ácido propiônico (41,01mmol/dL) mostrou-se superior com o uso da dose de 10g do *blend* enzimático (Tabela 4).

Não houve efeito significativo ( $P > 0,05$ ) sobre os parâmetros de fermentação ruminal independentemente das variações de níveis de *blend* enzimático (tabela 4). Os valores médios do balanço de nitrogênio, a excreção de nitrogênio na urina apresentou efeito significativo ( $P < 0,05$ ) em relação às diferentes doses enzimáticas. A dose de 7,5g resultou em uma excreção de 2,86g/dia de nitrogênio (Tabela 5).

Na avaliação do comportamento animal (Tabela 6), observou-se um efeito quadrático significativo ( $P < 0,05$ ) no tratamento com 5 g/dia de enzimas, especificamente nos tempos dedicados à alimentação (133,95 min/dia) e ao ócio deitado (1176,56 min/dia). Além disso, no tratamento com 2,5 g/dia de *blend* enzimático, a suplementação enzimática teve um efeito significativo no comportamento de ruminação dos animais, que passaram menos tempo ruminando deitados (2,23 min/dia).

Para os parâmetros cinéticos de degradação ruminal *in situ* do grão de milho inteiro (Tabela 7), a dose de 7,5g de enzima proporcionou degradação superior da fração “A”, alcançando 9,65%. Já na fração “B”, o melhor resultado foi obtido com a dose de 2,5g, alcançando 7,06%. A degradabilidade efetiva à taxa de passagem de 2% foi superior (12,69%) na dose de 2,5g. Quanto aos parâmetros de degradabilidade efetiva (DE) de 8%, indegradabilidade (I) e tempo de colonização (TC) houve um efeito quadrático com o uso das doses crescentes do *blend* enzimático. A degradabilidade potencial da matéria seca (DPMS) do grão de milho inteiro com a adição de 2,5g do *blend* enzimático resultou valores superiores a 14% após 48 horas no ambiente ruminal (Figura 6).

A cinética de degradação *in situ* do milho quebrado (Tabela 8), a fração “A” apresentou efeito quadrático com as doses crescentes do *blend* enzimático. A fração “B”, degradabilidade efetiva (DE) e indigestibilidade (I%) mostraram melhores valores com o uso da dose 7,5g de enzima. O tempo de colonização (TC) foi inferior no tratamento controle. Na degradabilidade potencial da matéria seca do milho quebrado (Figura 5), a dose de 7,5g apresentou degradação potencial superior a 55% após 48 horas no ambiente ruminal.

A avaliação dos parâmetros cinéticos de degradação *in situ* da matéria seca de *pellets* proteico-vitamínico-mineral (Tabela 9), observou-se que a dose enzimática de 7,5g resultou na maior degradação da fração "A". Para os parâmetros de degradação da fração “B” e degradabilidade efetiva (DE) de 2% os maiores valores (42,61% e 53,32% respectivamente) foram encontrados com o uso da dose de 5g de enzima. A DE de 5% (44,67%) , 8% (41,18%) e a I% (44,66%) foram superiores na dose de 2,5g do *blend* enzimático.

#### 4. DISCUSSÃO

Sutton et al. (2003) investigaram a aplicação de enzimas e observaram resultados positivos quando incorporadas à mistura da dieta total, provavelmente devido ao aumento da ingestão de matéria orgânica digerível. No entanto, não identificaram efeitos significativos ao aplicar as enzimas diretamente no concentrado ou ao infundi-las no rúmen.

As taxas de digestibilidade (DMS) podem ser atribuídas ao fato da dieta ter elevado teor de carboidratos solúveis, resultando em uma alta ingestão de amido, que é prontamente digerido pelos microrganismos ruminais. A dieta altamente fermentável pode suprir a demanda energética dos microrganismos ruminais, resultando em maior eficiência tanto na digestão da matéria seca (DMS) quanto na digestão da fibra em detergente neutro (DFDN).

Mertens (1994) e Conrad et al. (1964) explicam que, em dietas com valores de digestibilidade inferiores a 66%, a ingestão de alimentos é determinada por fatores físicos, relacionados à distensão do rúmen-retículo. Em dietas com digestibilidade superior a 66%, são os fatores fisiológicos que controlam a ingestão, baseados no balanço energético e nutricional da dieta. A DMS e a DFDN permaneceram elevadas em quase todos os tratamentos, demonstrando a eficácia das enzimas e da dieta de alta qualidade no aproveitamento dos nutrientes. Um aumento da atividade enzimática no rúmen pode potencializar a capacidade hidrolítica ruminal, resultando em uma maior digestibilidade de todos os componentes da dieta, em vez de atuar apenas em alvos específicos das enzimas (Beauchemin et al., 2004).

Os valores de pH ruminal corroboram com o proposto por Orskov (1988) e Russell e Wilson (1996). Estes valores são considerados ideais para sustentar a digestão da fibra e a motilidade do rúmen, promovendo a máxima atividade dos microrganismos. A inclusão de enzima amilolítica na dieta pode aumentar a degradação ruminal do amido, elevando a produção de ácidos graxos voláteis (AGV), especialmente de propionato, o que poderia resultar na redução do pH. Salem et al. (2013) avaliaram os efeitos de um mix de enzimas exógenas na digestibilidade dos nutrientes em novilhos de corte e observaram um aumento na digestibilidade da proteína bruta (PB) e da matéria orgânica (MO) devido à suplementação. Colombatto et al. (2007), ao trabalhar com um produto enzimático com potencial atividade de xilanase, concluíram que o efeito da enzima exógena foi mais significativo em pH próximo à neutralidade, sugerindo que a eficácia das enzimas exógenas pode ser influenciada pelo pH ruminal.

Os níveis de N-amoniaco encontrados foram superiores ao mínimo ideal de 5 mg N-NH<sub>3</sub>/100 mL encontrados por Satter e Slyter (1974). As concentrações de N-NH<sub>3</sub> abaixo de 13 mg/100 mL no rúmen podem limitar a disponibilidade de nitrogênio para os microrganismos, prejudicando a ingestão e digestibilidade da fibra. Dietas com energia prontamente disponível no rúmen podem melhorar a utilização do nitrogênio amoniaco e frequentemente reduzem os níveis de amônia no rúmen (Van Soest, 1994). A manutenção adequada dos níveis de N-NH<sub>3</sub> no rúmen é crucial para o crescimento bacteriano, uma vez que 40-100% do nitrogênio necessário aos microrganismos pode ser proveniente do nitrogênio amoniaco (Stern; Hoover, 1979). No entanto, a elevação da concentração ruminal de nitrogênio amoniaco indica perdas nas frações proteicas.

A ausência de grandes alterações na fermentação ruminal encontradas na pesquisa pode estar relacionada com a atividade de alfa-amilase no rúmen (Tabela 4), Klingerman et al. (2009) avaliaram a atividade enzimática de três produtos contendo alfa-amilase e descobriram que a atividade da amilase de um extrato de *Aspergillus oryzae* era de 10 a 25 vezes menor em comparação com outros produtos. Esses testes foram realizados em condições de pH entre 5,1 e 6,3 e temperatura de 40°C, semelhantes ao ambiente ruminal de vacas em lactação com dietas ricas em amido. O estudo também revelou que o pH ideal para a atividade de alfa-amilase desse produto era 5,4.

No entanto, é importante notar que pH próximos de 5 ocorrem durante acidose aguda e valores abaixo de 5,5 são comuns na acidose subclínica (Nagaraja; Town, 1990). Outro fator

que pode ter influenciado a eficácia dos tratamentos é a forma de administração das enzimas; a adição de enzimas à ração parece ser mais eficiente quando aplicadas em forma líquida, ao invés de em pó (Morgavi et al., 2000; Wallace et al., 2001).

## 5. CONCLUSÃO

Observou-se um aumento na produção de N-NH<sub>3</sub> e doses específicas do *blend*. A digestibilidade da matéria seca e da fibra foi melhorada com a dosagem de 7,5g/dia do *blend* enzimático, a administração das enzimas influenciou o comportamento alimentar e os parâmetros de degradação ruminal *in situ*.

## 6. REFERENCIAS

- AOAC, 1990. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis. 15th ed. Arlington, VA: AOAC International.
- BARLETTA, A. Introduction: current Market and expected developments. In: BEDFORD, M. R.; PARTRIDGE, G. G. (Ed.). Enzymes in farm animal nutrition. 2. ed. London, UK: CAB International, 2011. p. 1-11.
- BEAUCHEMIN, K. A. et al., (2003). Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. *Journal of Animal Science*, v. 81, n. 14\_suppl\_2, p. E37-E47, 2003.
- BEAUCHEMIN, K. A.; COLOMBATTO, D.; MORGAVI, D. P.; YANG, W. Z.; RODE, L. M. Mode of action of exogenous cell wall degrading enzymes for ruminants. *Canadian Journal of Animal Science*, v. 84, p. 13-22, 2004.
- CHEN, X.B., GOMES, M.J., 1992. Estimation of Microbial Protein Supply to Sheep and Cattle Based on Urinary Excretion of Purine Derivatives – an Overview of the Technical Details. International Feed Research Unit. Rowett Research Institute, Bucksburn, Aberdeen, UK, pp. 22.
- COLOMBATTO, D.; MOULD, F. L.; BHAT, M. K. et al. Influence of exogenous fibrolytic enzyme level and incubation pH on the *in vitro* ruminal fermentation of alfalfa stems. *Animal Feed Science and Technology*, v. 137, n. 1-2, p. 150-162, 2007.
- CONRAD, H. R.; PRATT, A. D.; HIBBS, J. W. Regulation of feed intake in dairy cows. 1. Change in importance of physical and physiological factors with increasing digestibility. *Journal of Dairy Science*, v. 47, p. 54, 1964.
- CORREA, C. E. S. et al. Relationship between corn vitreousness and ruminal *in situ* starch degradability. *Journal of dairy science*, v. 85, n. 11, p. 3008-3012, 2002.
- CHIZZOTTI, ML, VALADARES FILHO, SC, VALADARES, RFD, CHIZZOTTI, FHM, Campos, JMS, Marcondes, MI, Fonseca, MA, 2006. Intake, digestibility and urinary excretion of urea and purine derivatives in heifers with different body weights. *R. Bras. Zootec.* 35, 1813–1821. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982006000600032>
- DETMANN, E, SOUZA, MA, VALADARES FILHO, SC, QUEIROZ, AC, BERCHIELLI, TT, SALIBA, EOS, CABRAL, LS, PINA, DS, LADEIRA, MM, AZEVEDO, JAG, 2012. Métodos para análise de alimentos. Visconde do Rio Branco: Suprema, 214.
- DILORENZO, N. et al., (2011). Effects of grain processing and supplementation with exogenous amylase on nutrient digestibility in feedlot diets. *Livestock Science*, v. 137, n. 1-3, P. 178-184, 2011.

- ELGHANDOUR, M. M. Y.; SALEM, A. Z. M.; GONZALEZ-RONQUILLOA, M.; BÓRQUEZA, J. L.; GADOB, H. M.; ODONGOC, N. E.; PENUELASA, C. G. Effects of exogenous enzymes on in vitro gas production kinetics and ruminal fermentation of four fibrous feeds. *Animal Feed Science and Technology*, v. 179, p. 46-53, 2013.
- FERREIRA, MA, VALADARES FILHO, SC, MARCONDES, MI, PAIXÃO, ML, PAULINO, MF, VALADARES, RFD, 2009. Avaliação de indicadores em estudos com ruminantes: digestibilidade. *R. Bras. Zootec.* 38, 1568-1573. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982009000800022>
- FUJIHARA, T, ORSKOV, ER, REEDS, PJ, KYLE, DJ, 1987. The effect of protein infusion on urinary excretion of purine derivatives in ruminants nourished by intragastric nutrition. *J. of Agri. Sci.* 109, 7-12. <https://doi.org/10.1017/S0021859600080916>
- GOES, R. H. T. B. et al. Degradabilidade ruminal da matéria seca e proteína bruta de diferentes subprodutos agroindustriais utilizados na alimentação de bovinos. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v. 9, n. 3, p. 715-725, 2008.
- GURUNG, Neelam et al. A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. *BioMed research international*, v. 2013, 2013.
- HENDRIX, DL, 1993. Rapid extraction and analysis of nonstructural carbohydrates in plant tissues. *Crop Science*. v.33, n.6, p.1306-1311. <https://doi.org/10.2135/cropsci1993.0011183X003300060037x>
- KLINGERMAN, C. M.; HU, W.; MCDONELL, E. E.; DERBEDROSIAN, M. C.; KUNG JR., L. An evaluation of exogenous enzymes with amylolytic activity for dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 92, p. 1050-1059, 2009.
- MERTENS, D. R. Regulation of forage intake. In: FAHEY JUNIOR, G. C. (Ed.). *Forage quality, evaluation and utilization*. Madison: Wisconsin, 1994. p. 448-478.
- MORGAVI, D. P.; BEAUCHEMIN, K. A.; NSEREKO, V. L.; RODE, L. M.; IWAASA, A. D.; YANG, W. Z.; MCALLISTER, T. A.; WANG, Y. Synergy between ruminal fibrolytic enzymes and enzymes from *Trichoderma longibrachiatum*. *Journal of Dairy Science*, v. 83, p. 1310–1321, 2000.
- MOSS, A, JOUANY, JP, NEWBOLD, J, 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Annales de zootechnie, INRA/EDP Sciences*,49 (3), pp.231-253. <http://dx.doi.org/10.1051/animres:2000119f>
- MYERS, W.D., LUDDEN, P.A., NAYIGIHUGU, V., HESS, B.W., 2004. Technical note: a procedure for the preparation and quantitative analysis of samples for titanium dioxide. *J. Anim. Sci.* 82, 179-183. <http://dx.doi.org/10.2527/2004.821179x>
- NAGARAJA, T. G.; TOWN, G. Ciliated protozoa in relation to ruminal acidosis and lactic acid metabolism, In: ONEORA, R.; MINATO H. E.; ITABASHI, H. (Ed.). *Rumen ecosystem: microbial metabolism and regulation*. Nova Iorque: Springer-Verlag, 1990. 194 p.
- NOCEK, J. E. In situ and others methods to estimate ruminal protein and energy digestibility. *Journal of Dairy Science*, v. 71, n. 8, p. 2051-2069, 1988.
- NRC - NATIONAL RESEARCH COUNCIL. *Nutrient requirements of dairy cattle*. 7th ed. Washington, D. C.: National Academy Press, 2001.
- ORSKOV, E. R.; McDONALD, I. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *Journal of Agricultural Science*, v. 92, n. 1, p. 499-508, 1979.
- ORSKOV, E. R. *Nutrición proteica de los ruminantes*. Zaragoza: Acribia, 1988. 178 p.
- RENNÓ, LN, VALADARES, RF, VALADARES FILHO, SC, LEÃO, MI, SILVA, JFC, CECON, PR, GONÇALVES, LC, DIAS, HLC, Linhares, RS, 2000. Concentração plasmática de uréia e excreções de uréia e creatinina em novilhos. *R. Bras. Zootec.* 29, 1235-1243. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982000000400038>

- RUSSELL, J. B.; WILSON, D. B. Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH? *Journal Dairy Science*, v. 79, p. 1503-1509, 1996.
- SALEM, A. Z. M.; GADO, H. M.; COLOMBATTO, D.; ELGHANDOUR, M. M. Y. Effects of exogenous enzymes on nutrient digestibility, ruminal fermentation and growth performance in beef steers. *Livestock Science*, v. 154, n. 1-3, p. 69-73, 2013.
- SAS Institute. *Statistical Analysis System Institute Inc. Version 9.2*. Cary, 1042p, 2009.
- SUTTON, J. D.; PHIPPS, R. H.; BEEVER, D. E. et al. Effect of method of application of a fibrolytic enzyme product on digestive processes and milk production in Holstein-Friesian cows. *Journal of Dairy Science*, v. 86, n. 2, p. 546-556, 2003.
- TEIXEIRA, J. C.; SILVA, E. A.; BRAGA, R. A. N.; MORON, I. R. Cinética da digestão ruminal do caroço de algodão e do grão de milho em diferentes formas físicas em vacas da raça Holandesa. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 26, n. 4, p. 842-845, 2002.
- TRICARICO, J. M.; JOHNSTON, J. D.; DAWSON, K. A. Dietary supplementation of ruminant diets with an *Aspergillus oryzae*  $\alpha$ -amylase. *Animal Feed Science and Technology*, v. 145, n. 1-4, p. 136-150, 2008.
- VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, v. 74, p. 3583-3597, 1991. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2).
- VAN SOEST, P. J. *Nutritional Ecology of the Ruminant*. 2. ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994. 476 p.
- VERBIC, J, CHEN, XB, MACLEOD, NA, ØRSKOV, ER, 1990. Excretion of purine derivatives by ruminants. Effect of microbial nucleic acid infusion on purine derivative excretion by steers. *J. Agricultural Sci.* 114, 243-248. <https://doi.org/10.1017/S0021859600072610>
- WALLACE, R. J.; WALLACE, S. J. A.; MCKAIN, N.; NSEREKO, V. L.; HARTNELL, G. F. Influence of supplementary fibrolytic enzymes on the fermentation of corn and grass silages by mixed ruminal microorganisms in vitro. *Journal of Animal Science*, v. 79, p. 1905–1916, 2001.
- WANG, T. L.; BOGRACHEVA, T. Y.; HENDLEY, C. L. Starch: as simple as A, B, C? *Journal of Experimental Botany*, v. 49, p. 481, 1998.

## **CAPÍTULO 4- METABOLÔMICA DO LÍQUIDO RUMINAL E PLASMA SANGUÍNEO EM BOVINOS MESTIÇOS CONFINADOS: EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO ENZIMÁTICA**

**RESUMO** - O objetivo foi investigar os efeitos da inclusão de enzimas na dieta de alto grão para ruminantes sobre a composição dos metabólitos ruminais e plasmáticos, utilizando a técnica da metabolômica para avaliar as alterações nos processos metabólicos e observar as implicações no metabolismo e na eficiência produtiva dos animais. Na avaliação dos principais componentes do metaboloma do plasma sanguíneo, observa-se que os dados são consistentes e não apresentam diferenças significativas entre as dosagens enzimáticas avaliadas. Resultados semelhantes foram observados na análise do metaboloma do líquido ruminal, onde não foram detectadas variações relevantes entre os diferentes tratamentos com *blend* enzimático. perfil metabólico do plasma sanguíneo de bovinos confinados, submetidos a diferentes dosagens de *blend* enzimático. Os metabólitos identificados com maior concentração foram acetato, lactato, alanina, 3-hidroxi-butirato, treonina, ribose, creatina, glicose, glicina e pantotenato. A maioria desses metabólitos apresentou uma maior incidência no tratamento 1 (controle), indicando que a suplementação enzimática não resultou em aumentos significativos na concentração desses compostos no plasma sanguíneo. Para a avaliação do líquido ruminal apenas o succinato e a inosina tiveram maior incidência no tratamento 3 (5 g/dia), enquanto os outros metabólitos foram mais presentes no tratamento controle. Os resultados reforçam a importância da suplementação enzimática na dieta dos ruminantes, embora os resultados específicos aqui discutidos indiquem que as variações para *blend* enzimático não resultaram em alterações substanciais nos perfis metabólicos analisados, tanto no plasma sanguíneo quanto no líquido ruminal.

**Palavras-chave:** Metabolismo, Ruminantes, Suplementação

## 1. INTRODUÇÃO

A inclusão de enzimas na dieta de alto grão para ruminantes e a avaliação de seus efeitos por meio da técnica da metabolômica representam um avanço significativo na nutrição e manejo desses animais. A interação entre a dieta, a microbiota ruminal e os metabólitos resultantes é complexa e dinâmico, exigindo abordagens inovadoras para otimizar a saúde e a produtividade dos ruminantes.

No contexto de dietas ricas em grãos, que substituem carboidratos fibrosos por carboidratos não-fibrosos como amido e açúcares, ocorre uma alteração na produção de ácidos graxos voláteis (AGVs), aumentando a proporção de propionato em relação ao acetato e butirato (Van Soest, 1994). Essa mudança pode influenciar a eficiência energética e o equilíbrio do ambiente ruminal, impactando diretamente a saúde dos ruminantes.

A adição de enzimas na dieta visa melhorar a digestibilidade dos carboidratos e a produção de AGVs benéficos. As enzimas podem degradar mais eficientemente os componentes da dieta, resultando em uma melhor fermentação e absorção dos nutrientes. Essa intervenção enzimática, ao alterar a dinâmica da fermentação ruminal, pode ser monitorada e avaliada através da metabolômica, fornecendo uma visão detalhada dos metabólitos resultantes e permitindo ajustes precisos na formulação da dieta.

A metabolômica, uma ciência ômica que se concentra na análise abrangente e quantitativa dos metabólitos em sistemas biológicos, é uma ferramenta poderosa para entender os efeitos das dietas de alto grão e da inclusão de enzimas. Utilizando técnicas como ressonância magnética nuclear (RMN), cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS), a metabolômica permite a detecção, caracterização e quantificação dos metabólitos (Fontanesi, 2016; Serkova et al., 2019).

Estudos recentes têm demonstrado a aplicação da metabolômica para investigar os efeitos ambientais e fenotípicos na pecuária (Abarghuei et al., 2014; Karisa et al., 2014; Novais et al., 2019; Saleem et al., 2012). No contexto da nutrição de ruminantes, a metabolômica possibilita uma compreensão aprofundada das mudanças nos metabólitos em resposta a diferentes dietas, incluindo aquelas enriquecidas com enzimas. Essa análise permite avaliar comparativamente os níveis de compostos metabólicos entre grupos tratados e controle, elucidando as vias metabólicas envolvidas e os efeitos específicos das intervenções dietéticas (Canuto et al., 2018; Oliveira, Simionato, Cass, 2021).

Portanto, a integração das enzimas na dieta de alto grão dos ruminantes, associada à avaliação detalhada pela técnica da metabolômica, oferece uma abordagem promissora para otimizar a saúde e a eficiência produtiva dos animais. A metabolômica não só fornece uma avaliação precisa dos efeitos das dietas sobre os processos metabólicos, mas também auxilia na formulação de estratégias alimentares mais eficientes, promovendo melhores desempenhos dos ruminantes. Neste sentido o objetivo foi investigar os efeitos da inclusão de enzimas na dieta de alto grão para ruminantes sobre a composição dos metabólitos ruminais e plasmáticos, utilizando a técnica da metabolômica para avaliar as alterações nos processos metabólicos e observar as implicações no metabolismo e na eficiência produtiva dos animais.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Local, animais e tratamentos**

A presente pesquisa foi desenvolvida conforme os princípios estabelecidos pelo Comitê de Ética da Universidade Federal da Grande Dourados (protocolo de aprovação: 023/2015 CEUA / UFGD). O ensaio experimental de campo foi realizado no setor de Nutrição de Ruminantes da Faculdade de Ciências Agrárias, da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), entre os meses de abril a julho de 2022. As demais análises foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal no Laboratório de avaliação de co-produtos de (LAPAC/FINEP).

Foram utilizados 5 novilhos mestiços (Holandês/ Zebu) com 18 meses de idade, castrados e com o peso corporal médio de 350 kg providos de cânula ruminal permanente. Os animais foram mantidos em baias individuais cobertas de 8 m<sup>2</sup> (2x4m), de piso de concreto, contendo comedouro e bebedouros individuais e distribuídos aleatoriamente em quadrado latino 5x5. Cada período experimental foi constituído com 19 dias experimentais, sendo 10 dias de adaptação às dietas e 9 dias de coleta de dados.

As dietas utilizadas foram compostas por 15% de pellet proteico-mineral-vitaminico e 85% de milho inteiro Os animais foram distribuídos aleatoriamente nos seguintes tratamentos: (T0), tratamento controle; (T2,5), tratamento composto pela dosagem de 2,5g de Enzima; (T5,0), tratamento composto pela dosagem de 5,0 g de Enzima; (T7,5), tratamento composto

pela dosagem de 7,5g de Enzima; (T10,0), tratamento composto pela dosagem de 10,0 g de Enzima.

O produto comercial Rumizyme é composto pelos ingredientes: Amido de Milho, Alfa Amilase (*Aspergillus niger* - CGMCC 16272), Beta Glucanase (*Trichoderma longibrachiatum* - CGMCC 16278), Celulase (*Trichoderma longibrachiatum* - CGMCC 16277), Xilanase (*Trichoderma longibrachiatum* - CGMCC 16279)

## 2.2 Coleta de Amostras

No 17º dia experimental, quatro horas após o fornecimento da dieta, ocorreu a coleta de sangue via punção da veia caudal, as amostras foram imediatamente centrifugadas a 5.000 rpm por 15 minutos para separação do sobrenadante sérico, identificadas e armazenadas em -80° C para posteriores análises de perfis metabólicos.

No 19º dia, de cada período experimental foram coletadas manualmente amostras para após 4 horas do fornecimento da dieta, na interface líquido/sólido do ambiente ruminal. Amostras de líquido foram coletadas utilizando uma camada tripla de gaze para filtrar o líquido armazenadas em torno de 5 ml e armazenadas em -80° C para posteriores análises de perfis metabólicos.

## 2.3 Análise em RMN de alto campo (600MHz)

O perfil metabolômico das amostras de plasma e líquido ruminal foram determinados utilizando a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de alta frequência nas dependências da Embrapa Instrumentação, São Carlos, SP. O preparo do plasma e líquido ruminal seguiu protocolo previamente descrito por Beckonert et al. (2007). As amostras de plasma após descongeladas, foram pipetados 200 µL da amostra e 400 µL de solução salina a 0,9% e marcador em microtubos de 2 mL, homogêneos e centrifugados por 12.000 rpm por 5 minutos. Posteriormente, 550 µL da amostra preparada foi transferida para os tubos de 5 mm de RMN e transferidos para o aparelho de 600 MHz para aquisição dos espectros.

### 3. RESULTADOS

Na avaliação dos principais componentes do metaboloma do plasma sanguíneo, observa-se que os dados são consistentes e não apresentam diferenças significativas entre as dosagens enzimáticas avaliadas (Figura 8). Resultados semelhantes foram observados na análise do metaboloma do líquido ruminal, onde não foram detectadas variações relevantes entre os diferentes tratamentos com *blend* enzimático (Figura 10).

A Figura 9 apresenta o perfil metabólico do plasma sanguíneo de bovinos confinados, submetidos a diferentes dosagens de *blend* enzimático. Os metabólitos identificados com maior concentração foram acetato, lactato, alanina, 3-hidroxiacetato, treonina, ribose, creatina, glicose, glicina e pantotenato. A maioria desses metabólitos apresentou uma maior incidência no tratamento 1 (controle), indicando que a suplementação enzimática não resultou em aumentos significativos na concentração desses compostos no plasma sanguíneo.

Na Figura 11, para a avaliação do líquido ruminal, baseada nos metabólitos e nas análises de importância (VIP), destacou os compostos mais relevantes que diferem entre o tratamento controle (T1), sem adição de enzimas, e o tratamento 3 (T3), com adição de 5,0 g/dia de *blend* enzimático. Os compostos incluíram, em ordem de importância: hipurato, betaína, glicose, metionina, aspartato, hipoxantina, acetato, propionato, acetoacetato, succinato, alanina, glicerina, colina, metanol e inosina. Entre esses, apenas o succinato e a inosina tiveram maior incidência no tratamento 3 (5 g/dia), enquanto os outros metabólitos foram mais presentes no tratamento controle.

### 4. DISCUSSÃO

O acetato representa a maior parte dos ácidos graxos voláteis produzidos no rúmen de bovinos alimentados com dietas ricas em grãos, como observado neste estudo. Esse ácido graxo desempenha papéis essenciais no metabolismo energético e na síntese de lipídios, sendo convertido em acetil-CoA para entrar no ciclo do ácido cítrico e participar da produção de energia (Preston e Leng, 1987). Por outro lado, o aumento na produção de ácido láctico pode indicar um desequilíbrio no metabolismo ruminal, particularmente em dietas com alto teor de grãos (McCarthy et al., 2014). A elevação do lactato sanguíneo, conhecida como hiperlactatemia, é associada à acidose láctica, caracterizada pela diminuição do pH sanguíneo devido ao aumento do lactato (Allen & Holm, 2008).

A depuração do lactato ocorre principalmente no fígado e nos rins, onde é convertido de volta em piruvato pela enzima lactato desidrogenase. O piruvato resultante pode ser direcionado para o metabolismo oxidativo no ciclo de Krebs para a produção de ATP ou pode ser convertido em glicose através da gliconeogênese no ciclo de Cori, ajudando a manter a homeostase metabólica em resposta às demandas energéticas do organismo (Allen & Holm, 2008). Neste contexto, o tratamento controle deste estudo, que não recebeu suplementação com *blend* enzimático, demonstrou os melhores resultados em relação à incidência dos metabólitos no plasma sanguíneo, incluindo acetato e lactato. Esses resultados sugerem que, mesmo sem intervenção enzimática, os bovinos conseguiram manter níveis adequados de ácidos graxos voláteis e metabólitos energéticos essenciais, como acetato, enquanto controlavam a produção de lactato, evitando possíveis quadros de acidose láctica.

Quando observamos o metaboloma do líquido ruminal submetido a doses enzimáticas, notamos que o tratamento experimental controle, sem adição do *blend* enzimático, apresentou os melhores resultados em relação à incidência dos metabólitos. Entre os componentes predominantes encontrados no líquido ruminal bovino estão fosfolipídios, íons inorgânicos, gases, aminoácidos, ácidos dicarboxílicos, ácidos graxos, ácidos graxos voláteis, glicerídeos, carboidratos e ésteres de colesterol, que são produtos da fermentação microbiana no ambiente anaeróbico do rúmen (Saleem et al., 2013).

A energia utilizada pelos ruminantes provém principalmente da degradação microbiana ruminal dos alimentos, resultando na produção de ácidos graxos voláteis (AGV), como ácido acético, propiônico e butírico, fundamentais para o metabolismo energético (Perry; Cecava, 2012). O acetato, por exemplo, é um substrato lipogênico chave que, após ser absorvido no sangue, pode ser convertido em 3-hidroxiacetato, oxidado pelo ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) ou utilizado para a síntese de ácidos graxos (Church, 1993). Por sua vez, o propionato é transportado ao fígado onde é oxidado ou entra no ciclo do TCA como succinil-CoA para a síntese de glicose.

Além disso, o ácido propiônico, principal precursor da glicose, contribui com mais de 50% das necessidades gliconeogênicas, enquanto aminoácidos gliconeogênicos, lactato e glicerol são fontes secundárias (González et al., 2017). Estudos anteriores indicaram que a degradação de nutrientes da dieta em maltose pela amilase, seguida pela conversão em glicose por maltase ou maltose fosforilase no rúmen, também promove a produção de piruvato,

essencial para a glicólise e outras vias metabólicas (Friggens et al., 1998; Saleem et al., 2012; Chen et al., 2016).

Esses processos metabólicos refletem não apenas a importância dos carboidratos na dieta dos ruminantes, mas também suas consequências na microbiota ruminal e nas vias metabólicas, evidenciando como dietas ricas em carboidratos podem influenciar significativamente o perfil dos metabólitos no líquido ruminal (Khafipour et al., 2009; Ametaj et al., 2010).

No estudo, o tratamento 3 (com adição de 5 g/dia de *blend* enzimático) apresentou uma maior incidência de succinato no líquido ruminal em comparação ao tratamento controle, que não recebeu suplementação enzimática. Este aumento significativo de succinato no tratamento 3 sugere uma alteração metabólica induzida pela adição do *blend* enzimático, possivelmente influenciando a atividade bacteriana ruminal responsável pela produção deste metabólito (Ushida et al., 1985; Weimer, 1998). Por outro lado, o tratamento controle, apesar de não receber a suplementação enzimática, destacou-se pela predominância de outros metabólitos no líquido ruminal.

O succinato é um precursor importante do propionato, que tem como destino principal a gliconeogênese em ruminantes (Van Gylswyk, 1995; Yost et al., 1977). No ambiente anaeróbico do rúmen, bactérias como *Fibrobacter succinogenes* são responsáveis pela produção de succinato, que posteriormente pode ser convertido em propionato por bactérias como *Selenomonas ruminantium* (Ushida et al., 1985; Weimer, 1998). Esse processo de conversão do succinato em propionato envolve uma série de reações multienzimáticas que utilizam a coenzima A (CoA), começando com a ligação do succinato ao CoA, seguida pela isomerização para metilmalonil-CoA, conversão para proponil-CoA e, finalmente, a produção de propionato (Wirth et al., 2018). O propionato pode ser absorvido pelo epitélio ruminal e transportado ao fígado, onde é utilizado na síntese de glicose através da gliconeogênese.

## 5. CONCLUSÃO

Os resultados reforçam a importância da suplementação enzimática na dieta dos ruminantes, embora os resultados específicos aqui discutidos indiquem que as variações para *blend* enzimático não resultaram em alterações substanciais nos perfis metabólicos analisados, tanto no plasma sanguíneo quanto no líquido ruminal.

## 6. REFERÊNCIAS

- ABARGHUEI, M. J.; ROUZBEHAN, Y.; SALEM, A. Z. M.; ZAMIRI, M. J. Nitrogen balance, blood metabolites and milk fatty acid composition of dairy cows fed pomegranate-peel extract. *Livestock Science*, Amsterdam, v. 164, p. 72–80, 2014.
- ALLEN, S. E.; HOLM, J. L. Lactate: Physiology and clinical utility. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, v. 18, n. 2, p. 123–132, 2008.
- AMETAJ, B. N. et al. A metabolômica revela alterações prejudiciais no metabolismo ruminal com aumento da proporção de grãos de cereais na dieta de vacas leiteiras. *Metabolômica*, v. 6, p. 583–94, 2010. doi: 10.1007/s11306-010-0227-6.
- BECKONERT, O. et al. Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nature Protocols*, v. 2, n. 11, p. 2692–2703, 25 out. 2007.
- CANUTO, G. A. B. et al. Metabolômica: definições, estado-da-arte e aplicações representativas. *Química Nova*, v. 41, n. 1, p. 75–91, 1 jan. 2018.
- CHURCH, D. C. O animal ruminante: fisiologia digestiva e nutrição. Ed. Rev. Waveland, 1993.
- FONTANESI, L. Metabolomics and livestock genomics: Insights into a phenotyping frontier and its applications in animal breeding. *Animal Frontiers*, v. 6, n. 1, p. 73–79, 2016.
- FRIGGENS, N. C. et al. Ingestão de ração relativa ao estágio de lactação para vacas leiteiras que consomem dietas mistas totais com alta ou baixa proporção de concentrado para forragem. *Journal of Dairy Science*, v. 81, p. 2228–2239, 1998. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(98)75802-3.
- KARISA, B. K. et al. Plasma metabolites associated with residual feed intake and other productivity performance traits in beef cattle. *Livestock Science*, Amsterdam, v. 165, p. 200–211, 2014.
- MCCARTHY, S. D. et al. Enhanced acetate clearance by *Candida lipolytica* does not alleviate acidosis but does increase amino acid utilization. *Journal of Dairy Science*, v. 97, n. 11, p. 6906–6915, 2014.
- MICHAUD, M. R.; DENLINGER, D. L. Mudanças nos pools de carboidratos, polióis e aminoácidos durante o rápido endurecimento pelo frio e o endurecimento pelo frio associado à diáspausa em moscas da carne (*Sarcophaga crassipalpis*): uma comparação metabolômica. *J Comp Physiol B*, v. 177, p. 753–63, 2007. doi: 10.1007/s00360-007-0172-5.
- NOVAIS, F. J. et al. Identification of a metabolomic signature associated with feed efficiency in beef cattle. *BMC Genomics*, Heidelberg, v. 20, p. 1–10, 2019.
- OLIVEIRA, R. V.; SIMIONATO, A. V. C.; CASS, Q. B. Enantioselectivity effects in clinical metabolomics and lipidomics. *Molecules*, v. 26, n. 17, 2021.
- PAN, X. H. et al. Relação entre tiamina e acidose ruminal subaguda induzida por dieta rica em grãos em vacas leiteiras. *J Dairy Sci*, v. 99, p. 8790–8801, 2016. doi: 10.3168/jds.2016-10865.
- PERRY, T. W.; CECAVA, M. J. *Beef Cattle Feeding and Nutrition*. 2. ed. Eds. Tilden Wayne Perry and Michael J. Cecava. Academic Press, 2012.
- PRESTON, T.R.; LENG, R.A. Matching ruminant production systems with available resources in the tropics and sub-tropics. Armidale, NSW: Penambul Books, 1987.
- SALEEM, F. et al. A metabolomics approach to uncover the effects of grain diets on rumen health in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, Lancaster, v. 95, p. 6606–6623, 2012. doi: 10.3168/jds.2012-5403.
- SALEEM, F., Bouatra, S., Guo, A. C., Psychogios, N., Mandal, R., Dunn, S. M., Ametaj, B. N., Wishart, D. S. The bovine ruminal fluid metabolome. *Metabolomics*, v. 9, p. 360–378, 2013.

- SERKOVA, N. J.; DAVIS, D. M.; STEINER, J.; AGARWAL, R. Quantitative NMR-based metabolomics on tissue biomarkers and its translation into in vivo magnetic resonance spectroscopy. *Methods in Molecular Biology*, v. 1978, p. 369-387, 2019.
- SMIRNOV, Kirill S. et al. Challenges of metabolomics in human gut microbiota research. *International Journal of Medical Microbiology*, v. 306, n. 5, p. 266-279, 2016.
- USHIDA, K., MIYAZAKI, A., & KAWASHIMA, R. Effect of monensin on ruminal VFA and gas [methane] production of sheep fed high concentrate diet. *Japanese Journal of Zootechnical Science*, v. 56, p. 822–826, 1985. <https://doi.org/10.2508/chikusan.56.822>
- VAN GYLSWYK, N. *Succiniclasticum ruminis* gen. nov., sp. nov., a ruminal bacterium converting succinate to propionate as the sole energy-yielding mechanism. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 45, p. 297–300, 1995.
- WEIMER, P. J. Manipulating ruminal fermentation: A microbial ecological perspective. *Journal of Animal Science*, v. 76, p. 3114–3122, 1998.
- WIRTH, R., KÁDÁR, G., KAKUK, B., MARÓTI, G., BAGI, Z., SZILÁGYI, Á., et al. The planktonic core microbiome and core functions in the cattle rumen by next generation sequencing. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, p. 2285, 2018.
- YOST, W. M., YOUNG, J. W., SCHMIDT, S. P., & MCGILLIARD, A. D. Gluconeogenesis in ruminants: Propionic acid production from a high-grain diet fed to cattle. *The Journal of Nutrition*, v. 107, p. 2036–2043, 1977.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Degradabilidade *in vitro* da matéria seca do milho grão quebrado e floculado, com adição de *blend* enzimático.

Milho	Enzima		Média
	Sem	Com	
Floculado	89,68Aa	91,34Aa	90,52
Quebrado	52,66Bb	70,06Ab	61,36
Média	71,18	80,70	-

As médias seguidas por letras maiúsculas na linha, diferem entre si pelo teste de F

As médias seguidas por letras minúsculas na coluna, diferem entre si pelo teste de F

Tabela 2 Digestibilidade *in vitro* da matéria seca do milho grão quebrado e floculado, com adição de *blend* enzimático.

Milho	Enzima		Média
	Sem	Com	
Floculado	94,62	95,78	95,17a
Quebrado	90,35	91,83	91,10b
Média	92,52B	93,78A	

As médias seguidas por letras maiúsculas na linha, diferem entre si pelo teste de F

As médias seguidas por letras minúsculas na coluna, diferem entre si pelo teste de F

Tabela 3 Consumo e digestibilidade aparente de nutrientes de bovinos confinados com dietas milho grão inteiro recebendo com doses crescentes de *Blend* Enzimático

	Doses de enzima (g/dia)					EPM	P		
	0	2,5	5	7,5	10		ENZ	L	Q
<b>Consumo (g/Kg)</b>									
CMS	82.540	102.632	118.000	113.850	90.380	18.622	0.4308	0.5802	0.0689
CMO	78.810	99.145	114.030	109.730	86.730	18.178	0.4144	0.5770	0.0640
CPB	10.130	10.152	11.560	11.720	10.130	0.1483	0.7872	0.6961	0.3486
CFDN	29.456	36.089	41.389	40.083	32.008	0.6431	0.4550	0.5895	0.0761
<b>Digestibilidade (g/Kg)</b>									
DMS	0.5740	0.8099	0.8340	0.8550	0.7380	0.06059	0.0002	0.0088	<.0001
DMO	0.5980	0.8296	0.8430	0.8660	0.7590	0.05560	<.0001	0.0060	<.0001
DPB	0.7850	0.8451	0.8600	0.8590	0.8070	0.03645	0.1008	0.4365	0.0087
DFDN	0.6269	0.8118	0.8665	0.8836	0.7841	0.05267	0.0009	0.0063	0.0004
<b>Excreção (%)</b>									
RECMF %	630.340	420.260	585.440	499.760	584.720	46.547	0.6641	0.9729	0.4122

Doses enzimáticas fornecidas diariamente **0** = Tratamento controle dieta sem adição de

enzima; **2,5** = dieta +2,5 gramas de enzima; **5,0** = dieta + 5,0 gramas de enzima; **7,5** = dieta

+7,5 gramas de enzima; **10** = dieta +10,0 gramas de enzima.

Tabela 4 Parâmetros de fermentação ruminal em bovinos confinados com dietas milho grão inteiro recebendo com doses crescentes de *Blend* Enzimático.

	Doses de enzima (g/dia)					EPM	P		
	0	2,5	5	7,5	10		ENZ	L	Q
	<i>mg/dL</i>								
pH	6,43	6,32	6,56	6,4	6,28	0.0405	0.1995	0.4565	0.2139
NH3	29,24	27,09	29,52	30,88	29	12.405	0.7129	0.5763	0.9428
	<i>mmol/L</i>								
Acético	48.62	46.48	44.55	50.73	42.35	13.835	0.3483	0.3995	0.7049
Propiônico	41.48	36.26	37.32	27.38	41.01	25.560	0.4057	0.5825	0.2101
Butírico	11.27	8.08	8.06	10.71	7.09	0.6058	0.1163	0.1711	0.7151
Isobutírico	0.61	0.54	0.74	0.54	0.66	0.0304	0.1641	0.6227	0.8842
Valérico	1.60	1.08	2.11	1.46	2.08	0.1779	0.3033	0.2793	0.6882
isovalérico	2.27	1.36	2.40	2.42	2.01	0.1563	0.1634	0.6245	0.9843
C2/c3	1.43	1.56	1.55	2.24	1.23	0.1170	0.0662	0.7099	0.0980
total	105.87	93.83	95.21	93.26	95.21	35.883	0.7903	0.3921	0.4149

Doses enzimáticas fornecidas diariamente 0 = Tratamento controle dieta sem adição de enzima; 2,5 = dieta +2,5 gramas de enzima; 5,0 = dieta + 5,0 gramas de enzima; 7,5 = dieta +7,5 gramas de enzima; 10 = dieta +10,0 gramas de enzima.

Tabela 5 Valores médios do balanço de nitrogênio em novilhos recebendo dietas a base de milho grão inteiro e níveis crescentes de *blend* enzimático.

Item	Níveis de enzima g/dia					EPM	P		
	0	2,5	5	7,5	10,0		ENZ	L	Q
	<i>Consumo (g/dia)</i>								
N-consumido	162.12	162.30	184.91	187.98	161.95	237.198	0.7794	0.6931	0.3458
	<i>Excreção (g/dia)</i>								
N-fezes	25.92	23.36	24.39	24.98	28.04	28.014	0.6832	0.4335	0.2245
N-urina	9.92	9.52	7.28	2.86	6.25	12.816	0.0024	0.0013	0.2667
	<i>Balanço (g/dia)</i>								
NEB	4.17	4.22	4.19	4.17	4.10	0.1226	0.9760	0.6340	0.6496
N-retido	140.42	140.21	168.78	180.29	147.09	241.453	0.5201	0.4051	0.2757
N-absorvido	144.59	144.43	172.97	184.47	151.20	241.217	0.5204	0.4068	0.2746

Doses enzimáticas fornecidas diariamente 0 = Tratamento controle dieta sem adição de enzima; 2,5 = dieta +2,5 gramas de enzima; 5,0 = dieta + 5,0 gramas de enzima; 7,5 = dieta +7,5 gramas de enzima; 10 = dieta +10,0 gramas de enzima.

Tabela 6 Comportamento dos animais suplementados com dieta contendo milho em grão e adição de doses crescentes de *blend* enzimático (g/dia).

Item	Níveis de enzimas g/dia					EPM	Valor de P		
	0	2,5	5	7,5	10		Enz	Linear	Quad
	<i>Minutos/dia</i>								
Alimentando	236.65	171.91	133.95	154.05	200.93	145.390	0.1810	0.3632	0.0241
Bebendo	35.72	29.02	31.25	40.18	33.48	31.887	0.8043	0.7585	0.7949
Ruminando em pé	60.279	55.81	37.95	44.65	49.11	54.335	0.6011	0.3304	0.2984
Ruminando deitado	13.39	2.23	3,57	4.46	11.16	25.027	0.2936	0.8887	0.0365
Ruminando total	73.67	58.04	37.95	49.12	60.27	61.816	0.2940	0.3381	0.0649
Ócio em pé	80.37	104.93	60.27	31.25	84.83	204.921	0.6066	0.5496	0.5648
Ócio deitado	1013.58	1076.09	1176.56	1165.40	1060.47	153.479	0.0352	0.1499	0.0066
Ócio total	1093.95	1181.02	1236.84	1196.65	1145.30	187.601	0.0807	0.2866	0.0097

Doses enzimáticas fornecidas diariamente 0 = Tratamento controle dieta sem adição de enzima; 2,5 = dieta +2,5 gramas de enzima; 5,0 = dieta + 5,0 gramas de enzima; 7,5 = dieta +7,5 gramas de enzima; 10 = dieta +10,0 gramas de enzima

Tabela 7 Parâmetros Cinéticos de degradação *in situ* da matéria seca do grão de milho inteiro, com adição de doses crescentes de *blend* enzimático.

	Níveis de Enzima				
	0	2,5	5	7,5	10
<b>A (%)</b>	7,62	7,65	8,75	9,65	8,9
<b>B (%)</b>	4,44	7,06	4,43	5,27	4,25
<b>C</b>	0,1986	0,05	0,0631	0,00162	0,0331
<b>DE 2%</b>	11,65	12,69	12,11	10,04	11,55
<b>DE 5%</b>	11,17	11,18	11,22	9,82	10,59
<b>DE 8%</b>	10,79	10,37	10,7	9,75	10,14
<b>I (%)</b>	87,94	85,29	86,82	85,08	86,85
<b>TC (horas)</b>	3,11	4,95	4,25	8,09	4,86

A= fração solúvel, B= Fração potencialmente degradável, c=taxa de degradação da fração "b"; DE = Degradabilidade efetiva, I= Indegradabilidade; Doses enzimáticas fornecidas diariamente 0 = Tratamento controle dieta sem adição de enzima; 2,5 = dieta +2,5 gramas de enzima; 5,0 = dieta + 5,0 gramas de enzima; 7,5 = dieta +7,5 gramas de enzima; 10 = dieta +10,0 gramas de enzima.

Tabela 8 Parâmetros Cinéticos de degradação *in situ* da matéria seca do grão de milho quebrado, com adição de doses crescentes de *blend* enzimático.

	Níveis de Enzima				
	0	2,5	5	7,5	10
<b>A (%)</b>	8,03	11,25	9,86196	12,95	10,197
<b>B (%)</b>	29,9	32,17	44,3316	54,96	29,093
<b>C</b>	0,0941	0,0781	0,06273	0,0351	0,078
<b>DE 2%</b>	32,69	36,86	43,48	47,96	33,35
<b>DE 5%</b>	27,56	30,86	34,53	35,62	27,93
<b>DE 8%</b>	24,19	27,14	29,35	29,71	24,56
<b>I (%)</b>	62,07	56,58	45,80644	32,09	60,71
<b>TC (horas)</b>	5,76	6,02	6,56	7,36	5,92

A= fração solúvel, B= Fração potencialmente degradável, c=taxa de degradação da fração “b”; DE = Degradabilidade efetiva, I= Indegradabilidade; Doses enzimáticas fornecidas diariamente 0 =Tratamento controle dieta sem adição de enzima; 2,5 = dieta +2,5 gramas de enzima; 5,0 = dieta + 5,0 gramas de enzima; 7,5 = dieta +7,5 gramas de enzima; 10 = dieta +10,0 gramas de enzima.

Tabela 9 Parâmetros Cinéticos de degradação *in situ* da matéria seca, de pellets-proteico-vitamínico-mineral, utilizados em dietas de milho grão-inteiro, com adição de *blend* enzimático.

	Níveis de Enzima				
	0	2,5	5	7,5	10
<b>A (%)</b>	19,94	24,17	21,22	25,36	15,59
<b>B (%)</b>	33,66	31,17	42,61	37,01	32,51
<b>C</b>	0,1276	0,0961	0,0611	0,0114	0,1592
<b>DE 2%</b>	49,04	49,97	53,32	38,8	44,47
<b>DE 5%</b>	44,12	44,67	44,65	32,23	40,33
<b>DE 8%</b>	40,63	41,18	39,67	29,98	37,23
<b>I (%)</b>	46,4	44,66	36,17	37,63	51,9
<b>TC (horas)</b>	5,58	5,78	6,55	8,09	5,32

A= fração solúvel, B= Fração potencialmente degradável, c=taxa de degradação da fração “b”; DE = Degradabilidade efetiva, I= Indegradabilidade; Doses enzimáticas fornecidas diariamente 0 =Tratamento controle dieta sem adição de enzima; 2,5 = dieta +2,5 gramas de enzima; 5,0 = dieta + 5,0 gramas de enzima; 7,5 = dieta +7,5 gramas de enzima; 10 = dieta +10,0 gramas de enzima.

## LISTA DE FIGURAS

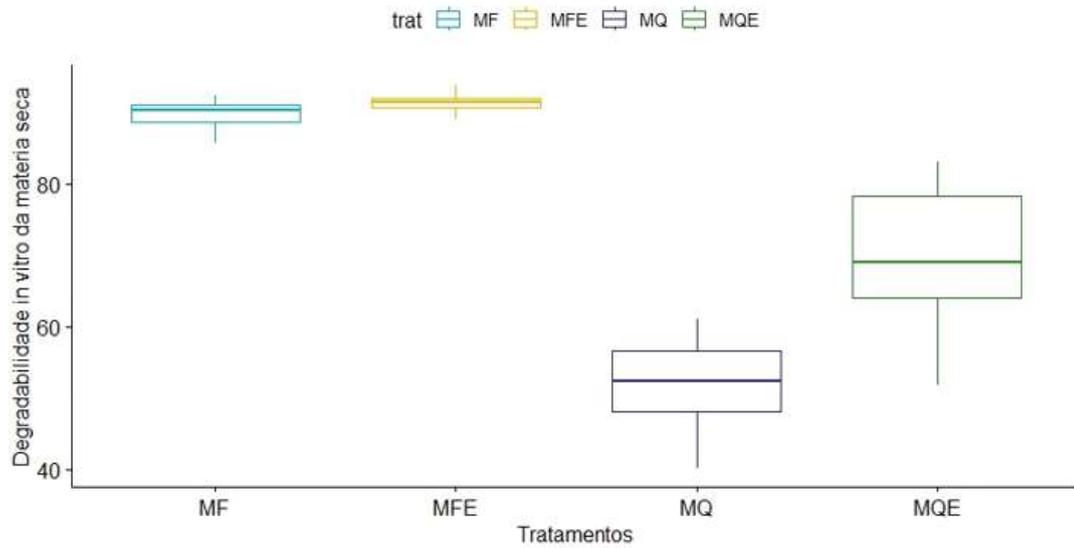


Figura 1 Degradabilidade *in vitro* da matéria seca do Milho Floculado (MF), Milho Floculado com Enzima (MFE), Milho Quebrado (MQ), Milho Quebrado com Enzima (MQE).

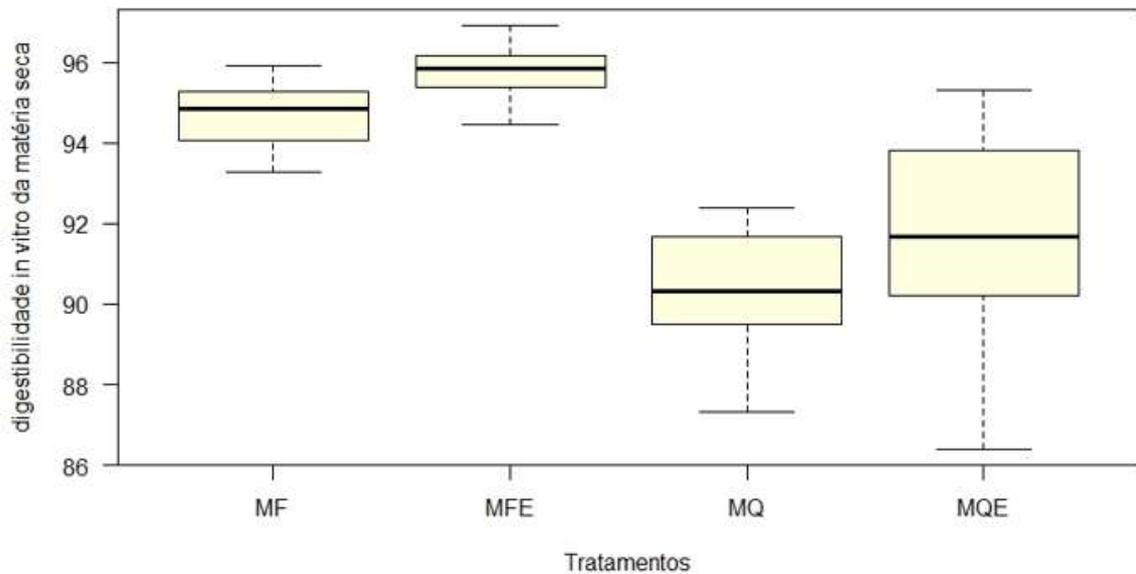


Figura 2 Digestibilidade *in vitro* da matéria seca do Milho Floculado (MF), Milho Floculado com Enzima (MFE), Milho Quebrado (MQ), Milho Quebrado com Enzima (MQE).

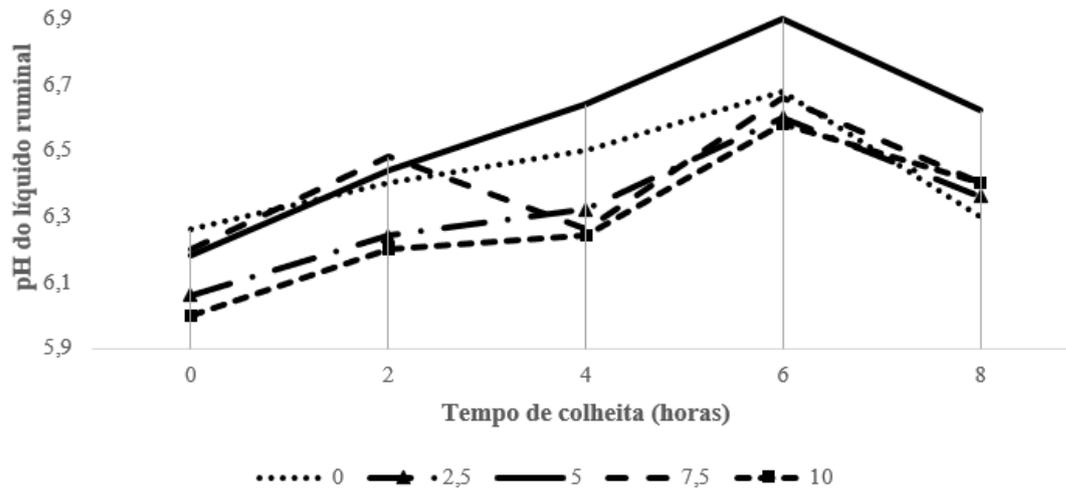


Figura 3 Valores de pH do líquido ruminal de bovinos confinados com dietas milho grão inteiro recebendo com doses crescentes de *Blend* Enzimático em função do tempo de colheita do líquido.

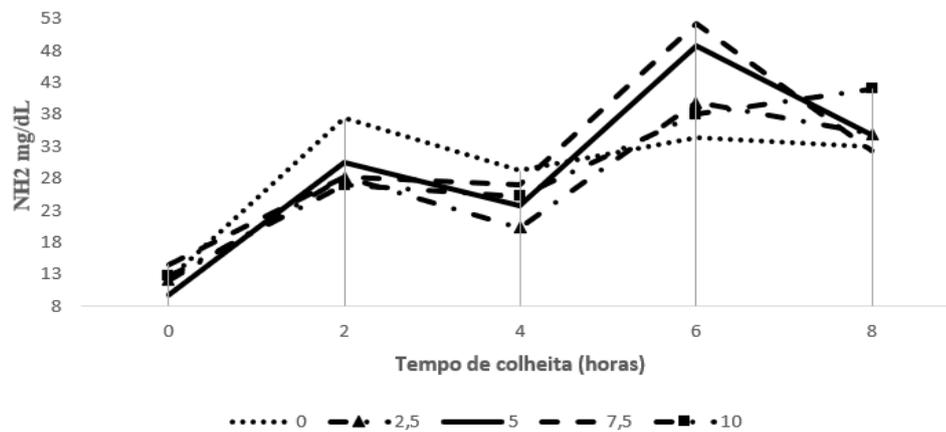


Figura 4 Concentrações de amônia ruminal de ruminal de bovinos confinados com dietas milho grão inteiro recebendo com doses crescentes de *Blend* Enzimático em função do tempo de colheita.

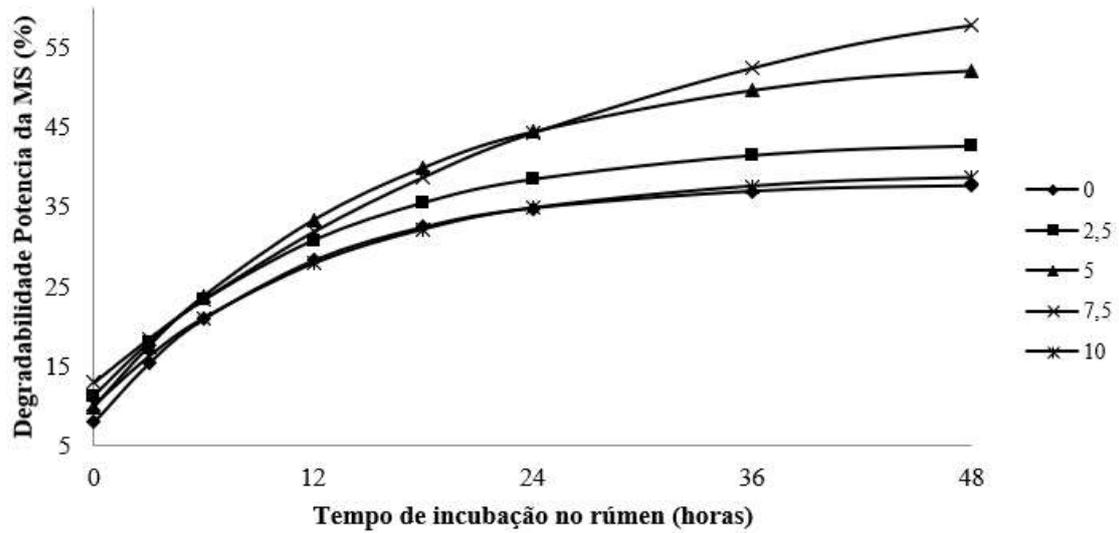


Figura 5 Degradabilidade potencial da MS do grão de milho quebrado em bovinos alimentados com níveis crescentes de *blend* enzimático.

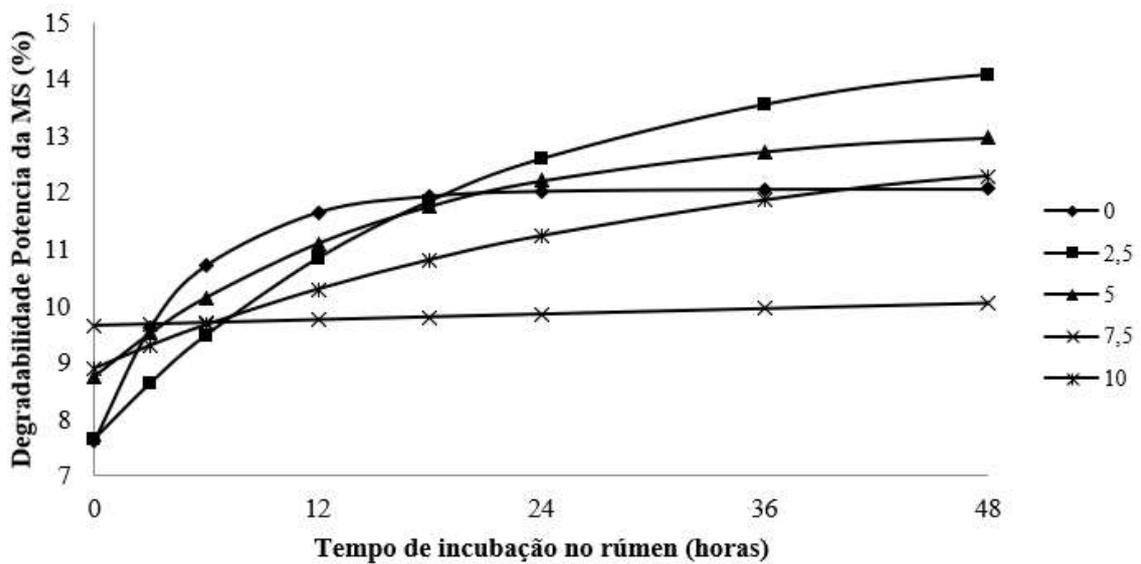


Figura 6 Degradabilidade potencial da MS do grão de milho inteiro em bovinos alimentados com níveis crescentes de *blend* enzimático.

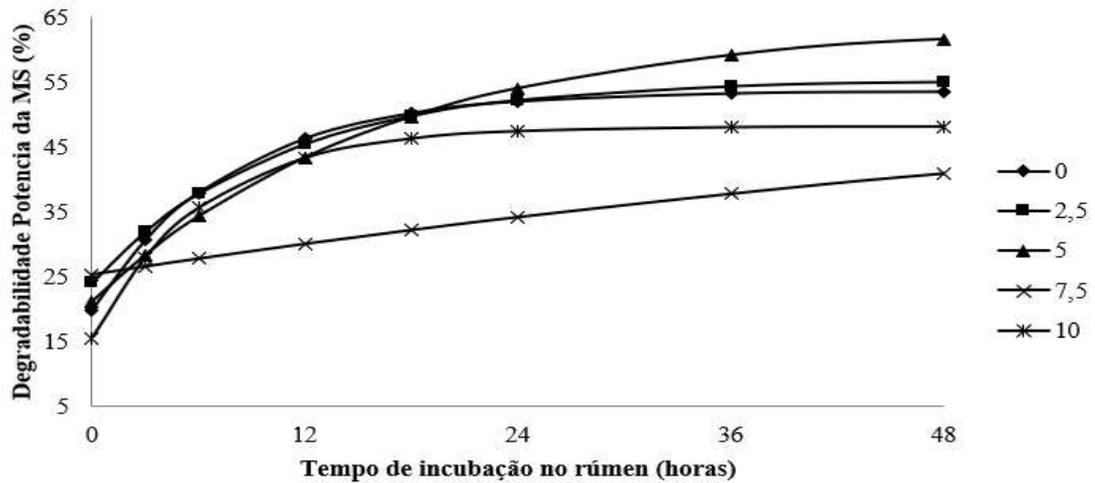


Figura 7 Degradabilidade potencial da MS de pellets-proteico-vitamínico-mineral, utilizados em dietas de milho grão-inteiro, com adição de níveis crescentes de *blend* enzimático.

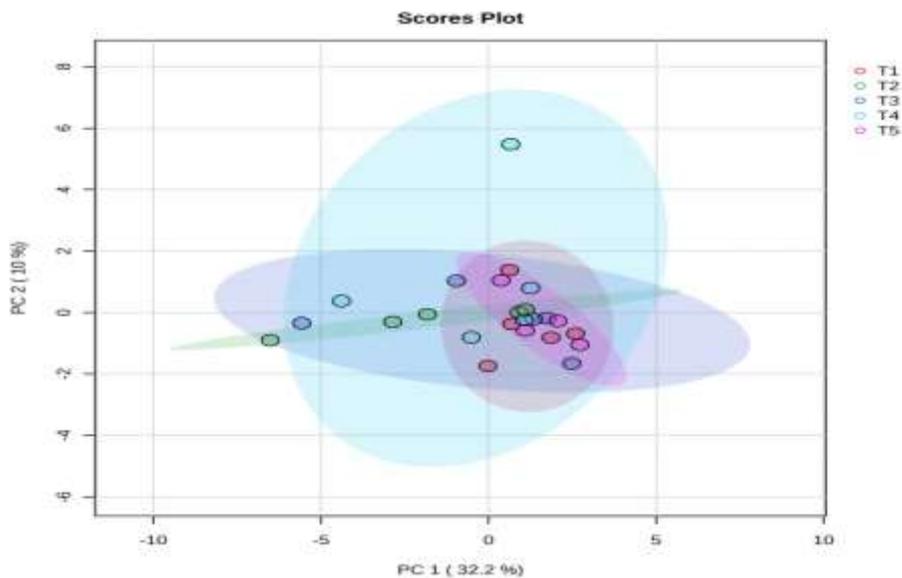


Figura 8 g Principais componentes do metaboloma do plasma sanguíneo de bovinos mestiços confinados com dietas de milho inteiro com doses crescentes de *blend* enzimático, Doses enzimáticas fornecidas diariamente Tratamento 1 controle dieta sem adição de enzima; T2 = dieta +2,5 gramas de enzima; T3 = dieta + 5,0 gramas de enzima: T4 = dieta +7,5 gramas de enzima; T = dieta +10,0 gramas de enzima.

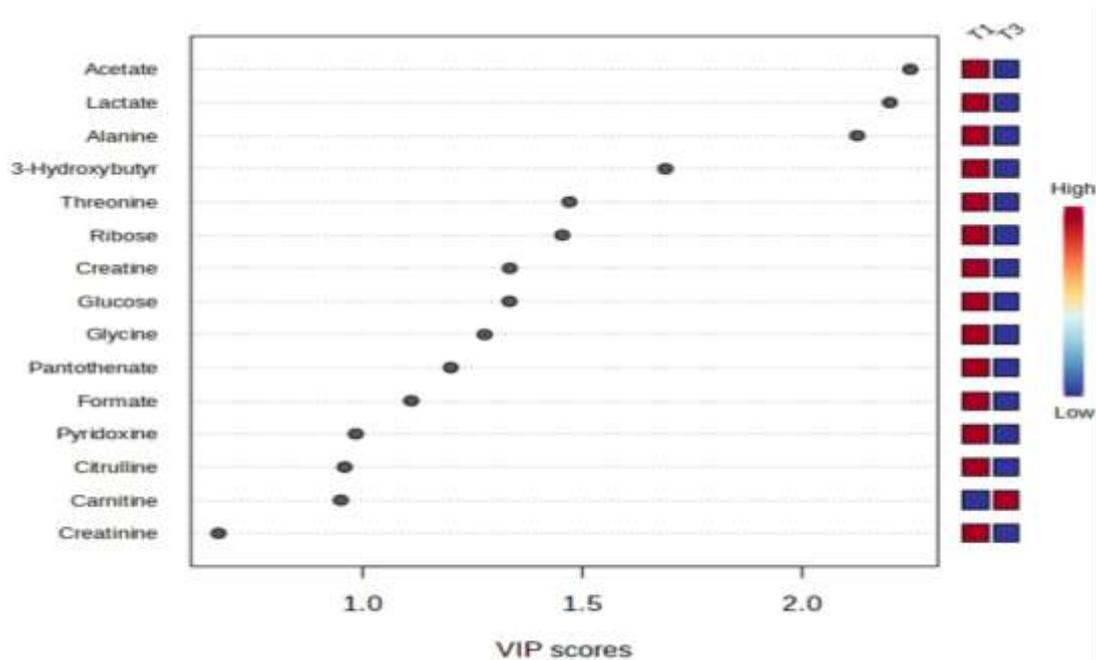


Figura 9 . Vip score dos metabólitos do plasma sanguíneo de bovinos mestiços confinados com dietas de milho inteiro com doses crescentes de *blend* enzimático, T1 tratamento controle e T3 tratamento com 5,0 gramas de *blend* enzimático diário.

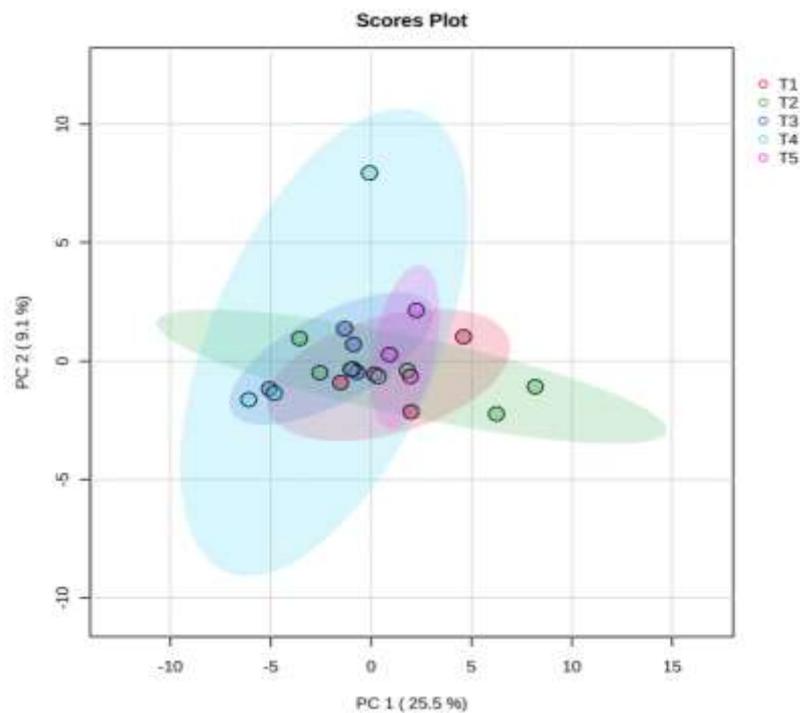


Figura 10 Principais componentes do metaboloma do líquido ruminal de bovinos mestiços confinados com dietas de milho inteiro com doses crescentes de *blend* enzimático, Doses enzimáticas fornecidas diariamente Tratamento 1 controle dieta sem adição de enzima; T2 = dieta +2,5 gramas de enzima; T3 = dieta + 5,0 gramas de enzima; T4 = dieta +7,5 gramas de enzima; T5 = dieta +10,0 gramas de enzima.

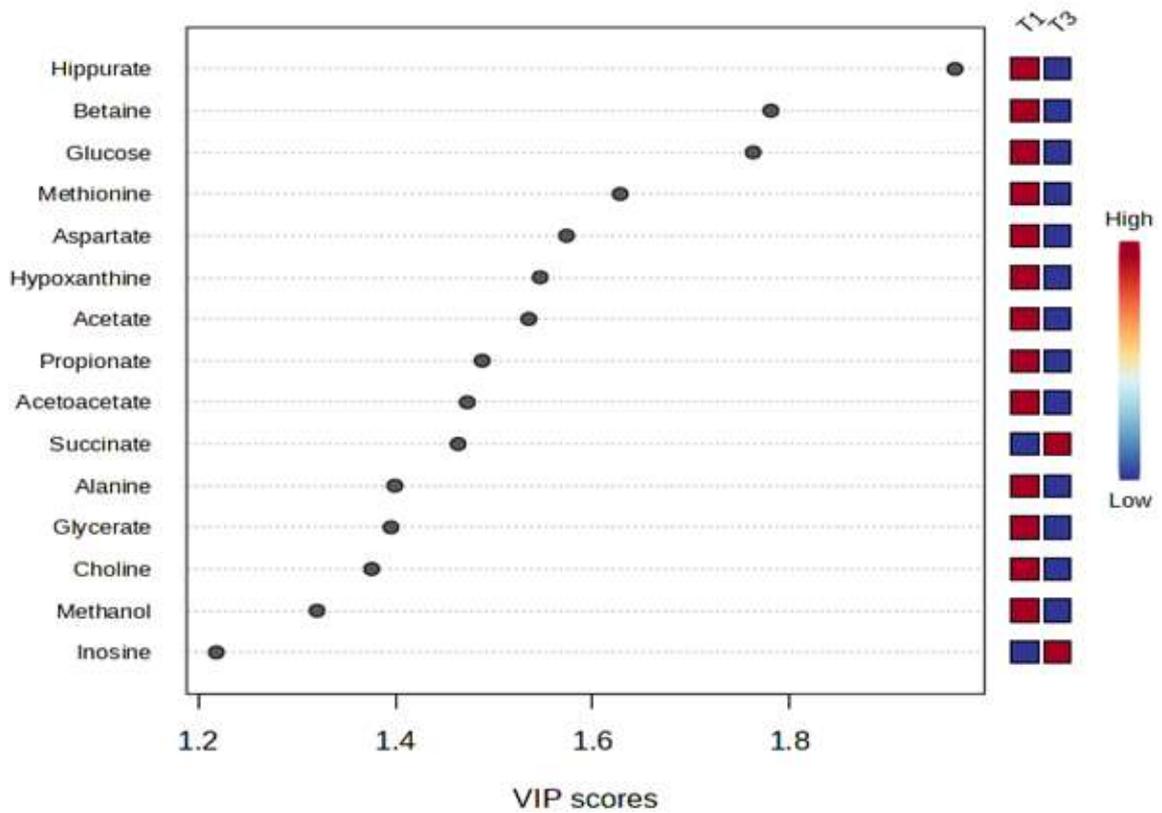


Figura 11 Vip score dos metabólitos do líquido ruminal de bovinos mestiços confinados com dietas de milho inteiro com doses crescentes de *blend* enzimático, T1 tratamento controle, T3 tratamento com 5,0 gramas de *blend* enzimático diário. Metabólitos principais (mudança do espectro químico - ppm) selecionados pelo VIP scores.