

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA**

GABRIEL ZANUTO SAKITA

**Produção de gases, fermentação ruminal e desempenho de ovinos
suplementados com enzimas fibrolíticas**

Piracicaba

2018

GABRIEL ZANUTO SAKITA

**Produção de gases, fermentação ruminal e desempenho de ovinos
suplementados com enzimas fibrolíticas**

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

**Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear
na Agricultura da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em Ciências**

**Área de Concentração: Biologia na Agricultura e
no Ambiente**

Orientador: Prof. Dr. Adibe Luiz Abdalla

Coorientador: Prof. Dr. Hermann Bremer Neto

Piracicaba

2018

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Sakita, Gabriel Zanuto

Produção de gases, fermentação ruminal e desempenho de ovinos suplementados com enzimas fibrolíticas / Gabriel Zanuto Sakita; orientador Adibe Luiz Abdalla; co-orientador Hermann Bremer Neto. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2018.

139 p. : il.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Digestibilidade 2. Forragem 3. Metano entérico 4. Nutrição animal
5. Ovinocultura 6. Produção animal 7. Rúmen 8. Ruminantes 9. Sustentabilidade
I. Título

CDU 591.13 : 636.08

Elaborada por:

Marília Ribeiro Garcia Henyei

CRB-8/3631

Resolução CFB Nº 184 de 29 de setembro de 2017

Aos meus pais, Nelson Itiro Sakita e Elisabete Aparecida Zanuto Sakita, pelo incentivo, confiança e apoio fornecido no decorrer dessa longa caminhada e em todas as etapas de minha vida. Sem vocês nada seria possível.

A minha noiva, Mayla Silva Cayres de Oliveira, por sempre estar ao meu lado me dando forças e me encorajando a enfrentar novos desafios. Com toda certeza você é parte integral dessa conquista.

Ao meu irmão, Daniel Zanuto Sakita, pelos ensinamentos passados, amizade e incentivos. Você é um exemplo a ser seguido.

A memória de meus avós, Hissao Sakita, Kyo Sakita e Maria Aparecida de Carvalho Zanuto, e tios, Gerson Koji Sakita e Elza Mitiko Sakita, seus ensinamentos sempre me ajudaram a ser uma pessoa melhor. Vocês estão eternamente presentes em meu coração.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela dádiva da vida, saúde e forças para enfrentar essa longa caminhada.

Aos meus pais (Nelson e Elisabete Sakita), meu irmão (Daniel Sakita), minha noiva (Mayla Cayres) e todos os meus familiares que sempre estiveram ao meu lado, me amparando e dando forças para sempre seguir em frente. Vocês são tudo em minha vida!

Amo muito todos vocês!

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (Universidade de São Paulo), pela infraestrutura e apoio fornecidos para realização desse estudo.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/PROEX 0227080) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – 152612/2016-5), pela concessão de bolsa de estudo e auxílio financeiro para suporte da pesquisa.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Adibe Luiz Abdalla, pela orientação, confiança, paciência, oportunidades e ensinamentos que foram passados. Com toda certeza o senhor contribuiu para que meu conhecimento científico fosse sempre aprimorado.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Hermann Bremer Neto, desde o início transmitindo seus ensinamentos e abrindo portas para novas oportunidades. Seu apoio e incentivo foram fundamentais.

Ao Prof. Dr. Helder Louvandini, pela amizade, contribuição, oportunidades e ensinamentos.

Aos funcionários do Laboratório de Nutrição Animal, Maria Regina Peçanha, Lécio Aparecido Castilho, Karinna Scotton e Francisco Adelino da Silva, pela paciência, amizade e suporte que me deram sempre.

Aos funcionários da Pós-Graduação e demais funcionários do CENA, que de alguma forma ajudaram no decorrer do doutorado.

A todos amigos do Laboratório de Nutrição Animal e demais laboratórios, Paulo Tavares Lima, Adibe Luiz Abdalla Filho, Thiago Bompadre, Egon Hion Ieda, Wilian dos Santos, Beatriz Bizzuti, Vagner Ovani, Camila Chaves, Alline Schumann, Andressa Natel, Patrícia Righeto, Tairon Pannunzio, Dinesh Kumar, Linander Campos, Patricia Louvandini, Alessandra Romero, Juliano e Ana Cláudia Issakowicz, Gleison Souza, Felipe Ortiz, Sammy Emanuelle, Letícia Faria e Guilherme Moreira, obrigado pela ajuda e conquistas, mas acima de tudo, obrigado pela amizade.

Aos estagiários de iniciação científica e pré-iniciação científica, Rafael Cesar, Gabriela, Monique, Virgílio, Frederico, Felipe, Gustavo, Rafael, Renan, Jonathan, Nicolas, João Paulo e Gabriel, que colaboraram de alguma forma para o desenvolvimento do experimento.

Aos amigos da República Rancho, Tiago Katayama e Paulo Teixeira, pela convivência, ajuda, companheirismo e amizade construída durante todos esses anos.

A todos que de alguma forma contribuíram para essa conquista.

Muito obrigado!

“Há uma força motriz mais poderosa que o vapor, a eletricidade e a energia atômica: a vontade”

Albert Einstein

RESUMO

SAKITA, G. Z. **Produção de gases, fermentação ruminal e desempenho de ovinos suplementados com enzimas fibrolíticas**. 2018. 139 p. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2018.

A preocupação com a segurança alimentar e o aquecimento global pressiona a cadeia de produção de ruminantes a buscar alternativas para incremento na produtividade e redução nas emissões dos gases de efeito estufa, uma vez que essa atividade é responsável por grande parte das emissões de metano (CH₄) entérico. O desenvolvimento de produtos enzimáticos para uso na nutrição de ruminantes torna-se de grande valia para contribuir com a demanda alimentar e reduzir os impactos ambientais. O objetivo do presente estudo foi avaliar o uso de um extrato de enzimas fibrolíticas (EEF), composto por endoglucanases, exoglucanases e xilanases, produzido pelo fungo *Trichoderma reesei* utilizando como substrato resíduos da indústria canavieira, sobre a digestibilidade, fermentação ruminal e desempenho de ovinos em crescimento, conduzidos através de dois experimentos. No experimento 1, foi avaliado a adição de doses crescentes (0, 10, 100, 1000 e 10000 µL g⁻¹ de substrato) do EEF sobre a produção total de gases e CH₄, degradabilidade e fermentação ruminal de três forrageiras tropicais (*Cynodon* spp., *Panicum maximum* e *Cenchrus ciliaries* L.) em um ensaio *in vitro*, com o objetivo de verificar a possibilidade de uso do EEF na dieta de ruminantes sem prejudicar os parâmetros fermentativos. Verificou-se que os resultados foram dependentes da dose e do substrato utilizados. Contudo, foi verificado aumento na produção total de gases e CH₄ e na degradabilidade de todas as forrageiras utilizadas com a dose mais alta do EEF. Conclui-se que o EEF pode ser utilizado na dieta de ruminantes como alternativa para incremento na degradabilidade de forrageiras tropicais. O experimento 2 foi dividido em duas fases conduzidas com o objetivo de avaliar o efeito do EEF sobre a digestibilidade aparente dos nutrientes, fermentação ruminal, desempenho animal e produção de CH₄ entérico de 19 ovinos em crescimento divididos em dois grupos experimentais, controle (CTL) e enzima (ENZ), recebendo dieta composta de 70% de feno de Tifton-85 e 30% de mistura concentrada. O EEF foi aplicado diretamente no feno 24 horas antes do fornecimento da refeição. Na Fase I, avaliou-se o efeito de doses crescentes (0, 20, 40 e 80 µL) do EEF sobre a hidrólise da fibra e posteriormente a dose com melhor resposta foi utilizada nos estudos de digestibilidade aparente dos nutrientes e fermentação ruminal. A dose de 40 µL foi selecionada para ser utilizada no ensaio *in vivo*, pois apresentou melhores respostas sobre a redução nas frações fibrosas. Os animais suplementados com o EEF apresentaram maior digestibilidade da fibra em detergente ácido e maior produção de valerato. Na Fase II, foi avaliado o efeito do EEF sobre o desempenho, saúde e produção de CH₄ entérico de ovinos em crescimento. Os procedimentos utilizados foram os mesmos descritos na Fase I. A suplementação do EEF proporcionou maior percentual médio de ganho de peso e menor produção de CH₄ entérico por kg de matéria seca ingerida. As análises sanguíneas demonstraram que o EEF não prejudicou a saúde dos animais. Conclui-se que o EEF pode ser utilizado na dieta animal sem trazer riscos à saúde, além de ser uma estratégia para aumento na produtividade animal e contribuir com a mitigação de CH₄ entérico de ovinos em crescimento.

Palavras-chave: Produção de ruminantes. Forragens. Enzimas fibrolíticas. Degradabilidade da fibra. Metano entérico. Sustentabilidade.

ABSTRACT

SAKITA, G. Z. **Gas production, rumen fermentation and performance of lambs supplemented with fibrolytic enzymes.** 2018. 139 p. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2018.

Concern about food security and global warming is pressing the ruminant production chain to seek alternatives to increase productivity and reduce greenhouse gas emissions, as this activity accounts for most of the enteric methane (CH₄) emissions. The development of enzyme products for use in ruminant nutrition is of great value in order to contribute to food demand and reduce environmental impacts. The aim of the present study was to evaluate the use of a fibrolytic enzyme extract (FEE), produced by the fungus *Trichoderma reesei* using as substrate residues from the sugar cane industry, on the digestibility, ruminal fermentation and performance of growing sheep, conducted through two experiments. In the experiment 1, the addition of increasing doses (0, 10, 100, 1000 and 10000 µL g⁻¹) of the FEE on the total gas and CH₄ production, degradability and ruminal fermentation of three tropical forages (*Cynodon* spp., *Panicum maximum* and *Cenchrus ciliaris* L.) in an *in vitro* assay, with the objective of verifying the possibility of use of the FEE in the diet of ruminants without harming the fermentative parameters and, consequently, animal health. The results were found to be dose and substrate dependent. However, there was an increase in total gas and CH₄ production and in the degradability of all forages used with the highest dose of FEE. It is concluded that the EPS can be used in the diet of ruminants as an alternative to increase the degradability of tropical forages. The experiment 2 was divided in two phases, with the objective of evaluating the effect of the FEE on the apparent digestibility of nutrients, ruminal fermentation, animal performance and enteric CH₄ production of 19 growing sheep divided in two experimental groups, control (CTL) and enzyme (ENZ), receiving a diet composed of 70% of Tifton-85 hay and 30% of concentrated mixture. The FEE was applied directly to the hay 24 hours before the meal. In Phase I, the effect of increasing doses (0, 20, 40 and 80 µL) of the FEE on fiber hydrolysis was evaluated and the dose with the best response was then used in the studies of apparent digestibility of nutrients and ruminal fermentation. The 40 µL dose was selected to be used in the *in vivo* assay because it presented better responses on the reduction in fibrous fractions. The animals supplemented with FEE showed higher acid digestible fiber digestibility and higher valerate production. The other parameters were not influenced by the addition of FEE. In Phase II, the effect of FEE was evaluated on the performance, health and production of Enteric CH₄ of growing sheep. The procedures used were the same as described in Phase I. The supplementation of the FEE provided a higher percentage of weight gain and lower enteric CH₄ production per kg of ingested dry matter. Blood tests showed that FEE did not affect animal health. It is concluded that FEE can be used in the animal diet without presenting health risks, besides being a strategy to increase animal productivity and contribute to the mitigation of enteric CH₄ of growing sheep.

Keywords: Ruminant production. Forage. Fibrolytic enzymes. Fiber degradability. Enteric methane. Sustainability.

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Atividade enzimática do extrato bruto de enzimas fibrolíticas produzido pelo fungo <i>Trichoderma reesei</i> utilizando palha de cana-de-açúcar como substrato	67
Tabela 3.2 – Doses e atividade enzimática aplicadas nas forrageiras tropicais	67
Tabela 3.3 - Composição bromatológica (g kg ⁻¹ MS) das forrageiras tropicais utilizadas como substratos	68
Tabela 3.4 - Parâmetros <i>in vitro</i> de produção de gases e metano e degradabilidade de forrageiras tropicais com adição de doses crescentes do extrato de enzimas fibrolíticas exógenas	74
Tabela 3.5 - Parâmetros fermentativos ruminais <i>in vitro</i> de forrageiras tropicais adicionadas com doses crescentes do extrato de enzimas fibrolíticas exógenas.....	76
Tabela 3.6 - Coeficiente de correlação de Pearson dos parâmetros <i>in vitro</i> de produção de gases, degradabilidade e fermentação ruminal	78
Tabela 4.1 - Atividade enzimática do extrato bruto de enzimas fibrolíticas produzido pelo fungo <i>Trichoderma reesei</i> utilizando palha de cana-de-açúcar como substrato	91
Tabela 4.2 - Composição bromatológica (g kg ⁻¹ MS) dos ingredientes que compuseram a dieta experimental utilizadas no ensaio de metabolismo animal	93
Tabela 4.3 - Descrição dos ingredientes e composição bromatológica das dietas experimentais 24 horas após a adição da água destilada e do extrato de enzimas fibrolíticas	94
Tabela 4.4 - Valores médios dos parâmetros fibra em detergente neutro, fibra em detergente ácido, hemicelulose e celulose com diferentes doses do extrato de enzimas fibrolíticas.....	100
Tabela 4.5 - Valores médios dos parâmetros fibra em detergente neutro, fibra em detergente ácido, hemicelulose e celulose em diferentes tempos de incubação com extrato de enzimas fibrolíticas.....	101
Tabela 4.6 - Composição bromatológica dos fenos 24 horas após aplicação de água destilada e extrato de enzimas fibrolíticas.....	101
Tabela 4.7 - Consumo médio diário e digestibilidade aparente dos nutrientes de ovinos suplementados ou não com extrato de enzimas fibrolíticas exógenas.....	102
Tabela 4.8 - Balanço de nitrogênio de ovinos suplementados ou não com extrato de enzimas fibrolíticas exógenas	102

Tabela 4.9 - Síntese de proteína microbiana por derivados de purinas de ovinos suplementados ou não com extrato de enzimas fibrolíticas exógenas 103

Tabela 4.10 - Parâmetros de fermentação ruminal de ovinos suplementados ou não com extrato de enzimas fibrolíticas exógenas 104

Tabela 5.1 - Atividade enzimática do extrato bruto de enzimas fibrolíticas produzido pelo fungo *Trichoderma reesei* utilizando palha de cana-de-açúcar como substrato..... 119

Tabela 5.2 - Composição bromatológica (g kg^{-1} MS) dos ingredientes que compuseram a dieta experimental utilizadas nos ensaios de desempenho animal e produção de metano entérico..... 120

Tabela 5.3 - Descrição dos ingredientes e composição bromatológica das dietas experimentais 24 horas após a adição da água destilada e do extrato de enzimas fibrolíticas..... 121

Tabela 5.4 - Consumo de matéria seca, consumo de água e desempenho de ovinos suplementados ou não com extrato de enzimas fibrolíticas 126

Tabela 5.5 - Escore de condição corporal e morfometria corporal de ovinos suplementados ou não com extrato de enzimas fibrolíticas..... 128

Tabela 5.6 - Parâmetros hematológicos de ovinos suplementados ou não com extrato de enzimas fibrolíticas 129

Tabela 5.7 - Parâmetros bioquímicos de ovinos suplementados ou não com extrato de enzimas fibrolíticas 129

Tabela 5.8 - Produção de metano entérico de ovinos suplementados ou não com extrato de enzimas fibrolíticas 130

LISTA DE FIGURAS

- Figura 3.1 – Doses crescentes do extrato de enzimas fibrolíticas e adição nas garrafinhas67
- Figura 4.1 - Pulverizadores utilizados para aplicação da água destilada e extrato de enzimas fibrolíticas e modo de aplicação dos mesmos sobre o feno de Tifton-85.....94
- Figura 5.1 - Salão onde foram mantidas as baias individuais utilizadas no decorrer dos 60 dias de alojamento dos animais experimentais122
- Figura 5.2 – Evolução do peso corporal (PC) e percentual de ganho de peso (%GP) de ovinos suplementados (ENZ) ou não (CTL) com extrato de enzimas fibrolíticas exógenas.....127

LISTA DE ABREVIACÕES

°C	Graus Celsius
% GP	Percentual de ganho de peso
% MGP	Percentual médio de ganho de peso
µL	Microlitros
µm	Micrometros
µmol	Micromol
AC	Altura de cernelha
AG	Altura de garupa
AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
AST	Aspartado aminotransferase
C2	Acetato
C3	Propionato
C4	Butirato
C2:C3	Relação acetato:propionato
CA	Conversão alimentar
Cel	Celulose
CDMS	Consumo diário de matéria seca
CH ₄	Metano
cm	Centímetros
CMS	Consumo de matéria seca
CO ₂	Dióxido de carbono
CTL	Controle
CTMS	Consumo total de matéria seca
DFDN	Degradabilidade da fibra em detergente neutro
DMS	Degradabilidade da matéria seca
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
DVMO	Degradabilidade verdadeira da matéria orgânica
EA	Eficiência alimentar
EB	Energia bruta
ECC	Escore de condição corporal
EE	Extrato etéreo
EEF	Extrato de enzimas fibrolíticas
EFE	Enzimas fibrolíticas exógenas
ENZ	Enzima
E.P.M.	Erro padrão da média
dL	Decilitros
FC	Fator de conversão
FD	Fator de diluição
FDA	Fibra em detergente ácido
FDN	Fibra em detergente neutro
g	Gramas
GB	Glóbulos brancos
GEE	Gases de efeito estufa

GMDP	Ganho médio diário de peso
GTP	Ganho total de peso
GV	Glóbulos vermelhos
h	Horas
H ₂	Hidrogênio
He	Gás hélio
Hem	Hemicelulose
kcal	Quilocaloria
kg	Quilograma
L	Litros
LDA	Lignina em detergente ácido
LG	Largura de garupa
m ³	metros cúbicos
MDP	Metabólitos derivados de purina
MF	Matéria fresca
mg	Miligramas
Min	Minutos
mL	Mililitros
mmol	Milimol
MO	Matéria orgânica
MS	Matéria seca
MSI	Matéria seca ingerida
N	Nitrogênio
N ₂ O	Óxido nitroso
NH ₃	Amônia
nm	Nanômetros
NM	Nitrogênio microbiano
N-NH ₃	Nitrogênio amoniacal
PA	Perímetro abdominal
PB	Proteína bruta
PG ₂₄	Produção líquida de gases em 24 horas
pH	Potencial hidrogeniônico
ProT	Proteínas totais
PT	Perímetro torácico
PVF	Peso vivo final
PVI	Peso vivo inicial
SDA	Solução detergente ácido
SDN	Solução detergente neutro
UI	Unidades Internacionais

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 Hipóteses	25
1.2 Objetivo geral	26
1.2.1 Objetivos secundários.....	26
2 UTILIZAÇÃO DE ENZIMAS FIBROLÍTICAS EXÓGENAS COMO ESTRATÉGIA PARA INCREMENTO NA PRODUTIVIDADE ANIMAL E SUSTENTABILIDADE DO SETOR PECUÁRIO	29
2.1 Sistema de produção de ruminantes no Brasil e sua importância para produção nacional e mundial de proteína animal	29
2.2 Produção de ruminantes e as emissões de gases de efeito estufa	31
2.3. Utilização de enzimas fibrolíticas exógenas para incremento da produtividade animal, redução nas emissões de metano entérico e sustentabilidade da produção de ruminantes	33
2.3.1 Parede celular vegetal e sistemas enzimáticos celulolítico e hemicelulolítico.....	36
2.3.2 Mecanismos de ação das enzimas fibrolíticas exógenas	39
2.4 Produção de enzimas fibrolíticas com biomassa lignocelulósica.....	42
2.5 Adição de enzimas fibrolíticas exógenas em estudos <i>in vitro</i> : efeitos sobre a hidrólise do substrato, parâmetros fermentativos e produção de metano.....	43
2.6 Avaliação <i>in vivo</i> da adição de enzimas fibrolíticas exógenas sobre o desempenho animal, fermentação ruminal, digestibilidade dos nutrientes e produção de metano entérico	46
2.7 Variações na atividade enzimática utilizadas nos estudos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	49
Referências	51
3 ENZIMAS FIBROLÍTICAS EXÓGENAS PODEM MELHORAR A DEGRADABILIDADE <i>IN VITRO</i> DE FORRAGEIRAS TROPICAIS	61
3.1 Introdução.....	63
3.2 Materiais e métodos.....	64
3.2.1 Enzimas e ensaio de atividade enzimática.....	64
3.2.2 Substratos e tratamentos	67
3.2.3 Análise bromatológica dos substratos	68

3.2.4 Colheita e preparo dos inóculos	68
3.2.5 Ensaio <i>in vitro</i> de produção de gases	69
3.2.6 Determinação das concentrações de metano.....	70
3.2.7 Degradabilidade ruminal.....	71
3.2.8 Parâmetros fermentativos.....	71
3.2.9 Análise estatística.....	72
3.3 Resultados	72
3.3.1 Produção de gases e metano <i>in vitro</i> e degradabilidade dos nutrientes	72
3.3.2 Parâmetros de fermentação ruminal.....	75
3.3.3 Coeficiente de correlação de Pearson	77
3.4 Discussão	79
3.5 Conclusão.....	81
Referências.....	81

4 DIGESTIBILIDADE DOS NUTRIENTES E FERMENTAÇÃO RUMINAL DE OVINOS SUPLEMENTADOS COM ENZIMAS FIBROLÍTICAS EXÓGENAS....

4.1 Introdução	89
4.2 Materiais e métodos	90
4.2.1 Local e declaração de ética	90
4.2.2 Extrato de enzimas fibrolíticas e atividade enzimática	90
4.2.3 Ensaio de hidrólise da fibra.....	91
4.2.4 Animais, tratamentos e manejo.....	92
4.2.5 Ensaio de metabolismo animal (digestibilidade aparente dos nutrientes.....	95
4.2.6 Colheita de urina	97
4.2.6.1 Balanço de nitrogênio	97
4.2.6.2 Síntese de proteína microbiana por derivados de purina	97
4.2.7 Parâmetros de fermentação ruminal.....	99
4.2.8 Análise estatística.....	99
4.3 Resultados	100
4.3.1 Ensaio de hidrólise da fibra.....	100
4.3.2 Ensaio de metabolismo animal	101
4.3.3 Balanço de nitrogênio	102
4.3.4 Síntese de proteína microbiana por derivados de purina	103
4.3.5 Parâmetros de fermentação ruminal.....	103

4.4 Discussão	104
4.5 Conclusão	109
Referências	110

5 EFEITOS DA ADIÇÃO DE ENZIMAS FIBROLÍTICAS EXÓGENAS SOBRE O DESEMPENHO ANIMAL E PRODUÇÃO DE METANO ENTÉRICO DE OVINOS EM CRESCIMENTO

5.1 Introdução.....	117
5.2 Materiais e métodos.....	118
5.2.1 Local e declaração de ética.....	118
5.2.2 Extrato de enzimas fibrolíticas e atividade enzimática	118
5.2.3 Animais e delineamento experimental	119
5.2.4 Manejo e tratamentos	119
5.2.5 Ensaio de desempenho animal.....	121
5.2.6 Avaliação da morfometria e escore de condição corporal.....	123
5.2.7 Parâmetros hematológicos e bioquímicos	124
5.2.8 Quantificação das emissões de metano entérico.....	124
5.2.9 Análise estatística	125
5.3 Resultados.....	125
5.3.1 Desempenho animal	125
5.3.2 Morfometria corporal e escore de condição corporal.....	127
5.3.3 Parâmetros hematológicos e bioquímicos	129
5.3.4 Quantificação de metano entérico	130
5.4 Discussão	130
5.5 Conclusão	134
Referências	134

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....

139

1. INTRODUÇÃO

O aumento da população mundial, estimada em mais de nove bilhões de pessoas no ano de 2050, traz consigo um grande desafio para a cadeia produtora de alimentos (agricultura e pecuária), atender a demanda de alimentos para a população e minimizar os impactos ambientais causados durante o processo de produção. Nesse contexto, a pressão sobre os produtores rurais com as questões ambientais faz com que haja a necessidade de intensificação da produção por hectare, garantindo maior produtividade sem a necessidade de aumentar as áreas utilizadas, e dessa forma, reduzindo o desmatamento.

Sabe-se que os animais ruminantes são importantes produtores de proteína animal, sendo capazes de produzir alimentos de excelente qualidade nutricional e essenciais para a nutrição humana a partir de substratos fibrosos como única fonte de nutrientes. Isso é devido aos pré-estômagos, que apresentam condições favoráveis (anaerobiose, pH e temperatura controlados) para o desenvolvimento de microrganismos capazes de aproveitarem alimentos fibrosos como fonte energética através dos processos fermentativos, liberando como produtos finais da fermentação, ácidos graxos que serão utilizados pelos animais como fonte de energia. Ademais, a utilização de substratos fibrosos (gramíneas forrageiras e resíduos agroindustriais) pelos ruminantes coloca-os em um patamar de destaque pelo fato desses alimentos não serem utilizados na alimentação humana.

No Brasil, grande parte do sistema de produção de ruminantes se dá com a utilização de forrageiras tropicais, principalmente forragens de origem africana. O sistema de criação a pasto é considerado um fator favorável para a cadeia produtora de ruminantes decorrentes do baixo custo com alimentação e da menor utilização de grãos na dieta. Além disso, essas forrageiras apresentaram uma ótima adaptação aos diferentes solos e clima brasileiro, possibilitando o cultivo dessas forragens em regiões com solos de menor fertilidade e com relevos inadequados, áreas que seriam consideradas inapropriadas para a atividade agrícola.

No entanto, a alta sazonalidade dessas forrageiras prejudica a produtividade animal no decorrer do ano. Isso porque, essas forragens apresentam alta produção de matéria seca e melhor qualidade nutricional nos períodos chuvosos e baixa produtividade e qualidade nutricional (menor quantidade de proteína, maior quantidade de parede celular e baixa digestibilidade) nos períodos secos do ano. Assim, caso não ocorra o correto planejamento da produção durante o ano, os animais apresentarão ótimo desempenho produtivo

durante o período chuvoso, contudo, ocorrendo perda de produtividade durante o período seco, diminuindo a produtividade e eficiência e, conseqüentemente, a sustentabilidade do sistema de produção.

Outro inconveniente da cadeia de produção de ruminantes é a produção de metano (CH_4) entérico, molécula formada durante o processo fermentativo e que, normalmente é intensificado quando os animais se alimentam com dietas fibrosas. Alguns microrganismos, conhecidos como arqueas metanogênicas, utilizam o dióxido de carbono (CO_2) e o hidrogênio (H_2) produzidos após o processo de fermentação para formação do CH_4 que, posteriormente, será eructado para a atmosfera. O CH_4 liberado representa uma perda energética para o animal, reduzindo sua eficiência alimentar, além de ser considerado um gás de efeito estufa (GEE) com poder de retenção de calor 25 vezes maior que o CO_2 .

Decorrente a isso, nos últimos anos, iniciou-se um intenso movimento de pressão sobre a produção pecuária, sendo considerada uma atividade exploratória que contribui com o aumento dos gases de efeito estufa e com o desmatamento das florestas.

Todos esses problemas apresentados incentivaram a comunidade científica a buscar estratégias para aumentar a produtividade animal e ao mesmo tempo, reduzir os impactos ambientais causados pela produção pecuária. Uma das estratégias pesquisadas nas últimas décadas é a utilização de enzimas fibrolíticas exógenas (EFE), que passaram a ser estudadas com o objetivo de melhorar a qualidade e digestibilidade dos alimentos utilizados na dieta dos animais ruminantes além de ser considerado uma possível forma de mitigação de CH_4 entérico.

A hipótese sustentada pelos pesquisadores seria de que essas enzimas seriam capazes de aumentar o processo de degradação da fração fibrosa dos alimentos, disponibilizando maiores quantidades de nutrientes para serem fermentados pelos microrganismos ruminais e, dessa forma, aumentando a disponibilidade de nutrientes para os animais. Além disso, essas enzimas poderiam alterar alguns parâmetros fermentativos, como a relação acetato:propionato, tendo como benefícios diretos, a redução na produção de CH_4 entérico e maior aproveitamento energético da dieta.

Normalmente, essas enzimas são produzidas por microrganismos que, para utilizarem os nutrientes provenientes de um substrato, liberam enzimas para o meio extracelular para reagirem com o substrato, catalisando as reações de quebra das ligações presentes nas cadeias de carboidratos e utilizando os monômeros em seu metabolismo. Assim, torna-se possível a extração e utilização dessas enzimas em outros segmentos, tais como as indústrias têxtil, de alimentos, de bioenergia, de nutrição animal, dentre outras.

Estudos estão sendo desenvolvidos com a utilização de resíduos lignocelulósicos provenientes da agricultura para a produção de EFE. A agroindústria brasileira gera uma grande quantidade de resíduos lignocelulósicos anualmente e que até então, não eram utilizados para nenhum fim específico, o que levava a grandes perdas pela indústria agrícola e poluição ambiental devido a queima e/ou ao descarte incorreto. Dessa forma, a utilização desses resíduos para produção de produtos de maior valor agregado tornou-se uma maneira sustentável de reduzir os impactos ambientais proporcionados pelas agroindústrias além de reduzir suas perdas econômicas.

Nesse sentido, o desenvolvimento de bioprocessos para a produção de EFE, oriundas de fungos que utilizam resíduos agroindustriais (resíduos lignocelulósicos) para seu crescimento, estão sendo cada vez mais pesquisados. Assim, o destino final de utilização desses produtos torna-se de grande valia, sendo a nutrição animal uma área de grande exploração. Dessa forma, há a necessidade do desenvolvimento de pesquisas com a inclusão de produtos economicamente viáveis na dieta dos animais de produção com o fim precípua de obter resultados positivos sobre o desempenho e saúde animal, além de contribuir com a redução nas emissões dos gases de efeito estufa e proporcionar maior sustentabilidade dos sistemas de produção agrícola e pecuário.

Visando contribuir com a redução nas pegadas de carbono assim como intensificar a produtividade animal e desenvolver novas estratégias para elevar o valor nutritivo da dieta dos ruminantes, poucas pesquisas estão sendo desenvolvidas no Brasil com a utilização de enzimas fibrolíticas produzidas por fungos, com a utilização de resíduos agroindustriais, com intuito de criar novas alternativas alimentares que promovam o equilíbrio entre a produção de ruminantes e o meio ambiente.

1.1 Hipóteses

A hipótese do trabalho é de que a utilização de um extrato bruto de enzimas fibrolíticas exógenas, produzido por um fungo que consegue se desenvolver utilizando resíduo lignocelulósico de baixa qualidade, nesse caso a palha de cana-de-açúcar, é capaz de elevar a degradabilidade da fração fibrosa de forrageiras tropicais. Se o fungo consegue crescer utilizando esse substrato, isso quer dizer que ele é capaz de produzir um sistema enzimático específico, que é liberado para o meio extracelular, para degradar os polímeros de celulose e hemicelulose até seus respectivos monômeros, assim, utilizando-os em seu metabolismo.

Dessa forma, é esperado que a inclusão do extrato enzimático seja capaz de melhorar a qualidade nutricional de forrageiras tropicais pelo fato das enzimas presentes no extrato atuarem na quebra das ligações da fração fibrosa e, assim, facilitar a aderência dos microrganismos ruminais ao substrato, e conseqüentemente, reduzir o tempo de colonização, além de aumentar a quantidade de nutrientes disponíveis para a fermentação ruminal.

Quanto maior a quantidade de nutrientes para os microrganismos, maiores serão as taxas de fermentação, maior estímulo para crescimento dos microrganismos (síntese microbiana), principalmente os fibrolíticos, e maior produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) oriundos dos processos de fermentação. O aumento na produção de AGCC disponibilizará maior quantidade de energia para ser utilizada pelo animal, proporcionando assim, melhor desempenho e saúde animal, além de reduzir a produção de CH₄ por unidade de produto animal produzido, fazendo com que o sistema de produção seja mais eficiente e sustentável.

1.2 Objetivo geral

O objetivo geral do estudo foi avaliar o efeito da adição de um extrato de enzimas fibrolíticas (EEF) exógenas, produzido por fungo utilizando resíduos da indústria canavieira como substrato para seu crescimento, sobre a produção de gases, fermentação ruminal e desempenho de ovinos utilizando técnicas *in vitro* e *in vivo*, como uma estratégia sustentável para o aumento da produtividade e mitigação dos gases de efeito estufa na produção de ruminantes.

1.2.1 Objetivos secundários

- Avaliação de doses crescentes do EEF sobre a produção total de gases e CH₄, degradabilidade da MO, degradabilidade da fibra e parâmetros fermentativos (pH e AGCC) de diferentes forrageiras tropicais utilizando o ensaio *in vitro* de produção de gases, com o objetivo de verificar a possível utilização do EEF na dieta de ruminantes.

- Avaliação da digestibilidade aparente dos nutrientes, síntese microbiana e fermentação ruminal (pH, AGCC e nitrogênio amoniacal) de ovinos em crescimento com inclusão do EEF na dieta.
- Avaliação dos efeitos da adição do EEF sobre parâmetros zootécnicos de ovinos em crescimento através da determinação do ganho médio diário de peso, consumo médio diário de matéria seca e conversão alimentar e, quantificação da produção de metano entérico com a utilização de câmaras respirométricas.

2. UTILIZAÇÃO DE ENZIMAS FIBROLÍTICAS EXÓGENAS COMO ESTRATÉGIA PARA INCREMENTO NA PRODUTIVIDADE ANIMAL E SUSTENTABILIDADE DO SETOR PECUÁRIO

2.1 Sistema de produção de ruminantes no Brasil e sua importância para produção nacional e mundial de proteína animal

O Brasil apresenta um rebanho de animais ruminantes com quase 248 milhões de cabeças, entre bovinos, bubalinos, ovinos e caprinos. Desse total, em torno de 88% é representado por bovinos, sendo as regiões centro-oeste e norte as que apresentam os maiores rebanhos, seguido das regiões sudeste, sul e nordeste. No caso dos pequenos ruminantes (ovinos e caprinos), a região nordeste concentra grande parte do efetivo, com mais de 60% dos ovinos e 90% dos caprinos criados no território nacional. Já os bubalinos, com rebanho bem menor comparado com os demais animais (1,37 milhões de cabeças), concentram-se na região norte, com mais de 60% do efetivo seguido pelas regiões sudeste, nordeste, sul e centro-oeste (IBGE, 2016).

A utilização de plantas forrageiras para a criação de ruminantes é a técnica mais difundida em todo o mundo. Normalmente, cada região utiliza os cultivares de melhor adaptação às condições climáticas e de solo (WILKINSON; LEE, 2018). No Brasil não é diferente, o sistema de produção de ruminantes mais utilizado é de regime a pasto (FERRAZ; FELÍCIO, 2010; SOLTAN et al., 2013), com aproximadamente 90% dos nutrientes obtidos através desse sistema de criação (EUCLIDES et al., 2010).

Grande parte do território nacional destinado a criação dos animais ruminantes é composto por forrageiras tropicais, com destaque para o gênero *Urochloa* spp., que ocupa em torno de 80 milhões de hectares (ABDALLA et al., 2012) e também forrageiras do gênero *Panicum* spp., ambas de origem africana e que apresentaram boa adaptação aos solos de baixa a média fertilidade presentes no território brasileiro (FERRAZ; FELÍCIO, 2010). Esse sistema de produção com utilização de forrageiras coloca o Brasil em destaque pelo baixo custo de produção aliado aos preços relativamente baixos da terra e clima favorável (FERRAZ; FELÍCIO, 2010), demonstrando o potencial dos ruminantes em produzir carne e leite de qualidade utilizando-se apenas as forragens como fonte de nutrientes (WILKINSON; LEE, 2018), além desse sistema de produção proporcionar um melhor bem-estar animal e menor riscos de adquirir doenças (LOBATO et al., 2014).

É importante salientar que a menor utilização de cereais na alimentação animal faz com que mais pessoas possam ser alimentadas, pois em torno de um bilhão de toneladas de cereais que são utilizados anualmente para alimentar os animais de produção poderiam alimentar mais de três bilhões de pessoas (EISLER et al., 2014). Assim, o sistema de criação de ruminantes em pasto não gera competição com a alimentação humana (VAN SOEST, 1994).

Nesse contexto, o Brasil tornou-se um importante produtor nacional e mundial de proteína animal, favorecido pelo seu numeroso rebanho bovino e grande área destinada a pastagens para criações extensivas (JANK et al., 2014; RUVIARO et al., 2015), classificando-o como o segundo maior produtor mundial de carne bovina utilizando as forrageiras como principal fonte de nutrientes (JANK et al., 2014; DE OLIVEIRA SILVA et al., 2017). Não menos importante, a produção de ovinos e caprinos, representa uma importante atividade de desenvolvimento social e econômico em território nacional, principalmente na região nordeste, região com maior concentração de pequenos ruminantes (GUILHERME et al., 2017). Muitas vezes, os produtos oriundos desses animais (carne e leite) são utilizados como meio de subsistência para muitas famílias de baixa renda residentes em regiões rurais (MCMANUS et al., 2014).

Como complemento da importância da criação de ruminantes, não apenas em nível de Brasil, mas em nível mundial, a atividade pecuária ajuda as populações mais pobres não apenas como fonte de subsistência, mas também como forma de fazer dinheiro, após a venda de alguns animais, para poderem cobrir despesas inesperadas além de fornecerem tração, couro e lã (EISLER et al., 2014).

De acordo com o relatório publicado pela Divisão Populacional das Nações Unidas, em 2050 a população mundial atingirá o patamar de mais de 9,7 bilhões de pessoas com projeção de aumento para 11,2 bilhões de pessoas em 2100 (UNITED NATIONS, 2017). Segundo Clay (2011), até o ano de 2050 a renda per capita dos habitantes irá aumentar, dobrando o consumo quando comparado com os dias atuais, havendo a necessidade de três vezes a superfície da terra para poder atender a demanda de alimentos para toda essa população.

Vale salientar que, no cenário mundial, quase a totalidade do leite e grande parte da carne consumidos são provenientes de animais ruminantes em geral (EISLER et al., 2014). Isso destaca a importância da produção de ruminantes no Brasil, pois em 2050 a demanda mundial por alimentos aumentará em 70%, sendo que o Brasil poderá ser um dos países que irá atender boa parte dessa demanda (FAO, 2010). Seguindo essa perspectiva, a comunidade

científica reitera a necessidade da intensificação dos sistemas de produção agropecuário, contudo sem causar maiores danos ao ambiente (CRIST; MORA; ENGELMAN, 2017). Nesse cenário, o aumento da produtividade animal com a utilização eficiente dos sistemas de criação em pasto poderá ser vista como uma das soluções para as questões de segurança alimentar visto que, com o crescimento da população mundial a demanda por alimentos aumentará (MCAULIFFE et al., 2018), tornando-se necessário aumentar a produtividade dos ruminantes sem que haja aumento nas áreas destinadas para esse fim, necessitando de estratégias que consigam conciliar aumento da produtividade por hectare e reduzir os impactos causados pela produção pecuária (PEREIRA et al., 2018).

2.2 Produção de ruminantes e as emissões de gases de efeito estufa

O setor pecuário é responsável pela emissão de 7,1 giga toneladas de CO₂ equivalente por ano, representando 14,5% das emissões antropogênicas globais de GEE. Desse total, uma boa parcela é proveniente dos animais ruminantes, sendo 2,9 giga toneladas de CO₂ equivalente emitidos pelos bovinos especializados em produção de carne e também da carne oriunda de bovinos de leite, 1,4 giga toneladas dos bovinos de leite, 475 milhões de toneladas oriundos dos pequenos ruminantes (caprinos e ovinos) e 618 milhões de toneladas oriundos do rebanho de búfalos (GERBER et al., 2013a).

Os animais ruminantes contribuem com as emissões dos gases CH₄, CO₂ e N₂O (HRISTOV et al., 2013a; HAMMOND et al., 2016; KU-VERA et al., 2018), sendo 39% representado pelo CH₄ entérico (GERBER et al., 2013a). O gás CH₄ é proveniente, principalmente, da fermentação entérica e N₂O que é proveniente da decomposição das fezes e urina depositadas pelos animais (BERCHIELLI; MESSANA; CANESIN, 2012; CERRI et al., 2016). Além de contribuir com os GEE, as emissões de CO₂, CH₄ e N₂O representam uma perda de energia (carbono) e nitrogênio, reduzindo a eficiência do sistema de produção (GERBER et al., 2013a).

A formação dos gases no rúmen decorre do processo de degradação do alimento no ambiente ruminal, através de um complexo de enzimas produzidas pelos microrganismos ruminais, até mono ou dissacarídeos que são posteriormente fermentados, convertendo os nutrientes em AGCC, gases, ácido lático, células microbianas (KOZLOSKI, 2016), etanol, succinato, formato e ácidos graxos de cadeia ramificada (JANSSEN, 2010). A amônia (NH₃), o H₂ e o CO₂ são os gases gerados através da fermentação ruminal (JANSSEN, 2010). Já o gás CH₄ é produzido por bactérias ruminais quimiotróficas, também conhecidas como arqueas metanogênicas (KOZLOSKI, 2016), que utilizam o CO₂ e H₂ provenientes do processo

fermentativo, realizando uma fermentação secundária e formando o CH₄ (ABDALLA et al., 2012; SOLTAN et al., 2013). O CH₄ produzido pode ser eliminado após o processo de absorção pelo epitélio ruminal juntamente com o ar expelido (KOZLOSKI, 2016) ou então liberados pelo animal através da eructação (ABDALLA et al., 2012).

Além do CH₄ proveniente da fermentação entérica, o CH₄ também pode ser emitido pelas fezes depositadas pelos animais durante o pastejo, representando outra forma de perda energética (GERBER et al., 2013a). Da mesma forma, o N₂O é emitido através da deposição das fezes nas pastagens (OPIO et al., 2013; CARDOSO et al., 2016). Apesar da NH₃ não ser considerada um GEE, ela pode contribuir indiretamente com a emissão de N₂O através da volatilização da NH₃ proveniente das fezes e urina, podendo ser depositada no solo e convertida a N₂O (HRISTOV et al., 2011). Estudos realizados em 22 propriedades rurais de criação de bovinos de corte localizadas no estado do Mato Grosso mostraram que 67 - 79% das emissões dos GEE provenientes da bovinocultura de corte são oriundos da fermentação entérica e 20 - 33% são oriundos das fezes e urina depositadas nas pastagens (CERRI et al., 2016).

Portanto, maior importância tem sido atribuída à produção de CH₄ entérico decorrente de sua grande contribuição para emissão dos GEE, sendo considerada a segunda maior fonte de emissão do setor pecuário e tendo os bovinos como os principais contribuintes (GERBER et al., 2013a). Ademais, maior esforço tem sido direcionado para a mitigação do CH₄ entérico, pois esse gás apresenta uma meia vida relativamente curta na atmosfera, por volta de 13 anos, podendo ser uma estratégia de redução do aquecimento global no curto prazo (PETERSEN, 2018).

Como complemento, a produção de CH₄ entérico pode variar dependendo de alguns quesitos como o tipo de dieta utilizada, a espécie, o tamanho e a idade do animal (ABDALLA et al., 2012), assim como da quantidade de alimento ingerida, do tamanho do rebanho e da eficiência do animal em converter o alimento em produto animal (CERRI et al., 2016). Nesse contexto, dietas com baixa digestibilidade aumentam a quantidade de gases produzidos pela fermentação entérica; animais abatidos tardiamente permanecem maior tempo nas pastagens e, conseqüentemente, emitem maiores quantidades de GEE; sistemas de produção menos eficientes e com baixo peso ao abate ocasionam aumento das emissões de GEE por kg de carne/leite produzidos (GERBER et al., 2013a). Assim, a produção de CH₄ entérico pode ser manipulada para que se consiga atingir menores emissões provenientes dos processos fermentativos ruminais, como descrito em várias revisões (BEAUCHEMIN et al., 2008;

COTTLE; NOLAN; WIEDEMANN, 2011; GERBER et al., 2013b; HRISTOV et al., 2013a, 2013b).

Devido aos problemas ambientais proporcionados pela produção de ruminantes, nos últimos anos o Brasil vem sofrendo uma forte pressão da comunidade internacional decorrente das emissões dos GEE, com principal enfoque sobre a produção de bovinos de corte (RUVIARO et al., 2015), fazendo-se necessário desenvolver estratégias que consigam conciliar a produção de ruminantes e o meio ambiente.

2.3 Utilização de enzimas fibrolíticas exógenas para incremento da produtividade animal, redução nas emissões de metano entérico e sustentabilidade da produção de ruminantes

Um dos fatores limitantes para o aumento da produtividade dos animais ruminantes é o baixo aproveitamento dos nutrientes presentes nas forragens, principalmente devido as grandes quantidades de carboidratos fibrosos presentes na parede celular vegetal, uma vez que as condições ruminais não são favoráveis para sua digestão (MEALE et al., 2014). As forragens constituem a principal fonte de nutrientes dos animais ruminantes em todo o mundo (WILKINSON; LEE, 2018), e devido a isso, diversas estratégias (tratamentos químicos, físicos e biológicos) passaram a ser estudadas para melhorar a qualidade e digestibilidade da fração fibrosa das forrageiras, porém sem ampla divulgação e utilização (ADESOGAN et al., 2014).

Grande atenção tem sido dada nas últimas décadas a utilização de EFE, com o objetivo de melhorar a degradação da parede celular vegetal e aumentar a produtividade da cadeia produtora de carne e leite, como descritos em algumas revisões e meta-análises (BEAUCHEMIN et al., 2003; ADESOGAN et al., 2014; MEALE et al., 2014; ARRIOLA et al., 2017; TIRADO-GONZÁLEZ et al., 2018) e visando reduzir os impactos ambientais e aumentar a sustentabilidade da cadeia produtora de ruminantes (GADO et al., 2017; HERNANDEZ et al., 2017; HERNÁNDEZ et al., 2017; KHOLIF et al., 2017; VALLEJO-HERNÁNDEZ et al., 2018).

Estudos com utilização de enzimas iniciaram-se na década de 60. No entanto, devido aos altos custos de produção, baixa caracterização bioquímica das enzimas, processos de cultivo ineficazes e grande variação nas respostas animais desestimularam os cientistas a continuarem com o andamento das pesquisas com adição de enzimas na nutrição animal (BEAUCHEMIN et al., 2004).

Com o passar dos anos, o menor custo com os processos fermentativos, a produção de enzimas mais ativas e melhor caracterizadas e com aumento dos custos de produção decorrente da alimentação animal incentivaram os cientistas a reavaliarem a utilização das enzimas na nutrição animal (BEAUCHEMIN et al., 2004). Decorrente a isso, a partir da década de 90, estudos começaram a ser desenvolvidos com a utilização de enzimas exógenas para avaliação da performance de bovinos de corte, bovinos leiteiros e também em estudos *in vitro* e *in situ*. Efeitos positivos foram observados sobre o ganho de peso e produção leiteira (BEAUCHEMIN; RODE; SEWALT, 1995; RODE; YANG; BEAUCHEMIN, 1999), sobre a estabilidade enzimática em estudos *in vitro* e sobre a atividade enzimática no fluído ruminal em ensaios *in situ* (HRISTOV; MCALLISTER; CHENG, 1998). O principal objetivo de sua utilização era aumentar a degradabilidade da parede celular vegetal e, conseqüentemente, melhorar o aproveitamento das forrageiras pelos ruminantes (BEAUCHEMIN; COLOMBATTO; MORGAVI, 2004).

Assim, diversas enzimas e misturas enzimáticas passaram a ser estudadas na nutrição de ruminantes, tais como as celulasas, xilanases, proteases, pectinases e amilases. No entanto, as mais utilizadas na dieta dos ruminantes foram as celulasas e xilanases (enzimas fibrolíticas) que atuam nas ligações entre os polissacarídeos da parede celular das forragens (BEAUCHEMIN; COLOMBATTO; MORGAVI, 2004).

Um dos grandes problemas que começaram a surgir foram os resultados divergentes encontrados entre as pesquisas com a utilização de EFE. Beauchemin et al. (2003) publicaram uma revisão avaliando os resultados publicados com a utilização de aditivos enzimáticos na dieta de bovinos leiteiros e de corte e estudos *in vitro*. Esses pesquisadores atribuíram as divergências entre os resultados a formulação da mistura enzimática, erros na caracterização bioquímica das enzimas, excesso ou falta de atividade enzimática, métodos incorretos de aplicação, ou mesmo o nível de produção dos animais. No entanto, os autores concluíram que o uso de enzimas exógenas na nutrição de ruminantes constitui uma importante ferramenta com bom potencial para melhorar o aproveitamento dos nutrientes de dietas fibrosas, além de servir como uma alternativa a utilização de promotores de crescimento e antibióticos.

No mesmo ano, Colombatto e Beauchemin (2003) publicaram um artigo com o objetivo de padronizar a caracterização bioquímica, através da atividade enzimática, decorrente dos resultados inconsistentes encontrados na literatura, muitas vezes atribuídos a utilizações errôneas na unidade de atividade enzimática, além de utilização de temperatura e pH fora dos condizentes com o ambiente ruminal (temperatura 39°C e pH 6,0 – 6,5). Através desse artigo, houve uma padronização nos ensaios de atividade enzimática, onde foram

determinados parâmetros importantes para sua caracterização, tais como reagentes utilizados, temperatura e pH da reação, tempo de incubação, metodologia de leitura e definição da unidade de atividade enzimática para cada uma das enzimas utilizadas na dieta de ruminantes, o que levaria a maior precisão na caracterização das misturas enzimáticas utilizadas.

Outra revisão publicada em 2004 propôs a utilização de ensaios *in vitro*, com uma grande quantidade de substratos e doses enzimáticas, simulando as condições ruminais, para selecionarem misturas enzimáticas com potencial de utilização em ensaios *in vivo*. Além disso, discutiram que o desenvolvimento de novos produtos enzimáticos de utilização específica para ruminantes traria expectativas de melhores resultados, principalmente em situações onde a energia é o fator limitante da dieta e a degradação da fração fibrosa for baixa (BEAUCHEMIN; COLOMBATTO; MORGAVI, 2004).

Diversos estudos foram publicados com a utilização de enzimas exógenas em ensaios *in vitro* demonstrando resultados positivos, com adição de celulases, xilanases, amilase, proteases, feruloil esterase e algumas misturas, sobre a produção de gases, degradabilidade da matéria seca (DMS), degradabilidade da MO e da fração fibrosa, redução no tempo de colonização (“lag time”) dos microrganismos, eficiência fermentativa, redução na relação acetato:propionato e produção de CH₄ em diferentes substratos (COLOMBATTO et al., 2007; EUN; BEAUCHEMIN, 2007a, 2007b; EUN; BEAUCHEMIN; SCHULZE, 2007; EUN; BEAUCHEMIN, 2008; GIRALDO et al., 2008; KRUEGER et al., 2008; KRUEGER; ADESOGAN, 2008).

A diminuição na relação acetato:propionato observado nos trabalhos *in vitro* de Eun e Beauchemin (2007a) e Giraldo et al. (2008) e na relação CH₄:AGCC no trabalho *in vitro* de Giraldo et al. (2008) levantaram a hipótese da utilização de EFE como uma possível estratégia para mitigação do CH₄ entérico produzido pelos animais ruminantes, devido ao fato da redução nessa relação ser considerada um mecanismo primário para redução na produção de CH₄ (BEAUCHEMIN et al., 2008; GRAINGER; BEAUCHEMIN, 2011). A maior produção de propionato indica menor disponibilidade de H₂ para ser utilizado pelas bactérias metanogênicas para formação do CH₄, uma vez que o H₂ seria consumido no processo fermentativo para formação do propionato (CHUNG et al., 2012).

Assim, vários estudos *in vitro* e *in vivo* começaram a ser desenvolvidos com a utilização de EFE, tendo como um dos objetivos, a mitigação na produção de CH₄ entérico (ARRIOLA et al., 2011; ZHOU et al., 2011; CHUNG et al., 2012; SOLTAN et al., 2013; TANG et al., 2013; WANG; XUE, 2016).

Mais recentemente, pesquisas *in vitro* foram desenvolvidas avaliando a adição das EFE em diferentes substratos sobre a produção de gases, parâmetros fermentativos, degradabilidade da fração fibrosa e utilização dos nutrientes, visando aumento na produtividade animal assim como redução nos impactos ambientais causados pela produção agropecuária, promovendo maior sustentabilidade ao setor de ruminantes (DINESHKUMAR et al., 2014; DÍAZ et al., 2015; ROMERO et al., 2015; ELGHANDOUR et al., 2016; LÓPEZ et al., 2016; GADO et al., 2017; HERNÁNDEZ et al., 2017; KHOLIF et al., 2017; VALLEJO-HERNÁNDEZ et al., 2018).

2.3.1 Parede celular vegetal e sistemas enzimáticos celulolítico e hemicelulolítico

A parede celular vegetal é uma estrutura complexa composta por celulose, hemicelulose, lignina, pectina, proteínas, minerais e açúcares solúveis. Esses compostos podem ser divididos em solúveis e insolúveis. A celulose e hemicelulose são os polissacarídeos estruturais mais abundantes nas plantas e junto com a lignina constituem a porção insolúvel (VAN SOEST, 1994) e suas interações constroem a estrutura da parede celular vegetal (SUN et al., 2016). A distribuição da celulose, hemicelulose e lignina apresenta variação dependendo do tipo da planta (JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007)

A celulose é um polissacarídeo composto por unidades de glicose unidas entre si por ligações glicosídicas do tipo β -1,4 podendo apresentar grau de polimerização superior a 10,000 unidades (SOMERVILLE et al., 2004; JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007; SUN et al., 2016), sendo o polímero orgânico mais abundante na natureza (SUN et al., 2016). A cadeia linear da celulose permite a formação de ligações de hidrogênio entre as cadeias, levando a formação das microfibrilas que apresentam em torno de 36 cadeias de celulose unidas entre si, o que a torna de natureza cristalina (região bem ordenada) e de difícil degradação (SOMERVILLE et al., 2004; VAN DYK; PLETSCHE, 2012; SUN et al., 2016). No entanto, algumas regiões apresentam natureza amorfa (região menos ordenada) e de mais fácil degradação (VAN DYK; PLETSCHE, 2012; SUN et al., 2016).

A hemicelulose é um polímero composto por xilose e arabinose (pentoses), manose, galactose e glicose (hexoses) e ácidos urônicos, unidas através de ligações glicosídicas do tipo β -1,4, constituindo o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza (SAHA, 2003; DASHTBAN; SCHRAFT; QIN, 2009; GÍRIO et al., 2010). O grau de polimerização da hemicelulose pode chegar até 200 unidades (SAHA, 2003; SUN et al., 2016). As ramificações

presentes na hemicelulose podem formar ligações de hidrogênio com as microfibrilas de celulose (SOMERVILLE et al., 2004).

A lignina é o composto não polissacarídeo mais abundante das plantas formada pela polimerização de unidades de fenilpropano constituída de três monômeros, o álcool *p*-cumárico, álcool coniferílico e álcool sinapílico (JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007).

Para que ocorra a completa degradação da celulose e hemicelulose, há a necessidade de um complexo sistema de enzimas envolvidas na quebra das ligações β -1,4 presentes em ambas as moléculas até a liberação de seus monossacarídeos. Os sistemas enzimáticos necessários para hidrólise da celulose e hemicelulose são distintos, onde um atua sobre a celulose e outro sobre a hemicelulose, e são denominados de sistema celulolítico e sistema hemicelulolítico (GUPTA et al., 2016).

O sistema celulolítico, responsável pela hidrólise da celulose até glicose, é composto por três enzimas (endoglucanase, exoglucanase e β -glicosidade) que agem em sinergismo. As endo-1,4- β -glucanases ou endoglucanases (EC 3.2.1.4) são as responsáveis pelo ataque aleatório as ligações internas da cadeia da celulose (região amorfa) produzindo polímeros de celulose (terminais redutores e não redutores) com diversos graus de polimerização (HORN et al., 2012; ADESOGAN et al., 2014; GUPTA et al., 2016;). As exo-1,4- β -glucanases, exoglucanases ou celobiohidrolases atuam nos terminais redutores (EC 3.2.1.176) e não redutores (EC 3.2.1.91) dos polímeros de celulose, liberados após a ação da endoglucanase, produzindo celobiose (duas unidades de glicose unidas por ligação β -1,4) (ADESOGAN et al., 2014; GUPTA et al., 2016). As β -1,4-glicosidades ou celobiasas (EC 3.2.1.21) são responsáveis pela hidrólise da celobiose ou celo-oligossacarídeos até glicose (BEAUCHEMIN et al., 2003; ADESOGAN et al., 2014; GUPTA et al., 2016).

O sistema hemicelulolítico, decorrente da hemicelulose apresentar diferentes grupos laterais de moléculas, possui um sistema mais complexo de enzimas que atuam sobre a hemicelulose (VAN DYK; PLETSCHE, 2012; ADESOGAN et al., 2014; GUPTA et al., 2016). As hemiceluloses mais importantes são as xilanas e as glucomananas (GÍRIO et al., 2010), sendo a xilana um dos principais componentes da hemicelulose vegetal (BIELY, 1985). Duas enzimas compõem o sistema xilanolítico, responsável pela hidrólise completa das ligações β -1,4 glicosídicas das xilanas. As endo-1,4- β -xilanasas ou xilanasas (EC 3.2.1.8) clivam as ligações das xilanas até oligossacarídeos de diferentes graus de polimerização e as β -xilosidases (EC 3.2.1.37) clivam os xilo-oligossacarídeos e xilobiose (duas unidades de xilose unidas por ligação glicosídica β -1,4) até xilose (GÍRIO et al., 2010; VAN DYK;

PLETSCHKE, 2012). Algumas enzimas acessórias são necessárias para hidrólise da hemicelulose, como a xilana esterase, feruloil esterase, *p*-coumaroil esterase, α -1-arabinofuranosidase e α -glucuronidases (SÁNCHEZ, 2009).

Apesar de existir um sistema enzimático específico para degradação da lignina (GUPTA et al., 2016) deve-se destacar que a lignina não sofre degradação em condições anaeróbias (RODRIGUES; VIEIRA, 2006; VAN KUIJK et al., 2015). No entanto, a interação da lignina com os polímeros de celulose e hemicelulose limita o acesso dos microrganismos a esses polímeros (GUPTA et al., 2016), dificultando a hidrólise pelas enzimas. Decorrente a isso, pré-tratamentos químico, físico, físico-químico e biológico passaram a ser utilizados com o objetivo de aumentar a degradação da lignina e incrementar a ação das enzimas fibrolíticas sobre os polímeros de celulose e hemicelulose (VAN KUIJK et al., 2015).

A celulose e hemicelulose são os carboidratos mais abundantes nas dietas dos animais (SONG et al., 2018) e são considerados os polissacarídeos potencialmente degradados no rúmen (SUSMEL; STEFANON, 1993). Sua degradação acontece com a ação dos microrganismos ruminais, que são capazes de produzir as enzimas necessárias para degradação desses polissacarídeos da parede celular vegetal, assim, aproveitando os nutrientes (digestibilidade) provenientes das forragens, porém de forma incompleta, contribuindo com a maior excreção de nutrientes no ambiente e limitando a produtividade animal (BEAUCHEMIN et al., 2003, 2004).

A degradação incompleta dos polissacarídeos pelos microrganismos ruminais pode ocorrer devido ao fluxo de saída dos alimentos do rúmen, não permanecendo o tempo necessário para completa degradação da fibra (SUSMEL; STEFANON, 1993), da dificuldade de colonização e penetração dos microrganismos e suas enzimas a superfície do alimento (BEAUCHEMIN et al., 2003) ou mesmo da quantidade insuficiente de enzimas endógenas necessárias (SONG et al., 2018), além do acesso limitado dos microrganismos as frações de celulose e hemicelulose que possuem interação e/ou ligações químicas com a lignina (RODRIGUES; VIEIRA, 2006).

Nesse sentido, a utilização de EFE pode ser uma estratégia para facilitar o ataque e aderência dos microrganismos ruminais as partículas do alimento, diminuindo o tempo de colonização, pelo fato das enzimas adicionadas servirem como um pré-tratamento, e assim, disponibilizando maior quantidade de monossacarídeos para serem fermentados, ou então, reduzindo o grau de polimerização dos polissacarídeos, facilitando a aderência dos microrganismos ao substrato, além de poderem agir em sinergismo com os microrganismos

ruminais e suas enzimas endógenas (NSEREKO et al., 2000; DÍAZ et al., 2015; ELGHANDOUR et al., 2016).

2.3.2 Mecanismos de ação das enzimas fibrolíticas exógenas

Entender o mecanismo de ação das enzimas fibrolíticas se faz necessário para garantir resultados positivos nos estudos com animais (BEAUCHEMIN et al., 2004). Nesse sentido, três mecanismos de ação são descritos e que podem explicar os melhores resultados observados sobre o desempenho animal e degradabilidade dos substratos em estudos *in vitro* e *in vivo*, sendo eles o efeito pré-ingestivo ou efeito pré-consumo, efeito ruminal e efeito pós-ruminal (BEAUCHEMIN et al., 2004; MEALE et al., 2014).

O efeito pré-consumo pode ser explicado pelo fato da aplicação das enzimas na dieta antes do fornecimento proporcionar uma alteração estrutural na porção fibrosa do alimento, o que facilitaria sua degradação no rúmen (BEAUCHEMIN et al., 2004). Ademais, a aplicação das enzimas na dieta antes do fornecimento ao animal aumenta o tempo de permanência das enzimas no ambiente ruminal resultante da menor proteólise pelos microrganismos ruminais devido a maior quantidade de enzimas ligadas ao substrato, garantindo maior ação das enzimas (BEAUCHEMIN et al., 2003, 2004; MEALE et al., 2014).

Processos como estes foram demonstrados por Nsereko et al. (2000), que trataram feno de alfafa com enzimas fibrolíticas e observaram aumento na degradação da fibra em detergente neutro (FDN). Kholif et al. (2017) ensilaram três resíduos agrícolas com diferentes doses de EFE por 30 dias e verificaram uma diminuição nas quantidades de FDN, fibra em detergente ácido (FDA), celulose e hemicelulose. Da mesma forma, estudos conduzidos por Díaz et al. (2015) demonstraram resultados satisfatórios sobre a redução da FDN de forrageiras tropicais após o pré-tratamento com EFE, entretanto os resultados foram substratos dependentes. Nesse contexto, pode-se afirmar que a ação das enzimas sobre a degradação dos carboidratos não pode ser vista de uma maneira tão simplista (BEAUCHEMIN et al., 2003).

Os efeitos das enzimas fibrolíticas não são apenas na alteração estrutural da fibra antes do fornecimento, mas também em nível ruminal. Hristov, McAllister e Cheng (1998) demonstraram que as enzimas fibrolíticas possuem estabilidade ruminal por apresentarem resistência a proteólise pelos microrganismos ruminais após análises *in vitro*. Além disso, esses pesquisadores observaram que a atividade enzimática ruminal aumentava tempos após a inoculação das enzimas fibrolíticas no rúmen (avaliação *in situ*) de bovinos leiteiros canulados, atingindo o pico de atividade 1,5 horas após a inoculação, apresentando uma

concentração média de açúcares redutores maior, indicando atividade dessas enzimas na degradação dos carboidratos estruturais no rúmen. Song et al. (2018) observaram aumento nas atividades celulolítica e xilanolítica ruminal de cabritos suplementados com mistura enzimática contendo endoglucanases e xilanases, reforçando os resultados anteriores sobre estabilidade ruminal.

Outros trabalhos também demonstraram relativa estabilidade das enzimas fibrolíticas a proteólise ruminal, permanecendo tempo suficiente para agir dentro do rúmen, não sendo considerado um fator limitante na utilização das enzimas na dieta de ruminantes. Variações na estabilidade ruminal podem ser observadas, no entanto elas são dependentes da enzima analisada e do produto enzimático a ser utilizado (MORGAVI et al., 2000a; 2001).

Nesse sentido, a comprovação da estabilidade das EFE no ambiente ruminal pode proporcionar uma ação sinérgica entre os microrganismos ruminais e as enzimas exógenas sobre a hidrólise dos alimentos, sendo considerado também um dos prováveis mecanismos de ação das enzimas exógenas (MEALE et al., 2014), como demonstrado em estudos utilizando enzimas endógenas extraídas do conteúdo ruminal de novilhos e enzimas exógenas comerciais, onde a mistura das enzimas endógenas e exógenas aumentaram a capacidade hidrolítica quando comparado com as enzimas individualmente (MORGAVI et al., 2000b). Assim, essa sinergia seria uma forma de cooperação entre as enzimas endógenas e exógenas resultando no aumento da atividade hidrolítica ruminal excedendo a atividade individual de cada enzima (BEAUCHEMIN et al., 2004).

Outro possível mecanismo de ação das EFE a nível ruminal é o estímulo da colonização e aderência dos microrganismos ruminais à porção fibrosa do alimento. O mecanismo exato para que isso ocorra é desconhecido (BEAUCHEMIN et al., 2004; RIBEIRO et al., 2015), contudo é proposto que as enzimas causem modificações na estrutura da parede celular removendo barreiras físicas que dificultariam a adesão microbiana (BEAUCHEMIN et al., 2004; SONG et al., 2018) e assim, reduzindo o tempo de colonização dos microrganismos no substrato. Arriola et al. (2011) atribuíram o aumento na digestibilidade da matéria seca (MS), proteína bruta (PB), FDN e FDA, em vacas holandesas em início de lactação, ao aumento na colonização microbiana ruminal as partículas do alimento após a aplicação de enzimas fibrolíticas.

Wang et al. (2012) constataram que a pré-incubação de dois substratos com diferentes doses de enzimas fibrolíticas proporcionaram aumento na colonização por *Ruminococcus flavefaciens*, mas não apresentando um bom resultado com *Fibrobacter succinogenes*, concluindo que a eficácia de utilização das enzimas exógenas depende de

fatores como dose utilizada, tipo de substrato e espécie bacteriana. López et al. (2016) também verificaram redução no tempo de colonização com adição de 7,0 mg g⁻¹ de EFE em folhas de três espécies arbóreas utilizadas na nutrição de ovinos e caprinos.

Estímulo no crescimento das populações microbianas ruminais com a adição de EFE foram revisados por Beauchemin et al. (2003; 2004) sendo sugerido como possível mecanismo de ação das enzimas exógenas. Pesquisas conduzidas com bovinos leiteiros suplementados com EFE observaram aumento na população de bactérias que utilizam os produtos oriundos da hidrólise da celulose, como as bactérias que utilizam a celobiose (NSEREKO et al., 2002). Giraldo et al. (2007) relataram que a adição de EFE em estudos com o uso da técnica de simulação ruminal (Rusitec – Rumen Simulation Technique) estimulou o crescimento de bactérias associadas a fase líquida, porém sem alteração na população microbiana associada a fase sólida. De acordo com esses pesquisadores, as bactérias presentes na fase líquida do rúmen não apresentam ligação com as partículas do alimento, fermentando apenas monossacarídeos e não os carboidratos estruturais. Assim, o aumento no crescimento dessas bactérias seria um indicativo de maior hidrólise da dieta proporcionada pelas enzimas exógenas.

Chung et al. (2012) constataram que a adição de EFE não proporcionou aumento na densidade populacional de bactérias e protozoários totais, contudo, ocorreu o aumento na densidade populacional de algumas espécies de bactérias. Salem et al. (2013) verificaram aumento nos derivados de purinas totais (indicador de síntese de proteína microbiana) de novilhos cruzados suplementados com um produto comercial enzimático, sugerindo um estímulo e/ou aumento no número de bactérias totais no rúmen. Já nos estudos de Yuangklang et al. (2017) e Vallejo-Hernández et al. (2018) foi observado que a adição de EFE aumentou a contagem total das bactérias, mas a contagem dos protozoários totais não foi afetada.

Efeitos pós-ruminal também podem ser observados em estudos com a adição de EFE. Meale et al. (2014) postularam um possível aumento no desempenho animal pelo fato das enzimas que passam para o trato digestivo inferior reduzirem a viscosidade da digesta e assim, aumentando a absorção dos nutrientes. Isso se torna possível decorrente dos resultados encontrados por Hristov, McAllister e Chen (1998) que observaram aumento na atividade enzimática no conteúdo duodenal de vacas em lactação após a adição de enzimas fibrolíticas exógenas diretamente no rúmen do animal, mostrando que algumas enzimas possuem a capacidade de passarem pelo retículo-rúmen e abomaso sem sofrer proteólise e manterem sua atividade no intestino delgado, contudo esse fluxo é muito dependente do tipo de enzima utilizada.

2.4 Produção de enzimas fibrolíticas com biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica é representada principalmente pelos resíduos agrícolas, agroindustriais e florestais, sendo considerada fontes renováveis, de baixo custo (MAITAN-ALFENAS; VISSER; GUIMARÃES, 2015) e as mais disponíveis no mundo (VAN KUIJK et al., 2015) sendo composta principalmente por celulose, hemicelulose e lignina (SÁNCHEZ, 2009; GÍRIO et al., 2010; VAN KUIJK et al., 2015).

A atividade agrícola e agroindustrial brasileira gera uma grande quantidade de resíduos oriundos dos processos de produção (GRAMINHA et al., 2008) e que muitas vezes não apresentam um destino correto de descarte, ocasionando não apenas problemas ambientais (SÁNCHEZ, 2009; MAITAN-ALFENAS; VISSER; GUIMARÃES, 2015; GADO et al., 2017; KHOLIF et al., 2017), mas também perda econômica pelo descarte de uma matéria-prima que pode ser utilizada em outras atividades industriais (SÁNCHEZ, 2009) através da utilização desses resíduos para produção de outros produtos de maior valor agregado (CARVALHO et al., 2013, 2015; MAITAN-ALFENAS; VISSER; GUIMARÃES, 2015; DE FIGUEIREDO et al., 2017).

Nesse contexto, como os resíduos agrícolas e agroindustriais são ricos em polissacarídeos (celulose e hemicelulose), esse material pode servir como matéria-prima para a produção de enzimas (RAVINDRAN; JAISWAL, 2016) pelo fato de alguns microrganismos conseguirem hidrolisar esses polissacarídeos e utilizá-los como fonte de energia e carbono (SÁNCHEZ, 2009). Os fungos são muito utilizados para produção enzimática pelo seu potencial em degradar material lignocelulósico, possuindo a capacidade de produzir uma mistura de enzimas que utilizam os polissacarídeos como fonte de carbono (GUPTA et al., 2016). Apesar de existir uma grande variedade de microrganismos produtores de enzimas, por questões de custos de produção, somente os grandes produtores são selecionados (CARVALHO et al., 2015).

Facchini et al. (2011) observaram que o fungo *Aspergillus japonicus* foi eficiente na produção de celulases e xilanases utilizando-se de diferentes resíduos agroindustriais como fonte abundante e barata de carbono. As enzimas produzidas foram pré-incubadas com diferentes forragens tropicais, resultando no aumento de açúcares redutores liberados, indicando um aumento na atividade hidrolítica do extrato enzimático sobre as forragens utilizadas.

Carvalho et al. (2015) demonstraram que os fungos *Trichoderma reesei* e *Aspergillus fumigatus* são capazes de produzirem enzimas xilanolíticas utilizando o bagaço de cana-de-açúcar como única fonte de carbono, além dessas enzimas terem apresentado uma boa

termoestabilidade e manutenção da atividade com grande variação no pH. Isso se torna importante decorrente das condições de temperatura e pH dentro do ambiente ruminal, fazendo com que essas enzimas mantenham sua atividade nas condições ruminais.

Com o grande avanço biotecnológico na produção de enzimas com o uso de resíduos lignocelulósicos, dando origem a produtos economicamente viáveis, há a necessidade de um destino de utilização desses produtos. A nutrição de ruminantes é considerada uma área com grande potencial de exploração diante da necessidade do desenvolvimento de EFE destinadas para uso nessa cadeia de produção (BEAUCHEMIN et al., 2004) com desenvolvimento de produtos estáveis e eficientes em nível ruminal (ADESOGAN et al., 2014) em consequência de os produtos enzimáticos utilizados na dieta de ruminantes não serem destinados a esse propósito (GRAMINHA et al., 2008).

2.5 Adição de enzimas fibrolíticas exógenas em estudos *in vitro*: efeitos sobre a hidrólise do substrato, parâmetros fermentativos e produção de metano

Diversos estudos *in vitro* foram realizados com a utilização de enzimas fibrolíticas exógenas para incremento na degradação da fração fibrosa, melhora na qualidade nutricional dos substratos utilizados na dieta dos ruminantes e produção de CH₄. Os ensaios *in vitro*, além de terem um custo/benefício excelente, são rápidos e possibilitam o uso de um grande número de amostras para serem analisadas, possibilitando a utilização de vários substratos e diferentes doses enzimáticas (MEALE et al., 2014) e assim, selecionar o produto que apresente melhor resposta em diferentes substratos (ADESOGAN et al., 2014; ROMERO et al., 2015).

Soltan et al. (2013) testaram dois produtos comerciais de EFE, um com celulases e outro com xilanases, adicionados em cinco forrageiras tropicais usualmente utilizadas no sistema de produção de ruminantes no Brasil. Esses pesquisadores observaram que o produto a base de celulase aumentou a produção de gases, a degradabilidade verdadeira da matéria orgânica (DVMO), a degradabilidade da fibra em detergente neutro (DFDN), a concentração de butirato e propionato, contudo sem efeitos na produção de CH₄. O produto xilanólico não proporcionou nenhum efeito sobre a produção de gases, degradabilidade e parâmetros fermentativos em nenhum dos substratos utilizados.

Tang et al. (2013) estudaram a ação de celulases exógenas, produzidas por três espécies de fungos, adicionadas em duas gramíneas e três resíduos agrícolas, encontrando resultados positivos sobre a DMS, DFDN e produção total de AGCC, além de redução nos parâmetros nitrogênio amoniacal (N-NH₃), pH e produção de CH₄. Além disso, esses pesquisados concluíram que a dose ideal de cada enzima é dependente do substrato utilizado.

Dineshkumar et al. (2014) avaliaram diferentes temperaturas e tempo de pré-incubação dos mesmos produtos enzimáticos utilizados por Soltan et al. (2013) adicionados na forrageira *Brachiaria* com as mesmas doses. Foi observado que o aumento na temperatura e no tempo de pré-incubação proporcionaram efeitos negativos sobre a produção de gases, DVMO e DFDN, entretanto os pesquisadores sugeriram que a adição de celulases pode melhorar a qualidade nutricional da *Brachiaria* em condições ambientes e sem pré-tratamento.

Romero et al. (2015) demonstraram que a utilização de 12 produtos enzimáticos comerciais (endoglucanase, exoglucanase, β -glicosidase, xilanase e feruloil esterase) adicionados no substrato Tifton 85 (*Cynodon dactylon*) apresentaram diferentes respostas sobre a digestibilidade da matéria seca, da FDN, da FDA e da hemicelulose, assim como na produção de AGCC. O resultado da pré-incubação por 24 horas também proporcionou efeitos variados entre os 12 produtos testados. Apesar da grande variação nos parâmetros analisados, os produtos enzimáticos possibilitaram o aumento na digestibilidade da FDN e nas concentrações dos AGCC e redução na relação acetato:propionato. Como algumas enzimas testadas melhoraram o valor nutritivo do capim Tifton-85, os autores sugeriram que a adição dessas enzimas poderia incrementar a digestibilidade de forrageiras tropicais e subtropicais. Ademais, os resultados mostraram que a atividade enzimática deve ser utilizada apenas para caracterizar o produto e não para escolher a enzima que irá apresentar melhor resultado sobre a digestibilidade da forragem ou desempenho animal.

Díaz et al. (2015) avaliaram a adição de EFE em diferentes forrageiras tropicais verificando aumento na produção de gases após período de pré-incubação dos substratos com as enzimas, aumento na produção de AGCC totais, propionato e butirato, e aumento na DMS e DFDN, concluindo que as enzimas fibrolíticas podem estimular a atividade fermentativa ruminal. Elghandour et al. (2016) também observaram efeitos positivos da pré-incubação de xilanases exógenas em três resíduos agrícolas, além do aumento na degradabilidade dos resíduos, mas sem alteração nos AGCC.

Duas pesquisas utilizaram a mesma mistura enzimática aplicadas na ensilagem de diferentes resíduos agroindustriais, com o objetivo de melhorar a qualidade nutricional desses resíduos. Ambos os estudos relataram que a ensilagem com o uso de uma mistura multi-enzimas melhorou a bio-utilização anaeróbica dos nutrientes (aumento na quantidade de PB e redução na fração fibrosa) e a degradação da fração fibrosa dos resíduos agroindustriais utilizados (GADO et al., 2017; KHOLIF et al., 2017).

Elghandour et al. (2016) utilizando um produto comercial contendo EFE (celulases, β -glucanases e xilanases) com três doses e Kholif et al. (2017) utilizando duas doses de uma mistura enzimática comercial (celulases, xilanases, α -amilases e proteases) observaram um aumento na produção de gases de resíduos tratados com enzimas fibrolíticas, além de ter sido verificado efeito de interação entre o tipo de substrato x dose enzimática. A mesma resposta foi observada para produção de CH_4 , sendo a produção dependente do substrato utilizado. Essa resposta pode ser atribuída a diferenças na composição e proporção dos nutrientes de cada substrato (ELGHANDOUR et al., 2016).

López et al. (2016) testaram duas doses de uma mistura enzimática contendo celulases e xilanases mais o controle em três substratos diferentes, observando alteração na cinética de fermentação e redução no tempo de colonização com a dose mais alta. Além disso, essa dose proporcionou um incremento na produção de gases às 24 horas em um dos substratos utilizados, sugerindo um aumento na extensão da fermentação nas primeiras 24 horas de incubação. Ademais, nesse estudo também foi observado interação entre substrato x dose enzimática, confirmando que a eficácia das EFE dependem do tipo de substrato utilizado.

Hernández et al. (2017) constataram que diferentes doses de xilanases exógenas reduziram a produção de gases assíntota, contudo ocorreu um efeito positivo sobre a taxa de produção de gases e redução na produção de CH_4 quando comparado com o controle, indicando uma melhora na fermentação ruminal. Vallejo-Hernández et al. (2018) verificaram que a inclusão de xilanase exógena alterou a taxa de produção de gases e diminuiu o tempo de colonização, indicando melhor utilização dos nutrientes. Além disso, relataram que a falta de resposta sobre a produção de gases e a menor proporção de CH_4 provam a eficácia da adição das enzimas fibrolíticas sobre a redução nas emissões de CH_4 , no entanto não souberam explicar quais as razões para essa redução, mas concluíram que a adição de xilanase proporcionou mudanças qualitativas na produção de gases e uma melhora nas condições ruminiais. No caso dos parâmetros fermentativos pH, N-NH_3 , fator de partição e rendimento de gás as 24 horas não foram afetados, sendo apenas observado aumento nas concentrações dos AGCC.

2.6 Avaliação *in vivo* da adição de enzimas fibrolíticas exógenas sobre o desempenho animal, fermentação ruminal, digestibilidade dos nutrientes e produção de metano entérico

Apesar dos ensaios *in vitro* servirem como uma etapa inicial para escolha de melhores doses e melhores misturas enzimáticas a serem aplicadas em um determinado substrato, sendo considerada uma ótima ferramenta para prever os resultados *in vivo*, ainda assim há a necessidade de estudos com a utilização de animais para confirmar efetivamente a eficácia de cada enzima a ser utilizada na dieta (MEALE et al., 2014).

Pesquisas demonstraram que a aplicação de EFE em dietas totais (volumoso + concentrado) para vacas em lactação melhoraram a digestibilidade da dieta, contudo, sem afetar a produção de leite. Porém, foi observada uma melhora na eficiência de produção de leite nas vacas que receberam a dieta com EFE. Ademais, ocorreu um aumento na produção de AGCC e uma tendência na redução da relação acetato:propionato, verificando uma melhora na eficiência de utilização energética no rúmen pela menor proporção de CH₄ entérico produzido (ARRIOLA et al., 2011).

A produção de CH₄ entérico e a comunidade microbiana metanogênica foram avaliadas no estudo de Zhou et al. (2011) em bovinos leiteiros suplementados com doses crescentes de um produto enzimático comercial contendo endoglucanases e xilanases. Os pesquisadores observaram que a produção de CH₄ entérico, expresso em gramas por cabeça dia ou g kg⁻¹ MS consumida, aumentou com a adição das enzimas exógenas. Apesar disso, o aumento na dose enzimática proporcionou uma melhora na conversão alimentar dos animais suplementados, sugerindo que o tratamento com as EFE incrementou a digestibilidade da fibra dietética e, conseqüentemente, aumentou a quantidade de H₂ no ambiente ruminal, disponibilizando maior quantidade de substrato para as arqueas metanogênicas.

Chung et al. (2012) verificaram aumento na produção de CH₄ entérico de vacas em lactação com a adição de duas doses de EFE (endoglucanases e xilanases), mesmo quando corrigido para consumo e produção de leite. Não foram verificados resultados positivos sobre o consumo de matéria seca (CMS), eficiência de produção de leite e produção de leite, assim como nos parâmetros fermentativos. Esses autores concluíram que o delineamento experimental utilizado (quadrado latino) no estudo possa não ser adequado para avaliação da suplementação enzimática em vacas em lactação decorrente do curto período de tempo, sugerindo realização de experimentos mais longos, como relatado posteriormente na meta-análise publicada por Adesogan et al. (2014).

Arriola et al. (2017) publicaram uma meta-análise avaliando 15 estudos com 17 experimentos utilizando EFE e seus efeitos sobre o desempenho de vacas em lactação. Foi relatado que a adição de enzimas exógenas não afetou o CMS e nem a eficiência alimentar (EA), mas aumentou a produção de leite e o rendimento de proteína e lactose em quantidades pequenas a moderadas. Tirado-González et al. (2018) avaliaram duas dietas (baixo volumoso <50% volumoso e alto volumoso >50% volumoso) e adição de EFE na dieta de vacas em lactação também através de meta-análise. Esses pesquisadores relataram que a adição das enzimas afetou negativamente o CMS das duas dietas. Na dieta com baixo volumoso, a adição de enzimas não proporcionou efeitos positivos sobre a produção de leite e sólidos do leite. Porém, na dieta com alto volumoso, a suplementação de enzimas resultou em maior produção de leite e proteína e gordura do leite. Com esses resultados, os pesquisadores evidenciaram que seria possível aumentar a quantidade de volumoso na dieta de bovinos em lactação com a adição de EFE.

Resultados divergentes também foram observados em estudos com bovinos de corte suplementados com EFE. Salem et al. (2013) verificaram aumento de 12% na digestibilidade dos nutrientes, 16% no ganho médio diário de peso (GMDP), melhora de 9% na conversão alimentar (CA) e aumento nas concentrações dos AGCC e N-NH₃ de bovinos cruzados suplementados com enzimas exógenas (endoglucanases, xilanases, α -amilases e proteases). He et al. (2014) avaliaram a adição de duas doses de uma mistura enzimática comercial contendo endoglucanases e xilanases na dieta de novilhos confinados em fase de terminação, não observando diferenças sobre o CMS, peso corporal final, GMDP e energia líquida para ganho nos animais suplementado com enzimas exógenas.

Outro estudo conduzido por He et al. (2015) relataram que o uso de duas doses de um produto comercial contendo endoglucanases, exoglucanases, xilanases e proteases na dieta de novilhos em crescimento confinados não influenciaram o peso corporal, GMDP e a EA, porém foi observada uma tendência de redução linear sobre o CMS. Apesar da falta de resultados positivos sobre o desempenho dos animais, os pesquisados sugeriram que possa ter ocorrido um pequeno incremento na DMS, pois a tendência de redução no CMS com o uso de enzimas exógenas não reduziu o peso corporal nem o GMDP dos animais.

Tirado-González et al. (2018) analisaram diversos trabalhos (meta-análise) e observaram que bovinos de corte suplementados com enzimas fibrolíticas exógenas recebendo dietas com alto volumoso (>50% volumoso da dieta) apresentaram melhora no CMS, mas sem efeito sobre GMDP e CA. Já para os estudos que utilizaram baixo volumoso (<50% volumoso na dieta) os efeitos sobre o CMS, GMDP e CA melhoraram com a adição

das enzimas exógenas. Os pesquisadores sugeriram que a melhora nos índices zootécnicos em dietas com maior quantidade de concentrado pode estar associada à ação das enzimas fibrolíticas sobre a celulose presente nas cascas dos grãos utilizados.

No caso dos pequenos ruminantes, resultados inconsistentes também são observados (TIRADO-GONZÁLEZ et al., 2018). Gado et al. (2011) ensilaram polpa de laranja com e sem adição de mistura enzimática (celulases, xilanases, α -amilases e proteases) por 30 dias. Após esse período, a silagem foi fornecida para ovinos em crescimento por 90 dias. Foram utilizados três grupos de animais, controle (sem adição de polpa de laranja ensilada), grupo polpa de laranja ensilada e grupo polpa de laranja ensilada + mistura enzimática. Os pesquisadores observaram aumento nas concentrações dos AGCC às três e seis horas após o fornecimento da dieta apenas no grupo tratado com enzimas exógenas. A digestibilidade da MS aumentou, assim como a digestibilidade dos nutrientes. O CMS não teve diferença entre os grupos, mas o grupo que recebeu polpa de laranja ensilada com enzimas apresentou aumento de 31% na EA e 92% GMDP.

Aboagye et al. (2015) testaram uma mistura enzimática contendo endoglucanases e xilanases e a mistura enzimática mais bactérias que produzem a enzima feruloil esterase aplicados diretamente no feno de alfafa no momento do enfardamento e armazenamentos por 90 dias. Foram avaliadas quatro dietas fornecidas para cordeiros, controle (sem adição de aditivos), feno enfardado com a mistura enzimática, feno enfardado com a mistura enzimática mais as bactérias produtoras de feruloil esterase e dieta controle adicionada com a mistura enzimática antes do fornecimento da refeição. Foi observada uma tendência de aumento na digestibilidade da MS e MO nos animais que receberam a enzima adicionada antes do fornecimento da refeição quando comparado com o grupo controle e o grupo com adição da enzima no momento do enfardamento. No entanto, o grupo com adição de enzima no momento do enfardamento apresentou maior digestibilidade da FDN e hemicelulose quando comparado com os demais grupos. Além disso, houve uma tendência de melhora na EA dos animais tratados, porém apenas o grupo recebendo feno tratado com enzimas e bactérias apresentou maior ganho de peso quando comparado com o controle.

Wang e Xue (2016) utilizaram dois produtos enzimáticos comerciais contendo celulases e celulasas e xilanases na dieta de cabritos castrados. Os autores não observaram efeito da adição das EFE sobre o CMS, peso vivo, GMDP, digestibilidade dos nutrientes, metabolismo energético, utilização de nitrogênio e produção de CH₄ entérico. Entretanto, estudos conduzidos por Yuangklang et al. (2017), com adição de celulases e xilanases na dieta total de cabritos recebendo palha de arroz (30% da dieta) como única fonte de volumoso na

dieta, demonstraram que a adição de EFE proporcionou aumento no GMDP e uma melhora de 28% na EA. Ademais, ocorreu um aumento na digestibilidade da MS, MO, FDN e FDA nos animais suplementados com EFE além de aumento na concentração de acetato, dos AGCC totais e do N-NH₃. Os pesquisadores concluíram que a adição de EFE pode melhorar a qualidade nutricional da palha de arroz e, conseqüentemente, aumentar a produtividade animal.

Song et al. (2018) observaram aumento no GMDP, CA e digestibilidade dos nutrientes da dieta, com exceção da PB, em cabritos suplementados com um produto comercial a base de endoglucanases e xilanases. No caso dos parâmetros fermentativos, houve um aumento na concentração dos AGCC e uma tendência de redução do acetato e aumento no propionato, mas sem alterações no pH ruminal. A concentração de N-NH₃ foi reduzida e a concentração de proteína bruta microbiana ruminal aumentada.

2.7 Variações na atividade enzimática utilizadas nos estudos *in vitro* e *in vivo*

A atividade enzimática de determinados produtos, normalmente é fornecida em Unidades Internacionais (UI). No entanto, muitas empresas comerciais adotam diferentes tipos de atividade enzimática e que muitas vezes dificultam o entendimento e a comparação de produtos utilizados nos estudos (BEAUCHEMIN et al., 2003; COLOMBATTO; BEAUCHEMIN, 2003).

A atividade enzimática expressa em UI representa a quantidade de enzima necessária para catalisar uma reação com liberação de um μmol de açúcar redutor min^{-1} nas condições do ensaio. Para evitar confusão devido as diferentes quantidades de enzimas utilizadas nos ensaios com ruminantes, Colombatto e Beauchemin (2003) recomendaram expressar a atividade enzimática em UI mL^{-1} ou g^{-1} do produto enzimático utilizado sem diluição. As determinações da atividade enzimática nos trabalhos com ruminantes normalmente seguem as metodologias propostas por Wood e Bhat (1988) para determinação de endoglucanase, exoglucanase e β -glicosidase e por Bailey, Biely e Poutanen (1992) para determinação da xilanase e β -xilosidade e que posteriormente foram padronizadas por Colombatto e Beauchemin (2003) para o uso na dieta de ruminantes.

Devido ao fato de muitas enzimas utilizadas nos trabalhos com ruminantes serem destinadas para outros fins, resultados insatisfatórios podem ser observados decorrentes da caracterização inadequada dos produtos, principalmente por estes apresentarem atividade máxima em temperatura e pH diferentes das condições ruminais (ADESOGAN et al., 2014).

Assim, caracterizações das enzimas utilizando condições não representativas do ambiente ruminal podem superestimar a capacidade hidrolítica de cada enzima no rúmen (ADESOGAN et al., 2014).

As atividades enzimáticas (UI g⁻¹ MS) observadas nos estudos *in vitro* apresentados no item 2.5 apresentaram uma grande variação, sendo verificados valores entre 0,07 a 62 UI g⁻¹ MS para celulase, destacando que a celulase mais utilizada foi a endoglucanase, e valores entre 0,06 a 101,38 UI g⁻¹ MS para xilanase.

No caso dos estudos *in vivo*, variações também foram observadas nos estudos descritos (item 2.6). Para pequenos ruminantes (ovinos e caprinos), a atividade enzimática utilizada variou entre 35,5 a 20000 UI kg⁻¹ MS para celulase e entre 11,5 a 10000 UI kg⁻¹ MS para xilanase. Dentre os bovinos (corte e leite), as atividades variaram entre 30 a 722 UI kg⁻¹ MS para celulase e entre 92 a 3498 UI kg⁻¹ MS para xilanase. Como destacado para os ensaios *in vitro*, das enzimas pertencentes a classe das celulases, a mais utilizada nos estudos *in vivo* foi a endoglucanase.

A importância de salientar a grande variação entre as atividades utilizadas nos estudos é devido ao fato de a atividade enzimática não ser um bom parâmetro para escolha de um produto enzimático que poderá desempenhar papel na melhoria da qualidade nutricional dos substratos ou no desempenho animal, e sim apenas para caracterização bioquímica do produto que será testado. Isso porque, os ensaios de atividade enzimática utilizam substratos puros para reação com as enzimas, o que não caracteriza o papel exato das enzimas sobre a composição de cada substrato (BEAUCHEMIN et al., 2003; ADESOGAN et al., 2014). Muitas vezes, pesquisas utilizam enzimas parecidas e com atividades enzimáticas semelhantes, porém as repostas não são homogêneas, indicando que a atividade enzimática não possui uma correlação positiva com o aumento na degradação da fração fibrosa dos alimentos ou mesmo sobre o aumento no desempenho animal.

Assim, testar diversas doses enzimáticas torna-se mais eficaz do que apenas se respaldar nos resultados de atividade enzimática, principalmente porque a otimização da dose garante o uso eficiente do produto enzimático, decorrente do alto custo, além de que doses muito baixas ou muito altas podem não ter respostas positivas sobre a degradação dos substratos e/ou desempenho animal (ADESOGAN et al., 2014).

Referências

- ABDALLA, A. L. et al. In vitro evaluation, in vivo quantification, and microbial diversity studies of nutritional strategies for reducing enteric methane production. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v. 44, n. 5, p. 953–64, 2012.
- ABOAGYE, I. A. et al. Digestibility and growth performance of sheep fed alfalfa hay treated with fibrolytic enzymes and a ferulic acid esterase producing bacterial additive. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 203, p. 53–66, 2015.
- ADESOGAN, A. T. et al. Improving cell wall digestion and animal performance with fibrolytic enzymes. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 92, n. 4, p. 1317–1330, 2014.
- ARRIOLA, K. G. et al. Effect of fibrolytic enzyme application to low- and high-concentrate diets on the performance of lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 94, n. 2, p. 832–841, 2011.
- ARRIOLA, K. G. et al. A meta-analysis on the effect of dietary application of exogenous fibrolytic enzymes on the performance of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 100, n. 6, p. 4513–4527, 2017.
- BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 23, n. 3, p. 257–270, 1992.
- BEAUCHEMIN, K. A. et al. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 81, n. 14, p. E37–E47, 2003. Suppl. 2.
- BEAUCHEMIN, K. A. et al. Mode of action of exogenous cell wall degrading enzymes for ruminants. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 84, n. 1, p. 13–22, 2004.
- BEAUCHEMIN, K. A. et al. Nutritional management for enteric methane abatement: a review. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Victoria, v. 48, n. 2, p. 21, 2008.
- BEAUCHEMIN, K. A.; COLOMBATTO, D.; MORGAVI, D. P. A rationale for the development of feed enzyme products for ruminants. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 84, n. 1, p. 23–36, 2004.
- BEAUCHEMIN, K. A.; RODE, L. M.; SEWALT, V. J. H. Fibrolytic enzymes increase fiber digestibility and growth rate of steers fed dry forages. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 75, n. 4, p. 641–644, 1995.
- BERCHIELLI, T. T.; MESSANA, J. D.; CANESIN, R. C. Produção de metano entérico em pastagens tropicais. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 13, n. 4, p. 954–968, 2012.
- BIELY, P. Microbial xylanolytic systems. **Trends in Biotechnology**, London, v. 3, n. 11, p. 286–290, 1985.

CARDOSO, A. S. et al. Impact of the intensification of beef production in Brazil on greenhouse gas emissions and land use. **Agricultural Systems**, Oxford, v. 143, p. 86–96, 2016.

CARVALHO, A. F. A. et al. Xylo-oligosaccharides from lignocellulosic materials: Chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis. **Food Research International**, Amsterdam, v. 51, n. 1, p. 75–85, 2013.

CARVALHO, A. F. A. et al. Screening of Xylanolytic *Aspergillus fumigatus* for Prebiotic Xylooligosaccharide Production Using Bagasse. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v. 53, n. 4, p. 428–435, 2015.

CERRI, C. C. et al. Assessing the carbon footprint of beef cattle in Brazil: a case study with 22 farms in the State of Mato Grosso. **Journal of Cleaner Production**, Oxford, v. 112, p. 2593–2600, 2016.

CHUNG, Y.-H. et al. A fibrolytic enzyme additive for lactating Holstein cow diets: Ruminal fermentation, rumen microbial populations, and enteric methane emissions. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 95, n. 3, p. 1419–1427, 2012.

CLAY, J. Freeze the footprint of food. **Nature**, London, v. 475, n. 7356, p. 287–289, 2011.

COLOMBATTO, D. 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**, Amsterdam, v. 137, n. 1, p. 150–162, 2007.

COLOMBATTO, D.; BEAUCHEMIN, K. A. A proposed methodology to standardize the determination of enzymic activities present in enzyme additives used in ruminant diets. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 83, n. 3, p. 559–568, 2003.

COTTLE, D. J.; NOLAN, J. V.; WIEDEMANN, S. G. Ruminant enteric methane mitigation: a review. **Animal Production Science**, Victoria, v. 51, n. 6, p. 491, 2011.

CRIST, E.; MORA, C.; ENGELMAN, R. The interaction of human population, food production, and biodiversity protection. **Science**, Washington, DC, v. 356, n. 6335, p. 260–264, 2017.

DASHTBAN, M.; SCHRAFT, H.; QIN, W. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities & perspectives. **International Journal of Biological Sciences**, New South Wales, v. 5, n. 6, p. 578–95, 2009.

DE FIGUEIREDO, F. C. et al. Chemical input reduction in the arabinoxylan and lignocellulose alkaline extraction and xylooligosaccharides production. **Bioresource Technology**, Essex, v. 228, p. 164–170, 2017.

DE OLIVEIRA SILVA, R. et al. Sustainable intensification of Brazilian livestock production through optimized pasture restoration. **Agricultural Systems**, Oxford, v. 153, p. 201–211, 2017.

DÍAZ, A. et al. Treatment of tropical forages with exogenous fibrolytic enzymes: effects on chemical composition and in vitro rumen fermentation. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 99, n. 2, p. 345–55, 2015.

DINESHKUMAR, D. et al. Effect of temperature and pre-incubation time of fibrolytic enzymes on in vitro degradability of Brachiaria (*Brachiaria decumbens*). **Animal Production Science**, Victoria, v. 54, n. 10, p. 1779, 2014.

EISLER, M. C. et al. Agriculture: Steps to sustainable livestock. **Nature**, London, v. 507, n. 7490, p. 32–34, 2014.

ELGHANDOUR, M. M. Y. et al. Influence of the addition of exogenous xylanase with or without pre-incubation on the in vitro ruminal fermentation of three fibrous feeds. **Czech Journal of Animal Science**, Prague, v. 61, n. 6, p. 262–272, 2016.

EUCLIDES, V. P. B. et al. Brazilian scientific progress in pasture research during the first decade of XXI century. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 39, n. special, p. 151–168, 2010.

EUN, J.-S.; BEAUCHEMIN, K. A. Assessment of the efficacy of varying experimental exogenous fibrolytic enzymes using in vitro fermentation characteristics. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 132, n. 3–4, p. 298–315, 2007a.

EUN, J.-S.; BEAUCHEMIN, K. A. Enhancing in vitro degradation of alfalfa hay and corn silage using feed enzymes. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, n. 6, p. 2839–2851, 2007b.

EUN, J.-S.; BEAUCHEMIN, K. A. Relationship between enzymic activities and in vitro degradation of alfalfa hay and corn silage. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 145, n. 1, p. 53–67, 2008.

EUN, J.-S.; BEAUCHEMIN, K. A.; SCHULZE, H. Use of exogenous fibrolytic enzymes to enhance in vitro fermentation of alfalfa hay and corn silage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, n. 3, p. 1440–51, 2007.

FACCHINI, F. D. A. et al. Optimization of fibrolytic enzyme production by *Aspergillus japonicus* C03 with potential application in ruminant feed and their effects on tropical forages hydrolysis. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, New York, v. 34, n. 8, p. 1027–1038, 2011.

FAO. **An international consultation on integrated crop-livestock systems for development**. The way forward for sustainable production. Rome, 2010. (Integrated Crop Management, 13).

FERRAZ, J. B. S.; FELÍCIO, P. E. DE. Production systems – An example from Brazil. **Meat Science**, Barking, v. 84, n. 2, p. 238–243, 2010.

GADO, H. M. et al. Influence of exogenous enzymes ensiled with orange pulp on digestion and growth performance in lambs. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 165, n. 1–2, p. 131–136, 2011.

GADO, H. M. et al. Rumen degradation and nutritive utilization of wheat straw, corn stalks and sugarcane bagasse ensiled with multienzymes. **Journal of Applied Animal Research**, Oxford, v. 45, n. 1, p. 485–489, 2017.

GERBER, P. J. et al. **Tackling climate change through livestock**: a global assessment of emissions and mitigation opportunities. Roma, 2013a.

GERBER, P. J. et al. Technical options for the mitigation of direct methane and nitrous oxide emissions from livestock: a review. **Animal**, Cambridge, v. 7, n. s2, p. 220–234, 2013b.

GIRALDO, L. A. et al. Effects of exogenous cellulase supplementation on microbial growth and ruminal fermentation of a high-forage diet in Rusitec fermenters1. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 85, n. 8, p. 1962–1970, 2007.

GIRALDO, L. A. et al. Effects of exogenous fibrolytic enzymes on in vitro ruminal fermentation of substrates with different forage:concentrate ratios. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 141, n. 3–4, p. 306–325, 2008.

GÍRIO, F. M. et al. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, n. 13, p. 4775–4800, 2010.

GRAINGER, C.; BEAUCHEMIN, K. A. Can enteric methane emissions from ruminants be lowered without lowering their production? **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 166–167, p. 308–320, 2011.

GRAMINHA, E. B. N. et al. Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 144, n. 1–2, p. 1–22, 2008.

GUILHERME, R. D. F. et al. Characterization and typology of sheep and goat production systems in the State of Paraíba, a semi-arid region of northeastern Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 38, n. 4, p. 2163, 2017.

GUPTA, V. K. et al. Fungal Enzymes for Bio-Products from Sustainable and Waste Biomass. **Trends in Biochemical Sciences**, London, v. 41, n. 7, p. 633–645, 2016.

HAMMOND, K. J. et al. Review of current in vivo measurement techniques for quantifying enteric methane emission from ruminants. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 219, p. 13-30, 2016.

HE, Z. X. et al. Using a fibrolytic enzyme in barley-based diets containing wheat dried distillers grains with solubles: Ruminal fermentation, digestibility, and growth performance of feedlot steers1. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 92, n. 9, p. 3978–3987, 2014.

HE, Z. X. et al. Effect of wheat dried distillers grains with solubles and fibrolytic enzymes on ruminal fermentation, digestibility, growth performance, and feeding behavior of beef cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 93, n. 3, p. 1218, 2015.

HERNANDEZ, A. et al. The effect of garlic oil, xylanase enzyme and yeast on biomethane and carbon dioxide production from 60-d old Holstein dairy calves fed a high concentrate diet. **Journal of Cleaner Production**, Oxford, v. 142, p. 2384–2392, 2017.

HERNÁNDEZ, A. et al. Effectiveness of xylanase and *Saccharomyces cerevisiae* as feed additives on gas emissions from agricultural calf farms. **Journal of Cleaner Production**, Oxford, v. 148, p. 616–623, 2017.

HORN, S. et al. Novel enzymes for the degradation of cellulose. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 5, n. 1, p. 45, 2012.

HRISTOV, A. N. et al. Review: Ammonia emissions from dairy farms and beef feedlots. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 91, n. 1, p. 1–35, 2011.

HRISTOV, A. N. et al. Special topics--Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: I. A review of enteric methane mitigation options. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 91, n. 11, p. 5045–69, 2013a.

HRISTOV, A. N. et al. Special topics--Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: III. A review of animal management mitigation options. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 91, n. 11, p. 5095–113, 2013b.

HRISTOV, A. N.; MCALLISTER, T. A.; CHENG, K.-J. Stability of exogenous polysaccharide-degrading enzymes in the rumen. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 76, n. 1–2, p. 161–168, 1998.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Produção da pecuária municipal**. Rio de Janeiro, 2016. v. 44, 51 p.

JANK, L. et al. The value of improved pastures to Brazilian beef production. **Crop and Pasture Science**, Victoria, v. 65, n. 11, p. 1132, 2014.

JANSSEN, P. H. Influence of hydrogen on rumen methane formation and fermentation balances through microbial growth kinetics and fermentation thermodynamics. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 160, n. 1–2, p. 1–22, 2010.

JØRGENSEN, H.; KRISTENSEN, J. B.; FELBY, C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, Hoboken, v. 1, n. 2, p. 119–134, 2007.

KHOLIF, A. E. et al. Anaerobic ensiling of raw agricultural waste with a fibrolytic enzyme cocktail as a cleaner and sustainable biological product. **Journal of Cleaner Production**, Oxford, v. 142, p. 2649–2655, 2017.

KOZLOSKI, G. V. **Bioquímica dos ruminantes**. 3. ed. Santa Maria: Editora UFSM, 2016.

KRUEGER, N. A. et al. The potential to increase digestibility of tropical grasses with a fungal, ferulic acid esterase enzyme preparation. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 145, n. 1, p. 95–108, 2008.

KRUEGER, N. A.; ADESOGAN, A. T. Effects of different mixtures of fibrolytic enzymes on digestion and fermentation of bahiagrass hay. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 145, n. 1, p. 84–94, 2008.

KU-VERA, J. C. et al. Determination of methane yield in cattle fed tropical grasses as measured in open-circuit respiration chambers. **Agricultural and Forest Meteorology**, Amsterdam, v. 58, p. 3-7, 2018.

LOBATO, J. F. P. et al. Brazilian beef produced on pastures: Sustainable and healthy. **Meat Science**, Barking, v. 98, n. 3, p. 336–345, 2014.

LÓPEZ, D. et al. In vitro gas production of foliage from three browse tree species treated with different dose levels of exogenous fibrolytic enzymes. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 100, n. 5, p. 920–928, 2016.

MAITAN-ALFENAS, G. P.; VISSER, E. M.; GUIMARÃES, V. M. Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: converting food waste in valuable products. **Current Opinion in Food Science**, Oxford, v. 1, p. 44–49, 2015.

MCAULIFFE, G. A. et al. Distributions of emissions intensity for individual beef cattle reared on pasture-based production systems. **Journal of Cleaner Production**, Oxford, v. 171, p. 1672–1680, 2018.

MCMANUS, C. et al. Distribution of goat breeds in Brazil and their relationship with environmental controls. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 30, n. 6, p. 1819–1836, 2014.

MEALE, S. J. et al. Opportunities and challenges in using exogenous enzymes to improve ruminant production. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 92, n. 2, p. 427–442, 2014.

MORGAVI, D. P. et al. Stability and stabilization of potential feed additive enzymes in rumen fluid. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 26, n. 2–4, p. 171–177, 2000a.

MORGAVI, D. P. et al. Synergy Between Ruminal Fibrolytic Enzymes and Enzymes from *Trichoderma longibrachiatum*. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 83, n. 6, p. 1310–1321, 2000b.

MORGAVI, D. P. et al. Resistance of feed enzymes to proteolytic inactivation by rumen microorganisms and gastrointestinal proteases. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 79, n. 6, p. 1621, 2001.

NSEREKO, V. L. et al. Effects of fungal enzyme preparations on hydrolysis and subsequent degradation of alfalfa hay fiber by mixed rumen microorganisms in vitro. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 88, n. 3–4, p. 153–170, 2000.

NSEREKO, V. L. et al. Effect of a fibrolytic enzyme preparation from *Trichoderma longibrachiatum* on the rumen microbial population of dairy cows. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 48, n. 1, p. 14–20, 2002.

OPIO, C. et al. **Greenhouse gas emissions from ruminant supply chains** – A global life cycle assessment. Rome: FAO, 2013. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/018/i3461e/i3461e00.htm>>. Acesso em: 23 abr. 2018.

PEREIRA, C. H. et al. Grazing supplementation and crop diversification benefits for southern Brazil beef: A case study. **Agricultural Systems**, Oxford, v. 162, p. 1–9, 2018.

PETERSEN, S. O. Greenhouse gas emissions from liquid dairy manure: Prediction and mitigation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 101, n. 7, p. 6642–6654, 2018.

RAVINDRAN, R.; JAISWAL, A. Microbial Enzyme Production Using Lignocellulosic Food Industry Wastes as Feedstock: A Review. **Bioengineering**, Basel, v. 3, n. 4, p. 30, 2016.

RIBEIRO, G. O. et al. Effect of fibrolytic enzymes added to a *Andropogon gayanus* grass silage-concentrate diet on rumen fermentation in batch cultures and the artificial rumen (Rusitec). **Animal**, Cambridge, v. 9, n. 7, p. 1153–62, 2015.

RODE, L. M.; YANG, W. Z.; BEAUCHEMIN, K. A. Fibrolytic enzyme supplements for dairy cows in early lactation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 82, n. 10, p. 2121–2126, 1999.

RODRIGUES, M. T.; VIEIRA, R. A. M. Metodologias aplicadas ao fracionamento de alimentos. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. (Ed.). **Nutrição de ruminantes**. 1. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2006. p. 25–55.

ROMERO, J. J. et al. Screening exogenous fibrolytic enzyme preparations for improved in vitro digestibility of bermudagrass haylage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 98, n. 4, p. 2555–67, 2015.

RUVIARO, C. F. et al. Carbon footprint in different beef production systems on a southern Brazilian farm: a case study. **Journal of Cleaner Production**, Oxford, v. 96, p. 435–443, 2015.

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 30, n. 5, p. 279–291, 2003.

SALEM, A. Z. M. et al. Effects of exogenous enzymes on nutrient digestibility, ruminal fermentation and growth performance in beef steers. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 154, n. 1–3, p. 69–73, 2013.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 27, n. 2, p. 185–194, 2009.

SOLTAN, Y. A. et al. Response of different tropical pasture grass species to treatments with fibrolytic enzymes in terms of in vitro ruminal nutrient degradation and methanogenesis. **Animal Nutrition and Feed Technology**, Amsterdam, v. 13, n. 3, p. 551–568, 2013.

SOMERVILLE, C. et al. Toward a systems approach to understanding plant cell walls. **Science**, Washington, DC, v. 306, n. 5705, p. 2206–2211, 2004.

SONG, S. D. et al. Effects of exogenous fibrolytic enzyme supplementation to diets with different NFC/NDF ratios on the growth performance, nutrient digestibility and ruminal fermentation in Chinese domesticated black goats. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 236, p. 170–177, 2018.

SUN, S. et al. The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. **Bioresource Technology**, Essex, v. 199, p. 49–58, 2016.

SUSMEL, P.; STEFANON, B. Aspects of lignin degradation by rumen microorganisms. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 30, n. 1, p. 141–148, 1993.

TANG, S. X. et al. Effects of exogenous cellulase source on in vitro fermentation characteristics and methane production of crop straws and grasses. **Animal Nutrition and Feed Technology**, Izzatnagar, v. 13, n. 3, p. 489–505, 2013.

TIRADO-GONZÁLEZ, D. N. et al. Meta-analysis: effects of exogenous fibrolytic enzymes in ruminant diets. **Journal of Applied Animal Research**, Oxford, v. 46, n. 1, p. 771–783, 2018.

UNITED NATIONS. Department of Economic and Social Affairs, Population Division. **World population prospects: The 2017 revision. v. 2: Demographic profiles**. New York, 2017. (ST/ESA/SER.A, 400).

VALLEJO-HERNÁNDEZ, L. H. et al. Environmental impact of yeast and exogenous xylanase on mitigating carbon dioxide and enteric methane production in ruminants. **Journal of Cleaner Production**, Oxford, v. 189, p. 40–46, 2018.

VAN DYK, J. S.; PLETSCHE, B. I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes—Factors affecting enzymes, conversion and synergy. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 30, n. 6, p. 1458–1480, 2012.

VAN KUIJK, S. J. A. et al. Fungal treated lignocellulosic biomass as ruminant feed ingredient: A review. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 33, n. 1, p. 191–202, 2015.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2. ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994.

WANG, L.; XUE, B. Effects of cellulase supplementation on nutrient digestibility, energy utilization and methane emission by boer crossbred goats. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, Seoul, v. 29, n. 2, p. 204–210, 2016.

WANG, Y. et al. Effect of exogenous fibrolytic enzyme application on the microbial attachment and digestion of barley straw in vitro. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, Seoul, v. 25, n. 1, p. 66–74, 2012.

WILKINSON, J. M.; LEE, M. R. F. Review: Use of human-edible animal feeds by ruminant livestock. **Animal**, Cambridge, v. 12, n. 8, p. 1735-1743, 2018.

WOOD, T. M.; BHAT, K. M. Methods for measuring cellulase activities. In: WOOD, W. A.; KELLOGG, S. T. (Ed.). **Methods in enzymology**. London: Elsevier, 1988. v. 160, p. 87–112.

YUANGKLANG, C. et al. Growth performance and macronutrient digestion in goats fed a rice straw based ration supplemented with fibrolytic enzymes. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 154, p. 20–22, 2017.

ZHOU, M. et al. Relationship between rumen methanogens and methane production in dairy cows fed diets supplemented with a feed enzyme additive. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 111, n. 5, p. 1148–1158, 2011.

3. ENZIMAS FIBROLÍTICAS EXÓGENAS PODEM MELHORAR A DEGRADABILIDADE *IN VITRO* DE FORRAGEIRAS TROPICAIS

Resumo

FORAGEIRAS TROPICAIS normalmente apresentam baixo valor nutricional devido à alta quantidade de fibra em sua composição química, comprometendo a sustentabilidade da produção pecuária e resultando em maiores emissões de metano entérico (CH₄). Nesse contexto, enzimas fibrolíticas exógenas passaram a ser estudadas com o objetivo de melhorar a degradabilidade da fração fibrosa e a eficiência na utilização energética de forrageiras de baixa qualidade nutricional. O objetivo foi avaliar o efeito de doses crescentes de um extrato de enzimas fibrolíticas (EEF) exógenas produzido pelo fungo *Trichoderma reesei* sobre a degradabilidade *in vitro* da matéria orgânica, parâmetros fermentativos, produção total de gases e metano de forrageiras tropicais. Foram realizadas análises bromatológicas das forrageiras tropicais. O EEF foi submetido ao ensaio de atividade enzimática para as enzimas endoglucanase, exoglucanase e xilanase. As atividades encontradas foram de 1,45, 0,01 e 102,5 UI mL⁻¹ do EEF, respectivamente para endoglucanase, exoglucanase e xilanase. Foi utilizado o ensaio *in vitro* de produção de gases em um delineamento ao acaso em arranjo fatorial 4 x 3 + 1 com quatro doses do EEF (10, 100, 1000 e 10000 µL g⁻¹ de substrato) e três substratos (*Cynodon* spp., *Panicum maximum* e *Cenchrus ciliaris* L.) e o controle (substrato sem adição do EEF). A dose mais alta aumentou (P < 0,05) a degradabilidade, a produção total de gases e o CH₄ em todos os substratos. A concentração de butirato aumentou enquanto a relação acetato:propionato e pH reduziram (P < 0,05) com a adição do EEF. Esses resultados indicam que o uso de enzimas fibrolíticas exógenas produzidas com a utilização de resíduos agroindustriais pode ser uma estratégia de melhorar a degradabilidade de forrageiras de baixa qualidade, contribuindo para a sustentabilidade e intensificação da produção pecuária em países tropicais.

Palavras-chave: Fermentação. Degradabilidade da fibra. Produção de gases. Produção de ruminantes a pasto.

3. Fibrolytic enzymes may improve *in vitro* degradability of tropical forages

Abstract: Tropical forages typically have poor nutritional value due to its high amount of fibre in their chemical composition compromising the sustainability of livestock production and resulting in high enteric methane (CH₄) emissions in tropical countries. In order to increase fibre degradability and energy utilization efficiency from low quality forages exogenous fibrolytic enzymes have been studied. In this assay we evaluated the effects of increasing dose levels of fibrolytic enzymes extract (FEE) produced by *Trichoderma reesei*, on *in vitro* organic matter degradability, fermentation parameters, total gas and CH₄ production of tropical forages. Forages samples were analyzed for their chemical composition. Enzyme activity from FEE was performed for endoglucanase, exoglucanase and xylanase. The activities were 1.45, 0.01 and 102.5 IU mL⁻¹ of the FEE, for endoglucanase, exoglucanase and xylanase respectively. The *in vitro* gas production technique was used in a completely randomized experimental design in a 4 x 3 + 1 factorial arrangement with four FEE dose levels (10, 100, 1000 and 10000 µL g⁻¹ of substrate) and three substrates (*Cynodon* spp., *Panicum maximum*, and *Cenchrus ciliaris* L.) plus the control (substrate without FEE addition). The highest dose level increased (P < 0.05) degradability, total gas and CH₄ production in all substrates. Butyrate concentration increased while acetate-to-propionate ratio and pH decreased (P < 0.05) with the addition of FEE. These results indicated that the use of fibrolytic enzymes produced through agricultural resources can be a reliable way to improve degradability of low-quality forages, contributing to the sustainability and intensification of livestock production in tropical countries.

Keywords: Fermentation. Fibre degradability. Gas production. Grass-fed ruminant production

3.1 Introdução

As gramíneas forrageiras são consideradas as principais fontes de nutrientes dos animais ruminantes, principalmente nos países tropicais. Normalmente, essas forrageiras apresentam baixa qualidade nutricional, proporcionando uma baixa produtividade (DÍAZ et al., 2015). A qualidade da forragem interfere na produção de metano (CH_4) entérico, nas quais forrageiras com baixa digestibilidade produzem maiores quantidade de CH_4 (HRISTOV et al., 2013; TANG et al., 2013; GUYADER et al., 2016), promovendo perda energética dos nutrientes ingeridos (HRISTOV et al., 2013) e, conseqüentemente, reduzindo a produtividade animal decorrente da energia eliminada na forma de CH_4 , além de contribuir com as emissões dos gases de efeito estufa (GEE) decorrente dessa maior emissão (HERNANDEZ et al., 2017).

Pesquisadores estimaram as pegadas de carbono de diferentes sistemas de produção de bovinos de corte na região Sul do Brasil demonstrando que o consumo de matéria seca de forragens de baixa digestibilidade produz maior quantidade de dióxido de carbono (CO_2) equivalente por kg de ganho de peso vivo, indicando maior emissão de CH_4 (RUVIARO et al., 2015). Por outro lado, Oliveira Silva et al. (2016) demonstraram que o aumento da produtividade animal aliado à redução nas áreas desmatadas impactaria na menor emissão dos GEE pelo fato dos produtores tenderem a intensificar o sistema de produção decorrente do aumento na demanda por produtos de origem animal.

Nesse contexto, diversos estudos demonstraram que a utilização de enzimas fibrolíticas exógenas pode aumentar a degradabilidade de forrageiras em estudos *in vitro* (SOLTAN et al., 2013; DINESHKUMAR et al., 2014; DÍAZ et al., 2015; ROMERO et al., 2015;) e *in vivo* (BEAUCHEMIN; RODE; SEWALT, 1995; ARRIOLA et al., 2011; HE et al., 2015; YUANGKLANG et al., 2017; SONG et al., 2018). Baseado nesses estudos, a utilização de enzimas fibrolíticas exógenas podem ser uma maneira de melhorar a qualidade de substratos fibrosos (DINESHKUMAR et al., 2014; KHOLIF et al., 2017; YUANGKLANG et al., 2017) e reduzir as perdas energéticas por diminuir as emissões de CH_4 entérico (HRISTOV et al., 2015).

O uso de enzimas fibrolíticas exógenas pode ser uma estratégia sustentável para aumentar a degradabilidade da fração fibrosa em sistemas de criação de ruminantes a pasto pelo fato dessas enzimas serem produzidas por microrganismos que crescem em substratos de baixa qualidade, como a palha da cana-de-açúcar. Dessa forma, nossa hipótese é que estas enzimas possam incrementar a degradabilidade das frações fibrosas presentes na parede celular vegetal, melhorando o aproveitamento dos nutrientes da dieta, promovendo um

aumento na produtividade animal e reduzindo a produção de CH₄ entérico por unidade de produto de origem animal produzido, e assim, reduzindo as pegadas de carbono e levando a uma maior sustentabilidade dos sistemas de produção agrícola e de ruminantes.

Por se tratar de um produto sem utilização prévia na dieta de ruminantes, ensaios *in vitro* simulando o ambiente ruminal se fazem necessários para verificar quais os efeitos da utilização desse produto sobre a atividade microbiana ruminal. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar a possibilidade de utilização de um extrato de enzimas fibrolíticas exógenas na dieta de ruminantes com adição de doses crescentes analisando seu efeito sobre a degradabilidade dos nutrientes, parâmetros fermentativos ruminais e produção total de gases e de CH₄ de três forrageiras tropicais utilizadas nos sistemas de produção de ruminantes do Brasil.

3.2 Materiais e métodos

Todos os procedimentos e análises desse experimento foram realizados nas instalações do Laboratório de Nutrição Animal (LANA) do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) – Universidade de São Paulo, localizado no município de Piracicaba – SP, Brasil, de acordo com as recomendações da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – CENA/USP 014/2016).

3.2.1 Enzimas e ensaio de atividade enzimática

O extrato de enzimas fibrolíticas (EEF) utilizado no presente estudo foi produzido por fermentação submersa utilizando o fungo *Trichoderma reesei* e palha de cana-de-açúcar como substrato. Todos os procedimentos para produção do EEF foram realizados no Instituto de Pesquisas em Bioenergia (IPBEN) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita filho” (UNESP), Campus de Assis – SP, Brasil, de responsabilidade do Professor Doutor Pedro de Oliva Neto. A produção e caracterização do extrato enzimático foram determinadas de acordo com as recomendações de Carvalho et al. 2015.

O EEF foi submetido às análises de atividade enzimática, em condições controladas de pH e temperatura (pH 6,6 e 39°C, condições consideradas ótimas para o ambiente ruminal). Foi determinado a atividade das enzimas fibrolíticas endo-1,4-β-glucanase ou endoglucanase (EC 3.2.1.4) e exo-1,4-β-glucanase ou exoglucanase (3.2.1.91) realizadas de acordo com a metodologia descrita por Wood e Bhat (1988) e endo-1,4-β-xilanase ou xilanase (3.2.1.8) de acordo com a metodologia descrita por Bailey, Biely e Poutanen (1992).

A atividade enzimática do EEF seguiu as modificações propostas por Colombatto e Beauchemin (2003) para padronização da metodologia de determinação da atividade enzimática em produtos utilizados na dieta de ruminantes.

O ensaio de atividade enzimática consiste na quantificação de açúcares redutores através do método colorimétrico do ácido dinitrosalicílico proposto por Sumner (1921) e posteriormente modificado por Miller (1959), no qual o ácido 3,5-dinitrosalicílico, em condições alcalinas e aquecimento, reage com o grupo carbonil livre dos açúcares redutores sendo reduzido a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, composto altamente colorido e com máxima absorção de luz a 540 nm, permitindo a quantificação de açúcares redutores através de sua colorimetria (GONÇALVES et al., 2010; VASCONCELOS; PINTO; ARAGÃO, 2013).

Foi preparado solução a 1% (p/v) dos substratos utilizados, sendo Carboximetilcelulose sódica (Sigma-Aldrich C4888-500G - Carboximetilcellulose sodium salt), Sigmacell Microcristalina (Sigma-Aldrich S3504-500G - Sigmacell Cellulose) e xilano obtido de madeira de Faia (Sigma-Aldrich X4252-25G - Xylan, from Beechwood), respectivamente, para endoglucanase, exoglucanase e xilanase, solução tampão fosfato-citrato com pH 6,6, solução de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) e solução a 0,1% (p/v) de glicose (Sigma-Aldrich G5767-25G - D-(+)-glucose) e xilose (Sigma-Aldrich X1500-500G - D-(+)-xylose) como padrões utilizados para ajuste da curva padrão.

A determinação da atividade enzimática da xilanase foi realizada preparando primeiramente os tubos de “substrato branco”, onde não há a adição do EEF, adicionando 0,9 mL de solução tampão + 1,0 mL de xilano obtido de madeira de Faia + 0,1 mL de água destilada; “enzima branco”, onde foi adicionado 0,9 mL de solução tampão + 1,0 mL de água destilada; e “enzima + substrato”, adicionando 0,9 mL de solução tampão + 1,0 mL de xilano obtido de madeira de Faia. Os tubos foram preparados em triplicata e incubados em estufa a 39°C por dez minutos para condicionamento das soluções a temperatura. Após esse período, os tubos foram retirados e foi adicionado 0,1 mL do EEF, diluído em 1:50, em intervalos iguais (ex.: a cada 10 s) para permitir o mesmo tempo de reação entre todos os tubos, completando o volume para 2 mL. Após a adição do EEF, os tubos foram incubados novamente em estufa a 39°C respeitando o tempo de reação de cinco minutos.

Durante o tempo de reação, os tubos do padrão xilose foram preparados nas seguintes concentrações: 0 (sem adição do padrão xilose e 2 mL de água destilada), 0,1 (0,1 mL do padrão xilose + 1,9 mL de água destilada), 0,2 (0,2 mL do padrão xilose + 1,8 mL de água destilada), 0,3 (0,3 mL do padrão xilose + 1,7 mL de água destilada) e 0,4 (0,4 mL do padrão xilose + 1,6 mL de água destilada) mg de xilose mL⁻¹.

Terminado o tempo de reação, os tubos foram retirados da estufa e foi adicionado 3 mL do reagente DNS (volume final dos tubos = 5 mL), em intervalos iguais (ex.: a cada 10 s), na mesma ordem de adição do EEF, para interrupção da reação, e agitados em aparelho Vórtex e colocados em banho maria com água fervendo por cinco minutos. Posteriormente, os tubos foram resfriados em água até atingir a temperatura ambiente e lidos em espectrofotômetro (JENWAY 7315 – Cole-Parmer, UK) a 540 nm. Após determinado a curva padrão, a equação gerada pela curva foi utilizada para calcular a atividade da enzima xilanase sendo expresso em Unidades Internacionais (UI), onde uma UI de enzima catalisa a formação de 1 μmol de açúcar redutor min^{-1} nas condições do ensaio (COLOMBATTO; BEAUCHEMIN, 2003).

A determinação da atividade enzimática da enzima endoglucanase seguiu os mesmos procedimentos realizados com a enzima xilanase, com alteração do substrato de reação da enzima (Carboximetilcelulose sódica), adição do EEF sem diluição e com mudança do reagente para determinação da curva padrão (glicose), porém utilizados nas mesmas concentrações (0, 0,1, 0,2, 0,3, e 0,4 mg de glicose mL^{-1}). A equação gerada pela curva padrão da glicose foi utilizada para calcular a atividade enzimática da endoglucanase expressa em UI mL^{-1} do EEF.

Para a enzima exoglucanase, os procedimentos são os mesmos até a adição do EEF, que também foi realizado sem diluição, mudando o substrato (Sigmacell Microcristalina) e outros procedimentos descritos a seguir. Após a adição do EEF, o tempo de incubação para reação da enzima foi de 120 minutos. Ao final do tempo de reação, os tubos foram retirados e colocados em banho maria com água fervendo por dez minutos para interromper a reação, resfriados até atingirem a temperatura ambiente e centrifugados (IEC Centra-7R, Thermo Scientific IEC, USA) a 1000 x g por dez minutos. Durante a centrifugação os tubos do padrão glicose foram preparados seguindo as mesmas concentrações para a enzima endoglucanase. Terminado a centrifugação, foi pipetado 1 mL do sobrenadante, adicionado em outro tubo de mesma identificação e adicionado mais 1 mL de água destilada (volume de 2 mL). Após esse procedimento, foram adicionados 3 mL do reagente DNS e os tubos foram colocados em banho maria com água fervendo por cinco minutos. Os tubos foram resfriados em água até a temperatura ambiente e lidos em espectrofotômetro a 540 nm. A equação gerada pela curva padrão da glicose foi utilizada para calcular a atividade enzimática da exoglucanase expressa em UI mL^{-1} do EEF.

Tabela 3.1 - Atividade enzimática do extrato bruto de enzimas fibrolíticas produzido pelo fungo *Trichoderma reesei* utilizando palha de cana-de-açúcar como substrato

Atividade enzimática* (UI mL ⁻¹ do EEF)	Endoglucanase**	Exoglucanase**	Xilanase***
	1,45	0,01	102,5

EEF = extrato de enzimas fibrolíticas, UI = unidades internacionais ($\mu\text{mol min}^{-1}$).

* Atividade enzimática determinada a 39°C e pH 6,6. ** μmol de glicose $\text{min}^{-1} \text{mL}^{-1}$ liberado da carboximetilcelulose sódica e sigmacell microcristalina, respectivamente para endoglucanase e exoglucanase.

*** μmol de xilose $\text{min}^{-1} \text{mL}^{-1}$ liberado do xilano obtido de madeira de Faia.

3.2.2 Substratos e tratamentos

Três amostras de forragens tropicais foram utilizadas como substratos para pesquisar os efeitos do EEF sobre a degradabilidade verdadeira da matéria orgânica (DVMO) e degradabilidade da fibra em detergente neutro (DFDN) determinadas pelo ensaio *in vitro* de produção de gases. Os substratos utilizados foram o feno de Tifton-85 (*Cynodon* spp.), o capim Aruana (*Panicum maximum*) e o capim Buffel (*Cenchrus ciliaries* L.). As amostras foram secas em estufa de circulação forçada de ar (Modelo MA 037 – Marconi, Piracicaba – SP, Brasil) a 55°C até peso constante. Posteriormente, as três forrageiras passaram por processo de moagem 1 mm com auxílio de moinho tipo Wiley (Marconi, Piracicaba – SP, Brasil).

Doses crescente do EEF foram utilizadas (Tabela 3.2) para selecionar a dose que apresentasse a melhor resposta sobre a DVMO e DFDN, O EEF foi aplicado sobre cada substrato após diluição em água destilada para igualar a quantidade de solução adicionada em cada garrafinha de fermentação *in vitro* (Figura 3.1).

Tabela 3.2 – Doses e atividade enzimática aplicadas nas forrageiras tropicais

Dose do EEF ($\mu\text{L g}^{-1}$ substrato)	Atividade enzimática (UI g ⁻¹ substrato)		
	Endoglucanase*	Exoglucanase*	Xilanase**
0 (Controle)	-	-	-
10	0,0145	0,0001	1,025
100	0,145	0,001	10,25
1000	1,45	0,01	102,5
10000	14,5	0,1	1025,0

EEF = extrato de enzimas fibrolíticas, UI = unidades internacionais ($\mu\text{mol min}^{-1}$).

* μmol de glicose min^{-1} liberado da carboximetilcelulose sódica e sigmacell microcristalina, respectivamente para endoglucanase e exoglucanase. ** μmol de xilose min^{-1} liberado do xilano obtido de madeira de Faia.

Figura 3.1 – Doses crescentes do extrato de enzimas fibrolíticas e adição nas garrafinhas



3.2.3 Análise bromatológica dos substratos

Amostras das forragens foram analisadas quanto a matéria seca (MS), matéria orgânica (MO) e proteína bruta (PB) de acordo com a AOAC (2011). As frações fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e lignina em detergente ácido (LDA) foram determinadas por lavagem sequencial utilizando aparelho determinador de fibra (TE-149 Tecnal, Piracicaba – SP, Brasil) e saquinhos para determinação de fibra (modelo F57 – Ankom Technology Corp., USA) seguindo a metodologia de Van Soest, Robertson e Lewis (1991) com adaptações de Mertens (2002). A composição bromatológica dos substratos são apresentados na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 - Composição bromatológica (g kg^{-1} MS) das forrageiras tropicais utilizadas como substratos

Item	Feno Tifton-85	Capim Aruana	Capim Buffel
MS*	969	926	916
MO	930	894	928
PB	79	150	62
FDN	818	746	803
FDA	418	454	512
LDA	87	86	108
Hemicelulose**	400	292	291
Celulose**	331	368	404

* Matéria seca a 105°C. MS =matéria seca; MO = matéria orgânica; PB = proteína bruta; FDN = fibra em detergente neutro; FDA = fibra em detergente ácido; LDA = lignina em detergente ácido determinada por hidrólise em ácido sulfúrico 72%. ** A hemicelulose foi calculada pela diferença entre a FDN e FDA e a celulose pela diferença entre a FDA e LDA (SNIFFEN et al., 1992).

3.2.4 Colheita e preparo dos inoculos

Foram utilizados como doadores de inoculo seis ovinos machos castrados ($61 \pm 8,84$ kg peso vivo) canulados no rúmen. Os animais eram alimentados com feno de Tifton-85 (*Cynodon* spp.), mistura concentrada contendo 70% de milho triturado e 30% de farelo de soja e com livre acesso a mistura mineral e água. As frações líquidas e sólidas do

conteúdo ruminal foram colhidas antes da alimentação da manhã com auxílio de uma sonda acoplada a uma seringa de 60 mL (Becton-Dickson Indústria Cirúrgica, Curitiba – PR, Brasil) e uma pinça. O material colhido foi armazenado em recipientes a 39°C em condições anaeróbias e transportados para o laboratório.

Os inoculos foram preparados seguindo a metodologia de Bueno et al. (2005) misturando volumes iguais (50:50 v/v) das frações sólidas e líquidas com auxílio de um liquidificador contendo CO₂ por 10 segundos, filtrados com duas camadas de tecido de algodão e mantidos em banho maria a 39°C com fluxo constante de CO₂ até o momento da inoculação. Três inoculos foram preparados usando o conteúdo ruminal de dois animais, sendo posteriormente adicionados em 102 garrafinhas: duas garrafinhas por substrato x três substratos x quatro doses x três inoculos + 18 garrafinhas sem adição do EEF (controle = duas garrafinhas por substrato x três substratos x três inoculos) + seis garrafinhas brancas (garrafinhas contendo apenas o inoculo e solução tampão) + seis garrafinhas contendo substrato Tifton-85 (controle interno do laboratório com valores conhecidos de produção de gases).

3.2.5 Ensaio *in vitro* de produção de gases

A técnica *in vitro* de produção de gases utilizada no experimento seguiu a metodologia de Theodorou et al. (1994) utilizando sistema semiautomático de leitura de pressão (MAURICIO et al., 1999) com adaptações do Laboratório de Nutrição Animal (CENA/USP) (BUENO et al., 2005). Foi pesado 0,5 gramas (balança analítica Sartorius, Alemanha) de cada substrato dentro de saquinhos de determinação de fibra Ankom F57 (Ankom Technology Corp., USA), vedados e colocados dentro de garrafinhas de vidro de 160 mL.

Momentos antes da inoculação, foram adicionados 5 mL do EEF, já diluído em água destilada para atingir as dosagens requeridas, seguindo as recomendações de Dineshkumar et al. (2014) e 45 mL da solução de Menke (solução tampão nutritiva). Para completar o volume final de 75 mL, 25 mL de inoculo foram adicionados dentro das garrafinhas, deixando espaço para acúmulo de gases (head space) de 85 mL (LONGO et al., 2006; ABDALLA et al., 2012). As garrafinhas foram fechadas com tampa de borracha (Bellco Glass Inc., Vineland - NJ, USA), agitadas e incubadas a 39°C por 24 horas em estufa com circulação forçada de ar (Modelo MA 035 – Marconi, Piracicaba – SP, Brasil).

As leituras de pressão ocorreram com auxílio de um transdutor de pressão (Press Data 800, LANA, CENA/USP) nos tempos 4, 8, 12 e 24 horas após o início da incubação para realizar o cálculo de produção líquida total de gases após a correção para o branco (ARAUJO et al., 2011) utilizando a seguinte equação:

$$V = 7,365 \times p \quad (n = 500; r^2 = 0.99) \quad (1)$$

V = volume de gás (mL); p = pressão observada (psi) (ARAUJO et al., 2011).

3.2.6 Determinação das concentrações de metano

A cada leitura de pressão, 2,5 mL dos gases acumulados foram amostrados com auxílio de uma seringa de 5 mL (Becton-Dickson Indústria Cirúrgica, Curitiba – PR, Brasil) e armazenados dentro de tubos a vácuo de 10 mL para posterior determinação da concentração de CH₄ por meio da seguinte equação:

$$\text{CH}_4 \text{ (mL/g MS)} = (\text{HS} + \text{PG}) \times \text{CH}_4(\%) \quad (2)$$

HS = head space (85 mL); PG = produção total de gases (mL); CH_{4%} = concentração de metano (mL/mL) (LONGO et al., 2006).

Após a leitura e amostragem, os gases restantes acumulados dentro das garrafinhas foram liberados, as garrafinhas foram agitadas e colocadas novamente na estufa.

A concentração de CH₄ foi mensurada em cromatógrafo gasoso (GC-2010, Shimadzu, Tokio, Japão) com detector por ionização de chama (FID) em coluna micro empacotada Shincarbon ST 100/120, após ajuste da curva de calibração com gás CH₄ (99,5% de pureza – White Martins Industria de Gases, Osasco – SP, Brasil) nas concentrações de 0, 30, 90 e 120 mL L⁻¹. O gás hélio (He) foi utilizado como gás de arraste, com fluxo constante de 10 mL min⁻¹, mantendo condições de temperatura da coluna a 60°C, temperatura do injetor a 200°C e temperatura do detector a 240°C.

3.2.7 Degradabilidade ruminal

Ao final do período de incubação, após a última leitura de pressão e amostragem dos gases, as garrafinhas foram abertas e os saquinhos retirados e colocadas em bandejas contendo água e gelo para interromper o processo fermentativo. Todos os saquinhos foram tratados com solução de detergente neutro (SDN) (VAN SOEST; ROBERTSON; LEWIS, 1991) sem adição de α -amilase por uma hora a 90°C seguido de quatro lavagens de cinco minutos com água destilada a 90°C utilizando aparelho determinador de fibra (TE-149 Tecnal, Piracicaba – SP, Brasil) e finalizando com a lavagem dos saquinhos em acetona por cinco minutos.

Os saquinhos foram colocados em estufa a 105°C (Odontobrás 1.6, Brasil) por 24 horas e posteriormente pesados para cálculo da DFDN por diferença entre a quantidade de FDN incubada e o resíduo não degradado após as 24 horas de incubação e posterior lavagem com SDN. Após a pesagem, os saquinhos foram colocados em cadinhos de porcelana e incinerados em forno mufla (JUNG, Blumenau – SC, Brasil) a 550°C por 5,5 horas, pesados novamente e então foi determinado a DVMO, calculada pela diferença entre a MO incubada e a MO remanescente (BLÜMMEL; STEINGASS; BECKER, 1997) após correção para o branco (garrafinhas que utilizaram apenas inoculo e solução Menke).

3.2.8 Parâmetros fermentativos

O conteúdo das garrafinhas foi amostrado em frascos de vidro de 20 mL e imediatamente mensurado o pH de cada amostra com auxílio de um pHmetro (PG 2000 – Gehaka, São Paulo – SP, Brasil). Os frascos foram armazenados a -20°C para posterior análise de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) seguindo a metodologia de Palmquist e Conrad (1971) com adaptações de Lima et al. (2018b).

Para determinação dos AGCC, curvas de calibração foram preparadas com concentrações conhecidas de cada AGCC analisado. 1,6 mL do conteúdo de cada frasco foram pipetados em tubos tipo eppendorf e centrifugados a 10400 x g por 40 minutos a 4°C (Sorvall RC-5B PLUS, USA). Após a centrifugação, 800 μ L do sobrenadante foram pipetados em micro tubos, adicionados 100 μ L de ácido 2-etilbutírico (padrão interno) e 200 μ L de ácido fórmico (85%). Um microlitro da mistura foi injetado em cromatógrafo gasoso (GC-2014, Shimadzu, Tokio, Japão) com detector por ionização de chama (FID) utilizando o gás He como gás de arraste a 25 mL min⁻¹ mantendo a temperatura da coluna a 115°C, temperatura do injetor a 200°C e temperatura do detector a 260°C, com fluxo de gás

hidrogênio e ar sintético de 40 mL min⁻¹ e 400 mL min⁻¹, respectivamente, mantidos no detector (LIMA et al., 2018b).

3.2.9 Análise estatística

Foi utilizado delineamento inteiramente aleatorizado em esquema fatorial 4 x 3 + 1 com quatro doses do EEF, três substratos e um controle. A descrição das análises utilizadas no presente estudo segue o modelo estatístico abaixo:

$$Y_{ijk} = \mu + D_i + S_j + (D \times S)_{ij} + e_{ijk}, \quad (3)$$

Y_{ijk} = variável dependente; μ = média geral; D = efeito fixo das doses crescentes do EEF; S = efeito fixo dos substratos; $(D \times S)$ = efeito de interação entre dose e substrato; e = erro experimental, assumindo que $e = iid \sim N(0, \sigma_e^2)$. Os resíduos (observado – predito) foram plotados como função dos valores preditos para checar o pressuposto de normalidade e homocedasticidade.

Os dados oriundos da produção *in vitro* de gases foram submetidos a análise de variância (ANOVA) em duas vias (two-way ANOVA) usando o procedimento de modelos lineares mistos (MIXED) do software SAS v. 9.4 (Statistical Analysis System Inst., Cary - NC, USA). As médias foram comparadas usando o teste de Tukey adotando nível de significância de 5%. O procedimento de correlação de Pearson foi utilizado para verificar e confirmar correlações entre todas as variáveis estudadas. Efeitos lineares e quadráticos das doses crescentes foram analisados usando contrastes ortogonais.

3.3 Resultados

3.3.1 Produção de gases e metano *in vitro* e degradabilidade dos nutrientes

Não foram observados efeitos de interação entre dose enzimática x substrato. Foi verificado um aumento na produção líquida de gases em 24 horas (PG₂₄ mL g⁻¹ MS), produção de CH₄, DVMO e DFDN com a adição do EEF (Tabela 3.4).

Quando comparado com o controle, todas as doses do EEF utilizadas aumentaram a PG₂₄ nos três substratos (efeito linear para o capim Aruana – $P < 0,001$; efeito quadrático para o feno de Tifton-85 e capim Buffel – $P < 0,05$). A dose de 10000 µL g⁻¹ substrato aumentou a produção de CH₄ proveniente da DVMO e DFDN diferindo ($P < 0,0001$) do controle e das

demais doses nos três substratos utilizados. Ademais, foi observado um aumento na produção de CH_4 proveniente da DFDN nos substratos feno de Tifton-85 e capim Buffel com a utilização da dose de $1000 \mu\text{L g}^{-1}$ substrato.

A utilização da dose de $10000 \mu\text{L g}^{-1}$ substrato aumentou ($P < 0,0001$) a DVMO em 9,1%, 7,4%, 11,1% e a DFDN em 14,0%, 12,1% e 18,0%, respectivamente, para os substratos feno de Tifton-85, capim Aruana e capim Buffel, quando comparado com o controle. Além disso, foi observado aumento de 4,9% e 1,6% na DVMO e 7,5% e 2,7% na DFDN para os substratos Tifton-85 e capim Buffel, respectivamente, com a adição da dose de $1000 \mu\text{L g}^{-1}$ substrato do EEF quando comparado com o controle. As demais doses não apresentaram efeitos ($P > 0,05$) sobre os parâmetros analisados.

Tabela 3.4 - Parâmetros *in vitro* de produção de gases e metano e degradabilidade de forrageiras tropicais com adição de doses crescentes do extrato de enzimas fibrolíticas exógenas

Substrato	Item	Tratamentos ($\mu\text{L g}^{-1}$ substrato)					E.P.M.	Valor de P	Contraste	
		Controle	10	100	1000	10000			L	Q
Feno de Tifton-85	Produção de gases									
	mL g ⁻¹ MS	85.97 ^c	104.06 ^b	102.29 ^b	100.32 ^b	125.29 ^a	3.93	<.0001	0.0071	0.0498
	DVMO	348.52 ^c	353.01 ^{bc}	350.65 ^c	365.62 ^b	380.47 ^a	3.55	<.0001	0.6737	0.4380
	DFDN	259.28 ^c	264.38 ^{bc}	261.70 ^c	278.72 ^b	295.61 ^a	4.03	<.0001	0.6739	0.4378
	Produção CH ₄									
	mL g ⁻¹ DVMO	1.09 ^b	1.65 ^b	1.44 ^b	1.97 ^b	3.05 ^a	0.21	<.0001	0.2530	0.1569
mL g ⁻¹ DFDN	0.81 ^c	1.23 ^{bc}	1.08 ^{bc}	1.50 ^b	2.37 ^a	0.16	<.0001	0.2011	0.1166	
Capim Aruana	Produção de gases									
	mL g ⁻¹ MS	83.73 ^c	97.73 ^{bc}	104.16 ^b	100.56 ^b	124.01 ^a	3.46	<.0001	0.0003	0.3795
	DVMO	419.49 ^b	403.74 ^b	403.03 ^b	408.21 ^b	450.24 ^a	6.99	0.0001	0.2668	0.5931
	DFDN	303.98 ^b	285.09 ^b	284.23 ^b	290.45 ^b	340.84 ^a	8.38	0.0001	0.2668	0.5933
	Produção CH ₄									
	mL g ⁻¹ DVMO	1.08 ^b	1.25 ^b	1.37 ^b	1.66 ^b	2.91 ^a	0.16	<.0001	0.2135	0.8709
mL g ⁻¹ DFDN	0.78 ^b	1.00 ^b	0.96 ^b	1.16 ^b	2.20 ^a	0.12	<.0001	0.2694	0.3744	
Capim Buffel	Produção de gases									
	mL g ⁻¹ MS	83.35 ^c	102.82 ^b	99.09 ^b	107.42 ^b	126.31 ^a	3.69	<.0001	0.0058	0.0165
	DVMO	337.81 ^b	317.51 ^b	333.28 ^b	343.37 ^b	375.46 ^a	6.79	<.0001	0.5875	0.0158
	DFDN	236.85 ^b	213.45 ^b	231.63 ^b	243.26 ^b	280.24 ^a	7.82	<.0001	0.5876	0.0158
	Produção CH ₄									
	mL g ⁻¹ DVMO	1.11 ^c	1.61 ^{bc}	1.76 ^{bc}	2.21 ^b	3.11 ^a	0.22	<.0001	0.0368	0.4927
mL g ⁻¹ DFDN	0.78 ^c	1.08 ^{bc}	1.22 ^{bc}	1.63 ^b	2.32 ^a	0.16	<.0001	0.0587	0.6770	

MS = matéria seca; DVMO = degradabilidade verdadeira da matéria orgânica (g kg^{-1}); DFDN = degradabilidade da fibra em detergente neutro (g kg^{-1}); E.P.M. = erro padrão da média; L = linear; Q = quadrático.

Médias com letras sobrescritas diferentes na mesma linha diferem a 5% de significância pelo teste de Tukey.

3.3.2 Parâmetros de fermentação ruminal

A adição do EEF aumentou ($P < 0,001$) a concentração de AGCC nos substratos feno de Tifton-85 e capim Buffel. A produção de butirato (C4) aumentou com a adição do EEF diferindo ($P < 0,01$) do controle. No caso do acetado (C2) e propionato (C3), pequenas alterações foram observadas com a adição do EEF no substrato feno de Tifton-85. Contudo, a relação acetato:propionato (C2:C3) diminuiu ($P < 0,05$) com a adição do EEF em todos os substratos (Tabela 3.4). Além disso, a adição do EEF aumentou a produção de valerato ($0,85 - 0,96 \text{ mmol L}^{-1}$; $0,60 - 0,66 \text{ mmol L}^{-1}$, respectivamente para as doses do EEF e o controle – $P < 0,0001$). Contudo, nenhuma diferença ($P > 0,05$) foi observada nas concentrações de isobutirato e isovalerato. Foi verificado uma redução ($P < 0,01$) no pH nos substratos feno de Tifton-85 e capim Aruana com a adição da dose de $10000 \mu\text{L g}^{-1}$ substrato (Tabela 3.5).

Tabela 3.5 - Parâmetros fermentativos ruminais *in vitro* de forrageiras tropicais adicionadas com doses crescentes do extrato de enzimas fibrolíticas exógenas

Substratos	Item	Tratamentos ($\mu\text{L g}^{-1}$ substrato)					E.P.M.	Valor de P	Contraste	
		Controle	10	100	1000	10000			L	Q
Feno de Tifton-85	AGCC totais*	56.04 ^b	56.83 ^b	57.74 ^b	59.68 ^{ab}	63.24 ^a	0.94	0.0001	0.2122	0.9526
	C2	39.57 ^{ab}	36.67 ^b	37.92 ^b	38.48 ^{ab}	41.83 ^a	1.00	0.0076	0.2346	0.0881
	C3	8.78 ^b	9.47 ^{ab}	9.77 ^{ab}	10.06 ^a	10.07 ^a	0.26	0.0058	0.0105	0.5173
	C4	6.36 ^b	7.77 ^a	7.59 ^{ab}	8.18 ^a	8.32 ^a	0.31	0.0012	0.0092	0.0472
	C2:C3	4.53 ^a	3.87 ^b	4.00 ^b	3.96 ^b	4.01 ^b	0.10	<.0001	0.0103	0.3747
	pH	6.82 ^b	6.83 ^{ab}	6.87 ^a	6.87 ^a	6.72 ^c	0.01	<.0001	0.0353	0.4994
Capim Aruana	AGCC totais*	56.97	58.00	61.14	61.68	56.39	1.78	0.1447	0.1078	0.6314
	C2	40.75	38.33	38.65	40.29	37.10	1.06	0.1460	0.1760	0.3028
	C3	8.29	9.37	9.47	10.04	8.84	0.53	0.0860	0.0988	0.3784
	C4	5.39 ^b	7.40 ^a	7.74 ^a	8.09 ^a	7.39 ^a	0.33	<.0001	<.0001	0.0467
	C2:C3	4.95 ^a	4.10 ^b	4.16 ^b	4.05 ^b	4.25 ^b	0.16	0.0004	0.0001	0.5283
	pH	6.90 ^a	6.88 ^a	6.85 ^{ab}	6.87 ^{ab}	6.82 ^b	0.02	0.0046	0.0268	0.8477
Capim Buffel	AGCC totais*	56.23 ^b	57.81 ^b	62.80 ^{ab}	68.58 ^a	56.26 ^b	2.24	0.0009	0.0323	0.5286
	C2	39.53	36.93	37.93	42.28	36.86	1.48	0.0751	0.9630	0.1151
	C3	8.59	10.04	9.65	10.29	9.01	0.79	0.3837	0.1705	0.9280
	C4	5.68 ^b	7.45 ^a	7.70 ^a	9.01 ^a	7.51 ^a	0.38	<.0001	0.0004	0.1021
	C2:C3	4.63 ^a	4.14 ^{ab}	4.15 ^{ab}	3.88 ^b	4.16 ^{ab}	0.16	0.0251	0.0730	0.8249
	pH	6.81 ^b	6.85 ^b	6.95 ^a	6.82 ^b	6.83 ^b	0.015	<.0001	<.0001	0.2103

AGCC = ácidos graxos de cadeia curta (mmol L^{-1}); C2 = acetato (mmol L^{-1}); C3 = propionato (mmol L^{-1}); C4 = butirato (mmol L^{-1}); C2:C3 = relação acetato:propionato; E.P.M. = erro padrão da média; L = linear; Q = quadrático.

* Somatória dos AGCC C2, C3, C4, isobutirato, isovalerato e valerato (os dados dos três últimos não são demonstrados).

Médias com letras sobrescritas diferentes na mesma linha diferem a 5% de significância pelo teste de Tukey.

3.3.3 Coeficiente de correlação de Pearson

A correlação de Pearson (Tabela 3.6) demonstrou que a PG_{24} , DVMO, DFDN e produção de CH_4 proveniente da DVMO e DFDN aumentaram (correlação positiva - $P < 0,01$) com a adição do EEf. A DVMO, DFDN, produção de CH_4 proveniente da DVMO e DFDN e concentração de C4 apresentaram correlação positiva ($P < 0,05$) com a PG_{24} , demonstrando que aumentado a produção de gases ocorre um aumento nos demais parâmetros citados. O mesmo foi observado ($P < 0,05$) com a produção de CH_4 proveniente da DVMO e DFDN e os parâmetros DVMO e DFDN, na qual foi verificado que quanto maior a degradabilidade maior será a produção de CH_4 . Além disso, observou-se uma correlação negativa ($P < 0,05$) entre os parâmetros DVMO e DFDN com os parâmetros MO, FDN, FDA e LDA.

Tabela 3.6 – Coeficiente de correlação de Pearson dos parâmetros *in vitro* de produção de gases, degradabilidade e fermentação ruminal

Parâmetros	Dose	MO	PB	FDN	FDA	LDA	HEM	CEL	PG ₂₄	DVMO	DFDN	CH ₄ (DVMO)	CH ₄ (DFDN)	C2	C3	C4
PG₂₄	0.72**	0.05	-0.05	0.05	0.01	0.03	0.02	0.01	-	-	-	-	-	-	-	-
DVMO	0.40**	-0.81**	0.84**	-0.77**	-0.27*	-0.59**	-0.26*	-0.16	0.22*	-	-	-	-	-	-	-
DFDN	0.52**	-0.59**	0.67**	-0.53**	-0.42**	-0.63**	-0.002	-0.34**	0.30**	0.95**	-	-	-	-	-	-
CH₄ (DVMO)	0.78**	0.14	-0.15	0.13	0.07	0.13	0.02	0.06	0.85**	0.24*	0.35**	-	-	-	-	-
CH₄ (DFDN)	0.80**	0.13	-0.13	0.13	0.02	0.07	0.06	0.001	0.84**	0.27*	0.40**	0.99**	-	-	-	-
C2	-0.07	-0.001	-0.02	-0.01	0.08	0.07	-0.07	0.08	-0.08	-0.03	-0.05	-0.09	-0.11	-	-	-
C3	-0.12	0.08	-0.12	0.06	0.17	0.18	-0.09	0.16	0.13	-0.11	-0.12	0.03	0.01	-0.15	-	-
C4	0.18	0.13	-0.10	0.14	-0.08	-0.02	0.14	-0.10	0.51**	-0.06	-0.01	0.36**	0.36**	0.07	0.46**	-
C2:C3	0.04	-0.08	0.07	-0.08	0.004	-0.03	-0.05	0.02	-0.21	0.07	0.05	-0.09	-0.09	0.56**	-0.78**	-0.59**

MO = matéria orgânica; PB = proteína bruta; FDN = fibra em detergente neutro; FDA = fibra em detergente ácido; LDA = lignina em detergente ácido; HEM = hemicelulose; CEL = celulose; PG₂₄ = produção líquida de gases em 24 horas (mL g⁻¹ MS); DVMO = degradabilidade verdadeira da matéria orgânica; DFDN = degradabilidade da fibra em detergente neutro; CH₄ (DVMO) = produção líquida de metano (mL g⁻¹ DVMO); CH₄ (DFDN) = produção líquida de metano (mL g⁻¹ DFDN); C2 = acetato; C3 = propionato; C4 = butirato; C2:C3 = relação acetato:propionato.

* P < 0.05; ** P < 0.01

3.4 Discussão

Como demonstrado, as repostas de produção de gases e degradabilidade *in vitro* dos parâmetros analisados foram dependentes da dose e do substrato corroborando com os resultados observados na literatura (SOLTAN et al., 2013; LÓPEZ et al., 2016; VALLEJO et al., 2016; KHOLIF et al., 2017). Dessa forma, os resultados controversos encontrados na literatura podem ser decorrentes de falta ou mesmo excesso de doses das misturas enzimáticas aplicadas assim como da diferença dos componentes estruturais dos substratos utilizados (BEAUCHEMIN et al., 2003; ADESOGAN et al., 2014).

A PG₂₄ aumentou com a dose mais alta do EEF, demonstrando aumento na degradabilidade do substrato. Estudos demonstraram que as enzimas fibrolíticas podem modificar os constituintes da parede celular vegetal, removendo estruturas físicas que comprometeriam a aderência dos microrganismos ruminais, assim aumentando a utilização dos nutrientes e a fermentação ruminal (DÍAZ et al., 2015; ELGHANDOUR et al., 2016; SONG et al., 2018). O presente trabalho verificou que o aumento das doses do EEF melhorou a DVMO e DFDN das forrageiras testadas. Esse efeito pode ser atribuído ao aumento na hidrólise dos substratos pelas enzimas exógenas, assim como uma possível ação sinérgica entre as enzimas exógenas e as enzimas ruminais endógenas (BEAUCHEMIN et al., 2003; EUN; BEAUCHEMIN, 2008; ELGHANDOUR et al., 2016; LÓPEZ et al., 2016). A melhora na digestibilidade dos nutrientes é um dos mecanismos mais importantes para aumentar a produtividade dos ruminantes, contribuindo com a sustentabilidade do setor pecuário (RIBEIRO et al., 2015).

Apesar desse resultado, foi verificado que as demais doses do EEF utilizadas aumentaram a PG₂₄ dos capins Aruana e Buffel sem aumentar a degradabilidade dos nutrientes, sugerindo que o aumento na PG₂₄ pode ser devido a presença de carboidratos solúveis (monossacarídeos e/ou oligossacarídeos). Esses carboidratos solúveis podem estar presentes no EEF pelo fato desse extrato não ser puro (extrato bruto extraído após filtragem), proporcionando um aumento na fermentação microbiana e fornecendo mais energia para o crescimento microbiano (ELGHANDOUR et al., 2016). O aumento na fermentação microbiana promove um aumento nos produtos finais da fermentação, como os AGCC, hidrogênio (H₂) e CO₂. As moléculas de H₂ e CO₂ disponíveis no rúmen são utilizadas como substrato pelas arqueias metanogênicas para formação do CH₄ (ABDALLA et al., 2012) levando ao aumento na produção de CH₄, como observado neste estudo com a adição de EEF, principalmente nas doses de 10, 100 e 1000 µL g⁻¹ substrato, embora não diferindo do controle.

No caso da dose de 10000 $\mu\text{L g}^{-1}$ substrato, as diferenças encontradas com as demais doses na produção de CH_4 foram atribuídas ao aumento na DVMO e DFDN. O aumento na DVMO gera maior quantidade de H_2 liberado no ambiente ruminal e, assim, aumentando a produção de CH_4 pelas arqueias metanogênicas (ABDALLA et al., 2012). Contudo, é importante destacar que a porcentagem da DFDN foi maior que a DVMO, indicando a efetividade do EEF utilizado sobre a degradação da fração fibrosa, com isso, maior produção de CH_4 oriundo da dose de 10000 $\mu\text{L g}^{-1}$ substrato foi devido ao incremento na degradação da fibra (SOLTAN et al., 2013). Além disso, foi observado que os substratos com maiores quantidades de PB e menores quantidades de FDN tendem a produzir menos CH_4 , como verificado no capim Aruana. A produção de CH_4 é influenciada pela qualidade da forragem (SOLTAN et al., 2013; TANG et al., 2013; GUYADER et al., 2016; LIMA et al., 2018a), sugerindo que o capim Aruana é um substrato de melhor qualidade nutricional quando comparado aos demais substratos utilizados.

Estudos realizados por Soltan et al. (2013) e Dineshkumar et al. (2014) utilizando dois produtos enzimáticos comerciais contendo celulases e xilanases nas dosagens recomendadas pelo fabricante, demonstraram que apenas o produto celulolítico promoveu aumento na produção de gases e degradabilidade dos nutrientes. De acordo com Soltan et al. (2013), a dose de xilanase recomendada pelo fabricante pode não ter sido suficiente para melhorar a fermentação ruminal. Nesse sentido, os autores propuseram conduzir outros estudos utilizando doses mais altas de xilanase para determinar a dose ótima. O presente estudo verificou que o EEF utilizado, com dosagens mais altas, pode aumentar a degradabilidade dos substratos e a fermentação ruminal.

Alterações na produção de AGCC foram dependentes da dose enzimática e do substrato utilizado. Elghandour et al. (2016) observaram algumas mudanças nos perfis dos AGCC com a adição das enzimas fibrolíticas, sendo essa variação dependente do substrato. O aumento na produção de C3 sugere alterações nos padrões fermentativos, afetando a relação C2:C3. O aumento na concentração de C3 pode ser atribuído à fermentação dos carboidratos solúveis oriundos da degradação da parede celular (DÍAZ et al., 2015; ROMERO et al., 2015) e também dos carboidratos solúveis presentes no EFF. A redução na relação acetato:propionato pode ser um indicativo de melhor eficiência de utilização energética ruminal (ARRIOLA et al., 2011).

O aumento na concentração de C4 é um indicativo de aumento na degradação da fração fibrosa (ELGHANDOUR et al., 2016), e isso é observado com a adição de enzimas fibrolíticas (ROMERO et al., 2015). A produção de C4 é associada com a liberação de H_2 no

ambiente ruminal (SOLTAN et al., 2013), portanto, o aumento na produção de H₂ poderia ser uma das explicações para redução do pH ruminal observado com a dose mais alta do EEF, além da maior produção de CH₄. O aumento nas concentrações de butirato e valerato observado no presente estudo são importantes achados devido ao fato do aumento na concentração desses produtos sugerirem um aumento na eficiência fermentativa dos alimentos, e isso pode ser decorrente da mudança na população microbiana, metabolizando os substratos em produtos com maior valor energético (GUAN et al., 2008).

Em geral, a indústria canavieira gera uma grande quantidade de resíduos anualmente (SILVA ORTIZ; DE OLIVEIRA, 2014) que podem ser utilizados para o desenvolvimento de produtos sustentáveis, maximizando o uso dos recursos da agricultura (DEL RÍO et al., 2015) e aumentando a produtividade pecuária (KHOLIF et al., 2017), como uma forma sustentável de reduzir os impactos ambientais causados por ambos os setores. Nesse contexto, os dados obtidos nesse estudo geraram importantes informações sobre o uso do EEF produzido com o uso de resíduos agroindustriais, podendo promover uma melhora na degradabilidade dos nutrientes de forrageiras tropicais que são amplamente utilizadas na dieta de ruminantes.

3.5 Conclusão

Conclui-se que o extrato de enzimas fibrolíticas exógenas estudado não apresentou efeitos prejudiciais ao ambiente e a microbiota ruminal, podendo ser uma alternativa para incremento no aproveitamento dos nutrientes de dietas de baixa qualidade nutricional, com potencial para promover incrementos na produtividade animal.

Referências

- ABDALLA, A. L. et al. In vitro evaluation, in vivo quantification, and microbial diversity studies of nutritional strategies for reducing enteric methane production. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v. 44, n. 5, p. 953–964, 2012.
- ADESOGAN, A. T. et al. Improving cell wall digestion and animal performance with fibrolytic enzymes. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 92, n. 4, p. 1317–1330, 2014.
- ARAUJO, R. C. et al. Use of blanks to determine in vitro net gas and methane production when using rumen fermentation modifiers. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 166–167, p. 155–162, 2011.
- ARRIOLA, K. G. et al. Effect of fibrolytic enzyme application to low- and high-concentrate diets on the performance of lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 94, n. 2, p. 832–841, 2011.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 18. ed. Arlington: AOAC International, 2011.

BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 23, n. 3, p. 257–270, 1992.

BEAUCHEMIN, K. A. et al. Use of Exogenous Fibrolytic Enzymes to Improve Feed Utilization by Ruminants. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 81, n. 14, p. E37–E47, 2003. Suppl. 2.

BEAUCHEMIN, K. A.; RODE, L. M.; SEWALT, V. J. H. Fibrolytic enzymes increase fiber digestibility and growth rate of steers fed dry forages. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 75, n. 4, p. 641–644, 1995.

BLÜMMEL, M.; STEINGASS, H.; BECKER, K. The relationship between in vitro gas production, in vitro microbial biomass yield and N incorporation and its implications for the prediction of voluntary feed intake of roughages. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 77, n. 6, p. 911, 1997.

BUENO, I. C. S. et al. Influence of inoculum source in a gas production method. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 123–124, p. 95–105, 2005.

CARVALHO, A. F. A. et al. Screening of Xylanolytic *Aspergillus fumigatus* for Prebiotic Xylooligosaccharide Production Using Bagasse. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v. 53, n. 4, p. 428–435, 2015.

COLOMBATTO, D.; BEAUCHEMIN, K. A. A proposed methodology to standardize the determination of enzymic activities present in enzyme additives used in ruminant diets. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 83, n. 3, p. 559–568, 2003.

DE OLIVEIRA SILVA, R. et al. Increasing beef production could lower greenhouse gas emissions in Brazil if decoupled from deforestation. **Nature Climate Change**, London, v. 6, n. 5, p. 493–497, 2016.

DEL RÍO, J. C. et al. Differences in the chemical structure of the lignins from sugarcane bagasse and straw. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 81, p. 322–338, 2015.

DÍAZ, A. et al. Treatment of tropical forages with exogenous fibrolytic enzymes: effects on chemical composition and in vitro rumen fermentation. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 99, n. 2, p. 345–55, 2015.

DINESHKUMAR, D. et al. Effect of temperature and pre-incubation time of fibrolytic enzymes on in vitro degradability of *Brachiaria* (*Brachiaria decumbens*). **Animal Production Science**, Victoria, v. 54, n. 10, p. 1779, 2014.

ELGHANDOUR, M. M. Y. et al. Influence of the addition of exogenous xylanase with or without pre-incubation on the in vitro ruminal fermentation of three fibrous feeds. **Czech Journal of Animal Science**, Prague, v. 61, n. 6, p. 262–272, 2016.

EUN, J.-S.; BEAUCHEMIN, K. A. Relationship between enzymic activities and in vitro degradation of alfalfa hay and corn silage. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 145, n. 1, p. 53–67, 2008.

GONÇALVES, C. et al. Adaptation of dinitrosalicylic acid method to microtiter plates. **Analytical Methods**, Cambridge, v. 2, n. 12, p. 2046, 2010.

GUAN, L. L. et al. Linkage of microbial ecology to phenotype: correlation of rumen microbial ecology to cattle's feed efficiency. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 288, n. 1, p. 85–91, 2008.

GUYADER, J. et al. Forage use to improve environmental sustainability of ruminant production. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 94, n. 8, p. 3147, 2016.

HE, Z. X. et al. Effect of wheat dried distillers grains with solubles and fibrolytic enzymes on ruminal fermentation, digestibility, growth performance, and feeding behavior of beef cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 93, n. 3, p. 1218, 2015.

HERNANDEZ, A. et al. The effect of garlic oil, xylanase enzyme and yeast on biomethane and carbon dioxide production from 60-d old Holstein dairy calves fed a high concentrate diet. **Journal of Cleaner Production**, Oxford, v. 142, p. 2384–2392, 2017.

HRISTOV, A. N. et al. Special topics--Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: I. A review of enteric methane mitigation options. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 91, n. 11, p. 5045–69, 2013.

HRISTOV, A. N. et al. An inhibitor persistently decreased enteric methane emission from dairy cows with no negative effect on milk production. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, DC, v. 112, n. 34, p. 10663–10668, 2015.

KHOLIF, A. E. et al. Anaerobic ensiling of raw agricultural waste with a fibrolytic enzyme cocktail as a cleaner and sustainable biological product. **Journal of Cleaner Production**, Oxford, v. 142, p. 2649–2655, 2017.

LIMA, D. M. et al. Morphological characteristics, nutritive quality, and methane production of tropical grasses in Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 53, n. 3, p. 323–331, 2018a.

LIMA, P. M. T. et al. Nutritional evaluation of the legume *Macrotyloma axillare* using in vitro and in vivo bioassays in sheep. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 102, n. 2, p. e669–e676, 2018b.

LONGO, C. et al. The influence of head-space and inoculum dilution on in vitro ruminal methane measurements. **International Congress Series**, Amsterdam, v. 1293, p. 62–65, 2006.

LÓPEZ, D. et al. In vitro gas production of foliage from three browse tree species treated with different dose levels of exogenous fibrolytic enzymes. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 100, n. 5, p. 920–928, 2016.

MAURICIO, R. M. et al. A semi-automated in vitro gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 79, n. 4, p. 321–330, 1999.

MEALE, S. J. et al. Opportunities and challenges in using exogenous enzymes to improve ruminant production. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 92, n. 2, p. 427–442, 2014.

MERTENS, D. R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: collaborative study. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 85, n. 6, p. 1217–1240, 2002.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

PALMQUIST, D. L.; CONRAD, H. R. Origin of plasma fatty acids in lactating cows fed high grain or high fat diets. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 54, n. 7, p. 1025–1033, 1971.

PRESTON, T. R. Biological and chemical analytical methods. In: PRESTON, T. R. (Ed.). **Tropical animal feeding: a manual for research workers**. Ho Chi Minh: FAO, 1995. p. 181–239.

RIBEIRO, G. O. et al. Effect of fibrolytic enzymes added to a *Andropogon gayanus* grass silage-concentrate diet on rumen fermentation in batch cultures and the artificial rumen (Rusitec). **Animal**, Cambridge, v. 9, n. 7, p. 1153–1162, 2015.

ROMERO, J. J. et al. Screening exogenous fibrolytic enzyme preparations for improved in vitro digestibility of bermudagrass haylage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 98, n. 4, p. 2555–2567, 2015.

RUVIARO, C. F. et al. Carbon footprint in different beef production systems on a southern Brazilian farm: a case study. **Journal of Cleaner Production**, Oxford, v. 96, p. 435–443, 2015.

SILVA ORTIZ, P.; DE OLIVEIRA, S. Exergy analysis of pretreatment processes of bioethanol production based on sugarcane bagasse. **Energy**, Oxford, v. 76, p. 130–138, 2014.

SNIFFEN, C. J. et al. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 70, n. 11, p. 3562–3577, 1992.

SOLTAN, Y. A. et al. Response of different tropical pasture grass species to treatments with fibrolytic enzymes in terms of in vitro ruminal nutrient degradation and methanogenesis. **Animal Nutrition and Feed Technology**, Izzatnagar, v. 13, n. 3, p. 551–568, 2013.

SONG, S. D. et al. Effects of exogenous fibrolytic enzyme supplementation to diets with different NFC/NDF ratios on the growth performance, nutrient digestibility and ruminal fermentation in Chinese domesticated black goats. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 236, p. 170–177, 2018.

SUMNER, J. B. Dinitrosalicylic acid: a reagent for the estimation of sugar in normal and diabetic urine. **The Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 47, p. 5–9, 1921.

TANG, S. X. et al. Effects of exogenous cellulase source on in vitro fermentation characteristics and methane production of crop straws and grasses. **Animal Nutrition and Feed Technology**, Izzatnagar, v. 13, n. 3, p. 489–505, 2013.

THEODOROU, M. K. et al. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 48, n. 3–4, p. 185–197, 1994.

VALLEJO, L. et al. A. Influence of cellulase or xylanase on the in vitro rumen gas production and fermentation of corn stover. **Indian Journal of Animal Sciences**, New Delhi, v. 86, n. 1, p. 70-74, 2016.

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**, Champaign, v. 74, n. 10, p. 3583–3597, 1991.

VASCONCELOS, N. M.; PINTO, G. A. S.; ARAGÃO, F. A. de S. **Determinação de açúcares redutores pelo ácido 3, 5-dinitrosalicílico**: histórico do desenvolvimento do método e estabelecimento de um protocolo para o Laboratório de Bioprocessos. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2013. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 88).

WOOD, T. M.; BHAT, K. M. Methods for measuring cellulase activities. In: WOOD, W. A.; KELLOGG, S. T. (Ed.). **Methods in enzymology**. London: Elsevier, 1988. v. 160, p. 87–112.

YUANGKLANG, C. et al. Growth performance and macronutrient digestion in goats fed a rice straw based ration supplemented with fibrolytic enzymes. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 154, p. 20–22, 2017.

4. DIGESTIBILIDADE DOS NUTRIENTES E FERMENTAÇÃO RUMINAL DE OVINOS SUPLEMENTADOS COM ENZIMAS FIBROLÍTICAS EXÓGENAS

Resumo

FORAGEIRAS tropicais usualmente apresentam baixa qualidade nutricional, principalmente em épocas secas, reduzindo a digestibilidade dos nutrientes pelos animais ruminantes decorrente da alta quantidade de carboidratos fibrosos. O uso de enzimas fibrolíticas exógenas demonstrou ser uma alternativa segura para melhorar a digestibilidade de forragens de baixa qualidade. O desenvolvimento de misturas enzimáticas novas utilizando matérias primas sustentáveis para uso na dieta de ruminantes pode ser uma alternativa economicamente viável para incremento na qualidade nutricional de substratos fibrosos. O objetivo do estudo foi avaliar o uso de um extrato de enzimas fibrolíticas (EEF) exógenas sobre a hidrólise da fibra, a digestibilidade e a fermentação ruminal de ovinos alimentados com forrageira tropical que apresentava baixa qualidade nutricional. O estudo foi dividido em duas fases: Fase I: ensaio de hidrólise da fibra com adição de três doses (20, 40 e 80 $\mu\text{L g}^{-1}$ de substrato + um controle) e cinco tempos de pré-incubação (0, 12, 24, 36 e 48 h) para determinar a dose e o tempo de pré-incubação para maior redução da fração fibrosa, viável para ser usado no teste de animais. A dose de 40 $\mu\text{L g}^{-1}$ de substrato apresentou melhor resposta sobre a hidrólise da fibra em detergente neutro, fibra em detergente ácido (FDA) e celulose. Observou-se que quanto maior o tempo de incubação, maior a redução na fração fibrosa do substrato feno de Tifton-85. Fase II: ensaio *in vivo* utilizando 19 ovinos em crescimento, divididos em dois grupos experimentais, grupo controle (CTL) e grupo enzima (ENZ). Os animais receberam uma dieta contendo 70% de feno de Tifton-85 como volumoso e 30% de mistura concentrada contendo milho quebrado e farelo de soja fornecida em duas refeições diárias. O EEF foi aplicado manualmente sobre o feno ofertado 24 horas antes do arraçamento, na dosagem de 40 $\mu\text{L g}^{-1}$ de substrato. O consumo dos nutrientes não foi influenciado pela adição do EEF. Os animais suplementados com o EEF apresentaram maior ($P < 0,05$) digestibilidade da FDA, além de tendência de maior consumo de água. O balanço de nitrogênio e a síntese de proteína microbiana não foram afetados pela adição do EEF. A produção total de ácidos graxos de cadeia curta, acetado, propionato e butirato não foram influenciados pela adição do EEF, contudo ocorreu maior ($P < 0,05$) produção de valerato. Os parâmetros pH, nitrogênio amoniacal e população de protozoários não apresentaram diferenças entre os animais experimentais. Conclui-se que o uso do EEF pode ser uma estratégia para incrementar a digestibilidade da FDA de forrageiras de baixa qualidade nutricional e possivelmente a produtividade da cadeia de produção de ruminantes.

Palavras-chave: Xilanase. Celulase. Hidrólise pré ingestiva. Digestibilidade aparente. Parâmetros fermentativos.

4. Nutrient digestibility and ruminal fermentation in lambs supplemented with exogenous fibrolytic enzymes

Abstract

Tropical forages usually present low nutritional quality especially in dry seasons, affecting the digestibility of nutrients by ruminant animals due to the high amount of fibrous carbohydrates. The use of exogenous fibrolytic enzymes has been shown to be a safe alternative to improve the digestibility of low-quality fodder. The development of new enzymatic mixtures using sustainable raw materials for use in the ruminant diet may be an economically viable alternative for increasing the nutritional quality of fibrous substrates. The objective of this study was to evaluate the use of an exogenous fibrolytic enzymes extract (FEE) on the fiber hydrolysis, digestibility and ruminal fermentation of lambs fed with tropical forage presented low nutritional quality. The study was divided into two phases: Phase I: fiber hydrolysis assay with addition of three doses (20, 40 and 80 $\mu\text{L g}^{-1}$ substrate + one control) and five pre-incubation time (0, 12, 24, 36 and 48 h) to determine which dose had the best response on fiber hydrolysis and which pre-incubation time presented greater reduction in the fibrous fraction feasible to be used in animal tests. The dose of 40 $\mu\text{L g}^{-1}$ of substrate showed a better response on neutral detergent fiber, acid detergent fiber (ADF) and cellulose hydrolysis. It was observed that longer incubation time presented greater reduction in the fibrous fraction of the Tifton-85 hay. Phase II: in vivo assay using 19 growing lambs were divided into two experimental groups, control group (CTL) and enzyme group (ENZ). The animals received a diet containing 70% Tifton-85 hay as bulking and 30% concentrate containing broken corn and soybean meal offered twice a day. The FEE was applied manually on the offered hay 24 hours before the feeding with the dosage of 40 $\mu\text{L g}^{-1}$ of substrate. There was no fiber reduction after 24 hours of FEE supply. Nutrient intake was not influenced by the addition of FEE. The animals supplemented with the FEE showed a higher ($P < 0.05$) ADF digestibility, also a trend of higher water consumption. Nitrogen balance and microbial protein synthesis were not affected by the addition of FEE. The total short-chain fatty acids, acetate, propionate, and butyrate were not influenced by FEE addition, however there was a higher ($P < 0,05$) valerate production. The parameters pH, ammonia nitrogen and protozoa population did not present differences between the experimental animals. It is concluded that the use of FEE may be a strategy to increase the digestibility of low nutritional forage fodder and possibly the productivity of the ruminant production system.

Keywords: Xylanase. Cellulase. Pre-ingestive hydrolysis. Apparent digestibility. Fermentation parameters.

4.1 Introdução

A criação de ruminantes com a utilização de forrageiras na forma de pastagens, fenos e silagens é técnica bem difundida na pecuária mundial (WILKINSON; LEE, 2018). Entretanto, um dos grandes problemas associados a utilização de forragens na dieta de ruminantes é o baixo aproveitamento dos nutrientes decorrente da grande quantidade de carboidratos fibrosos presentes na parede celular vegetal (ADESOGAN et al., 2014; MEALE et al., 2014), principalmente em forrageiras tropicais que geralmente apresentam baixo valor nutritivo (DÍAZ et al., 2015). Normalmente, o baixo aproveitamento dos nutrientes de dietas fibrosas pode ser devido a quantidades insuficientes de enzimas endógenas produzidas pelos microrganismos ruminais, não sendo capazes de degradar as ligações dos carboidratos fibrosos presentes na parede celular (SONG et al., 2018).

Decorrente da maioria dos sistemas de produção de ruminantes utilizarem forragens como a principal fonte de nutrientes, pequenos incrementos na digestibilidade de substratos altamente fibrosos e que apresentam baixa digestibilidade podem resultar em melhorias no desempenho produtivo dos animais (GIRALDO et al., 2007).

Nesse contexto, uma das estratégias estudadas nas últimas décadas é a utilização de enzimas fibrolíticas exógenas na dieta de ruminantes com objetivo de melhorar o aproveitamento dos constituintes da parede celular vegetal e aumentar a fermentação pelos microrganismos ruminais (TIRADO-GONZÁLEZ et al., 2018). Estudos sugeriram que a aplicação de enzimas fibrolíticas exógenas podem degradar alguns componentes estruturais da parede celular (ELGHANDOUR et al., 2016; SONG et al., 2018) ou facilitar a colonização do substrato pelos microrganismos ruminais, possibilitando maior utilização dos nutrientes pelos microrganismos e crescimento mais rápido de suas populações (ELGHANDOUR et al., 2016).

Pesquisas demonstraram que a adição de enzimas fibrolíticas exógenas proporcionou aumento na digestibilidade aparente dos nutrientes e produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) na dieta de ovinos (GADO et al., 2011; VALDES et al., 2015; VALLEJO et al., 2016), caprinos (YUANGKLANG et al., 2017; SONG et al., 2018) e bovinos (ARRIOLA et al., 2011; SALEM et al., 2013). Outros estudos não observaram efeitos da adição de enzimas sobre a digestibilidade dos nutrientes (HE et al., 2015; WANG; XUE, 2016) e produção de AGCC (CHUNG et al., 2012; HE et al., 2015). Os resultados contraditórios encontrados na literatura normalmente são atribuídos a erros nos métodos de aplicação ou na formulação da mistura enzimática (BEAUCHEMIN et al., 2003).

A utilização de novos produtos enzimáticos na dieta de ruminantes alimentados com dietas de baixa qualidade se faz necessário para testar a eficácia de utilização desses produtos sobre a digestibilidade dos nutrientes. Além disso, a utilização de fenos, silagens, diferimento de pastagens e capineiras é rotineira em regiões tropicais, decorrente da alta sazonalidade das forrageiras, que normalmente apresentam baixa disponibilidade e baixa qualidade nutricional. Dessa forma, o uso de estratégias seguras para serem utilizadas como aditivos é requerido para evitar perdas produtivas e econômicas. O uso de um produto enzimático economicamente viável pode ser uma alternativa para incremento na digestibilidade das forragens utilizadas nas épocas secas do ano podendo promover maiores ganhos para os produtores rurais.

A hipótese do estudo é que a utilização de um extrato enzimático, produzido pelo fungo *Trichoderma reesei*, possa conter as enzimas necessárias para completa degradação dos componentes fibrosos da parede celular, uma vez que esse fungo consegue se desenvolver em substrato contendo grandes quantidades de carboidratos fibrosos, como o caso da palha de cana-de-açúcar, podendo ser uma alternativa viável para melhorar a qualidade nutricional de forrageiras de baixa qualidade. O objetivo foi avaliar o efeito de um extrato bruto de enzimas fibrolíticas sobre a digestibilidade aparente dos nutrientes, parâmetros fermentativos ruminais e síntese de proteína microbiana de ovinos alimentados com forrageira que apresentava baixa qualidade nutricional.

4.2 Materiais e Métodos

4.2.1 Local e declaração de ética

O experimento foi conduzido nas instalações do Laboratório de Nutrição Animal (LANA), Centro de Energia Nuclear na Agricultura – Universidade de São Paulo, situado no município de Piracicaba – SP, Brasil, entre os meses de novembro e dezembro de 2017. Os procedimentos utilizados foram aprovados e seguiram as recomendações do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/CENA – Protocolo 014/2016).

4.2.2 Extrato de enzimas fibrolíticas e atividade enzimática

O extrato de enzimas fibrolíticas (EEF) utilizado no estudo *in vivo* foi o mesmo utilizado no estudo do Capítulo 3, diferindo apenas na data de produção. O EEF foi transportado do Instituto de Pesquisas em Bioenergia (IBPEN) – UNESP – Assis, para o LANA em caixas de isopor com gelo e armazenadas em câmara fria a 4°C. Durante o período

experimental, o EEF era amostrado três vezes na semana para formação de uma amostra composta e posterior determinação da atividade enzimática.

O EEF foi submetido à atividade celulolítica através da determinação da atividade da enzima endoglucanase (EC 3.2.1.4) e exoglucanase (EC 3.2.1.91) e atividade hemicelulolítica através da determinação da atividade da enzima xilanase (EC 3.2.1.8) de acordo com as metodologias de Wood e Bhat (1988) e Bailey, Biely e Poutanen (1992), respectivamente para atividade celulolítica e xilanolítica, seguindo modificações propostas por Colombatto e Beauchemin (2003). As atividades encontradas no EEF estão apresentadas na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Atividade enzimática do extrato bruto de enzimas fibrolíticas produzido pelo fungo *Trichoderma reesei* utilizando palha de cana-de-açúcar como substrato

Atividade enzimática* (UI mL ⁻¹ do EEF)	Endoglucanase**	Exoglucanase**	Xilanase***
	4,6	0,02	94,3

EEF = extrato de enzimas fibrolíticas; UI = unidades internacionais ($\mu\text{mol min}^{-1}$).

* Atividade enzimática determinada a 39°C e pH 6,6. ** $\mu\text{mol de glicose min}^{-1} \text{ mL}^{-1}$ liberado da carboximetilcelulose sódica e sigmacell microcristalina, respectivamente para endoglucanase e exoglucanase.

*** $\mu\text{mol de xilose min}^{-1} \text{ mL}^{-1}$ liberado do xilano obtido de madeira de Faia.

4.2.3 Ensaio de hidrólise da fibra

Os resultados do ensaio *in vitro* apresentados no capítulo 3 da tese demonstraram que a dose com melhor resposta sobre a degradabilidade da matéria orgânica (MO) e fibra em detergente neutro (FDN) seria inviável para ser utilizado em ensaio com animais devido à grande quantidade necessária para ser aplicada sobre o substrato. Decorrente a isso, foi realizado um ensaio de pré-incubação para mensurar o efeito de doses crescentes do EEF sobre a fração fibrosa do substrato feno de Tifton-85 (*Cynodon spp.*) seguindo metodologia de Nsereko et al. (2000), Giraldo et al. (2007), e Díaz et al. (2015), com modificações.

Foi utilizado um delineamento ao acaso em esquema fatorial 5 x 3 + 1, com cinco tempos de incubação (0, 12, 24, 36 e 48 h) e três doses do EEF (20 μL , 40 μL e 80 $\mu\text{L g}^{-1}$ material incubado) mais o controle (sem adição do EEF). Antes de cada incubação, o EEF foi diluído em água destilada para atingir as doses requeridas e 1 mL foi adicionado dentro de saquinhos de determinação de fibra Ankom F57 (Ankom Technology Corp., USA) contendo 1 g do substrato, homogeneizados, vedados e colocados dentro de garrafas de vidro de 200 mL contendo 50 mL de solução tampão (solução de Menke). As garrafas foram vedadas com papel parafilm e incubadas em estufa de circulação forçada de ar (MA-035 – Marconi, Piracicaba – SP, Brasil) a 39°C. Foram preparadas 40 garrafas contendo dois

saquinhos (repetições) por dose e por tempo de incubação (dois saquinhos x três doses x cinco tempos + 10 controles).

Foram testados diferentes tempos de incubação para verificar o efeito do tempo sobre a redução na fração fibrosa do substrato e a partir daí, escolher qual melhor tempo de aplicação do EEF antes do fornecimento da refeição para os animais. A incubação iniciou-se colocando os saquinhos que permaneceram 48 horas na estufa. A cada 12 horas, os saquinhos de 36, 24, 12 e 0 h foram incubados para permitir a retirada de todas as amostras ao mesmo tempo. Os saquinhos de 0 h foram apenas adicionados com o EEF, homogeneizados, vedados e mergulhados na solução tampão. Ao final do período de incubação, os saquinhos foram imediatamente submetidos à análise sequencial de fibra para determinação da FDN, fibra em detergente ácido (FDA) e lignina seguindo metodologia de Van Soest, Robertson e Lewis (1991) com adaptações de Mertens (2002).

4.2.4 Animais, tratamentos e manejo

Foram utilizados 19 ovinos da raça Santa Inês, provenientes do plantel do Biotério do Laboratório de Nutrição Animal – CENA/USP, com idade média de $81 \pm 7,8$ dias e peso corporal médio de $15 \pm 1,9$ kg. O grupo de animais utilizados consistia de dez machos castrados e nove fêmeas não castradas. O delineamento experimental utilizado foi em blocos ao acaso com dois tratamentos, grupo controle (CTL) e grupo enzima (ENZ) e nove repetições para o grupo CTL (n=9) e dez repetições para o grupo ENZ (n=10), considerando como bloco o sexo dos animais (dez machos e nove fêmeas). O período experimental foi de 73 dias sendo 15 dias de adaptação dos animais a dieta, 45 dias de ensaio de desempenho animal (Capítulo 5), sete dias de ensaio de metabolismo animal e seis dias para quantificação de CH₄ entérico (Capítulo 5). O experimento foi conduzido de forma sequencial, como demonstrado acima, contudo, nesse capítulo será abordado os sete dias de ensaio de metabolismo animal.

A dieta dos animais consistiu de feno de Tifton-85 (*Cynodon* spp.) picado (Triturador Charger 15.0 – Menxon Máquinas Agrícolas, Cajuru – SP, Brasil) em partículas de 3 cm e concentrado composto por farelo de soja e milho quebrado (Triturador Nogueira DPM2 – Nogueira S/A Máquinas Agrícolas, São João da Boa Vista – SP, Brasil), com relação volumoso:concentrado de 70:30, formuladas seguindo as recomendações do NRC (2007). O milho quebrado e o farelo de soja foram misturados com auxílio de um misturador com capacidade de 500 kg (M.A.P. Equipamentos Agropecuários e Industriais Ltda., Londrina – PR, Brasil) por 15 minutos para formação do concentrado, armazenados em bombonas

plásticas de 100 L em local seco e sem exposição solar. A composição bromatológica dos ingredientes utilizados na dieta é apresentada na Tabela 4.2. A água e a mistura mineral foram fornecidas *ad libitum* durante o período experimental.

Tabela 4.2 - Composição bromatológica (g kg^{-1} MS) dos ingredientes que compuseram a dieta experimental utilizada no ensaio de metabolismo animal

Parâmetros	Feno Tifton-85	Concentrado*
MS	852	896
MO	943	945
EE	14	29
PB	53	414
MM	55	55
FDN	819	362
FDA	513	207
Lignina	103	51
Hemicelulose**	305	156
Celulose**	413	176
EB (kcal g^{-1} MS)	4,28	4,66

MS = matéria seca (g kg^{-1} matéria fresca); MO = matéria orgânica; EE = extrato etéreo; PB = proteína bruta; MM = matéria mineral; FDN = fibra em detergente neutro; FDA = fibra em detergente ácido; EB = energia bruta.

* Concentrado composto por 70% de farelo de soja e 30% de milho quebrado.

** Hemicelulose calculada pela diferença entre FDN e FDA; Celulose calculada pela diferença entre FDA e LDA (SNIFFEN et al., 1992).

O EEF foi aplicado diretamente sobre o feno 24 horas antes do fornecimento da refeição com dosagem de $0,04 \text{ mL g}^{-1}$ de matéria fresca (MF), diluído em água destilada para completar o volume aplicado de $0,15 \text{ mL g}^{-1}$ MF. O mesmo procedimento foi realizado com a dieta dos animais controle, onde foi aplicado $0,15 \text{ mL g}^{-1}$ MF de feno. A aplicação do EEF e da água destilada ocorreu de forma manual, com auxílio de seringas de 5 mL, 10 mL e 20 mL para obtenção dos volumes desejados de EEF e água destilada, colocados dentro de pulverizadores de bico spray e borrifados sobre o feno pesado dentro de sacos plásticos (40 x 60 x 0,10 cm) (Figura 4.1) com identificação individual de cada animal e misturados manualmente até completa homogeneização. O volume final de $0,15 \text{ mL g}^{-1}$ MF foi utilizado para que fosse possível pulverizar o EEF sobre todo o feno presente dentro do saco, além de aumentar a umidade para maior ação das enzimas devido a necessidade de umidade para as enzimas agirem.

Os ingredientes utilizados para formulação da dieta controle e dieta enzima e suas respectivas composições bromatológicas 24 horas após a adição de água destilada e EEF são apresentados na Tabela 4.3.

Figura 4.1 – Pulverizadores utilizados para aplicação da água destilada e extrato de enzimas fibrolíticas e modo de aplicação dos mesmos sobre o feno de Tifton-85



Tabela 4.3 - Descrição dos ingredientes e composição bromatológica das dietas experimentais 24 horas após a adição da água destilada e do extrato de enzimas fibrolíticas

Ingredientes	Dietas Experimentais	
	Grupo Controle	Grupo Enzima
Feno Tifton-85 (%)	70	70
Milho quebrado (%)	10	10
Farelo de soja (%)	20	20
EEF (mL g ⁻¹ MF)	-	0,04
H ₂ O (mL g ⁻¹ MF)	0,15	0,11
Total (%)	100	100
	Composição bromatológica (g kg⁻¹ MS)	
MS	927	929
MO	946	941
EE	15	16
PB	146	146
MM	54	58
FDN	665	659
FDA	439	435
Lignina	95	93
Hemicelulose*	237	243
Celulose*	344	341
EB (kcal g ⁻¹ MS)	4,35	4,33

EEF = extrato de enzimas fibrolíticas; MF = matéria fresca; H₂O = água destilada; MS = matéria seca a 105°C; MO = matéria orgânica; EE = extrato etéreo; PB = proteína bruta; MM = matéria mineral; FDN = fibra em detergente neutro; FDA = fibra em detergente ácido; EB = energia bruta.

* Hemicelulose calculada pela diferença entre FDN e FDA; Celulose calculada pela diferença entre FDA e lignina (SNIFFEN et al., 1992).

4.2.5 Ensaio de metabolismo animal (digestibilidade aparente dos nutrientes)

Os animais foram alojados em gaiolas metabólicas providas de comedouro, bebedouro e cocho de sal mineral, providas de bandejas coletoras de fezes e urina. Os animais (idade média de $126 \pm 7,8$ dias e peso médio de $18,67 \pm 2,47$ kg) foram mantidos por um período de sete dias, sendo dois dias para adaptação dos animais as gaiolas e cinco dias de colheita de amostras. No decorrer do ensaio de metabolismo animal a temperatura média observada foi de $25,5 \pm 3,4^\circ\text{C}$ (temperatura máxima média $28,3 \pm 3,4^\circ\text{C}$; temperatura mínima média $22,7 \pm 1,1^\circ\text{C}$).

A dieta foi fornecida à vontade em duas refeições diárias oferecidas as 8:30 horas e as 16:30 horas, em proporções iguais (50% manhã e 50% tarde). O consumo foi ajustado para garantir sobras de 10%. No decorrer dos cinco dias de colheita, foram amostrados diariamente alíquotas do concentrado fornecido e foi preparado amostras de 25 gramas de feno oferecido para o grupo controle (com adição de 3,75 mL de água destilada) e 25 gramas de feno oferecido para o grupo enzima (com adição de 1,0 mL de EEF + 2,75 mL de água destilada). Todas as amostras foram armazenadas em freezer a -20°C para posterior avaliação bromatológica das dietas experimentais.

As amostras de sobras de feno e das fezes de cada animal foram colhidas diariamente (formação de um *pool* de sobras de feno e um *pool* de fezes de cada animal) antes do fornecimento da primeira refeição diária, pesadas em balança eletrônica (precisão 5 gramas), amostrados 10% e armazenadas em freezer a -20°C para posterior avaliação bromatológica.

A digestibilidade aparente de cada nutriente foi calculado de acordo com a equação:

$$\text{DA de X} = (\text{X}_{\text{consumido}} - \text{X}_{\text{excretado}}) / \text{X}_{\text{consumido}} * 100 \quad (4)$$

DA = digestibilidade aparente (%); X = nutriente avaliado.

Ao final do período experimental, as amostras de ofertado, sobras e fezes foram descongeladas (até temperatura ambiente), pesadas e secas em estufa de circulação forçada de ar (MA 037 – Marconi, Piracicaba – SP, Brasil) a 55°C até peso constante. As amostras foram moídas a 1 mm para obtenção de amostras analíticas. Utilizou-se a metodologia da AOAC (2011) para determinar a quantidade de matéria seca (MS), MO, matéria mineral, proteína bruta (PB) e extrato etéreo (EE) e a metodologia de Van Soest, Robertson e Lewis (1991) adaptado por Mertens (2002) para quantificação da FDN, FDA e lignina.

A MS foi calculada após secagem em estufa (Odontobrás 1.6, Brasil) a 105°C por 24 horas; a MM após queima em forno mufla (JUNG - Blumenau – SC, Brasil) a 550°C por 5,5 horas; PB foi determinada pelo método micro-Kjeldahl com destilação a vapor (TE-036/1, Tecnal, Piracicaba – SP, Brasil) utilizando 15 mL de hidróxido de sódio (NaOH 12N) sendo nitrogênio volatilizado coletado pela solução de ácido bórico 2% (H₃BO₃) e quantificado por titulação com solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄ 0,05N) após multiplicação pelo fator de conversão 6,25. O EE foi determinado após extração com éter de petróleo sob aquecimento com auxílio de um extrator de gordura Soxhlet (TE-044-8/50 – Tecnal, Piracicaba – SP, Brasil).

A FDN foi determinada após lavagem das amostras em saquinhos de determinação de fibra Ankom F57 (Ankom Technology Corp., USA) a 90°C por uma hora com solução detergente neutro (SDN) (VAN SOEST; ROBERTSON; LEWIS, 1991) e adição de α -amilase e sulfito de sódio em aparelho determinador de fibra (TE-149 - Tecnal, Piracicaba – SP, Brasil) seguido de duas lavagens com água destilada mais α -amilase a 90°C por cinco minutos e posterior lavagem com acetona por cinco minutos. Os saquinhos foram colocados em estufa a 105°C (Odontobrás 1.6, Brasil) por quatro horas, retirados e colocados em dessecador para esfriarem (temperatura ambiente), pesados em balança analítica (AUY220 - Shimadzu, Tokyo, Japão) e colocados em cadinhos de porcelana e incinerados em forno mufla (JUNG, Blumenau – SC, Brasil) a 530°C por 3,5 horas. A FDN foi calculada após correção para cinzas.

A FDA foi determinada após lavagem das amostras em saquinhos de determinação de fibra com solução detergente ácido (SDA) a 90°C por uma hora seguido de quatro lavagens com água destilada a 90°C por cinco minutos e posterior lavagem com acetona por cinco minutos e colocados em estufa a 105°C por quatro horas. Após esse tempo, os saquinhos foram colocados em dessecador até voltarem à temperatura ambiente e pesados. A lignina foi determinada utilizando os mesmos saquinhos de FDA, sendo que, após a pesagem, os saquinhos foram colocados em solução de ácido sulfúrico 72% por três horas seguido de quatro lavagens com água destilada a 90°C por cinco minutos, finalizando com lavagem com acetona por mais cinco minutos. Os saquinhos foram colocados em estufa a 105°C por quatro horas, pesados e colocados em cadinhos de porcelana e incinerados em forno mufla a 530°C por 3,5 horas. A FDA e a lignina foram calculadas após correção para cinzas.

A energia bruta dos ingredientes da dieta e das dietas experimentais foi determinada após a combustão das amostras em bomba calorimétrica (6200 - Parr Instrument Company, Moline – IL, USA).

4.2.6 Colheita de urina

A colheita de urina foi realizada diariamente, antes do fornecimento da primeira refeição diária, em baldes plásticos contendo 100 mL de ácido sulfúrico a 10% (H₂SO₄ 10%) para acidificar a urina e evitar a volatilização da amônia, o volume total excretado foi mensurado e uma alíquota de 10% foi amostrado para formação de um *pool* de urina por animal e armazenados em freezer a -20°C para posterior análise de nitrogênio amoniacal (N-NH₃), nitrogênio total e derivados de purina.

4.2.6.1 Balanço de nitrogênio

O cálculo de balanço de nitrogênio foi realizado após a determinação da quantidade de nitrogênio presente nas amostras de ofertado, nas fezes e na urina, quantificados pelo método de micro-Kjeldahl utilizando destilador a vapor seguindo a metodologia da AOAC (2011) e calculados pela seguinte equação:

$$N_{\text{retido}} (\text{g dia}^{-1}) = N_{\text{ingerido}} - N_{\text{excretado}} \quad (5)$$

N_{retido} = quantidade média de nitrogênio retido pelo animal; N_{ingerido} = quantidade média nitrogênio ingerido pelo animal; $N_{\text{excretado}}$ = quantidade média de nitrogênio excretado nas fezes mais a quantidade média de nitrogênio excretado na urina.

4.2.6.2 Síntese de proteína microbiana por derivados de purina

Para estimar a síntese de proteína microbiana, utilizou-se a metodologia de Makkar e Chen (2004) para quantificação dos derivados de purina na urina após extração seguindo metodologia de Abdalla Filho et al. (2017).

Ao final do período experimental, as amostras compostas de urina de cada animal foram descongeladas, homogeneizadas e uma alíquota de 10% foi amostrada para extração dos derivados de purina, determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – High Performance Liquid Chromatography) com o uso de um cromatógrafo Agilent 1100 equipado com coluna Zorbax ODS C18 (Partículas de 5 µm) e detector de arranjo de

fotodiodos (UV-Vis). Para separação dos derivados de purina, utilizou-se uma solução de fosfato monobásico de amônio ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0,0025 M) e solução de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0,0025 M mais metanol na proporção de 95:5 (v/v), mantendo a temperatura da coluna a 23°C.

Soluções de alantoína, creatinina, ácido úrico, hipoxantina e xantina, com concentrações conhecidas (500 a 1500 μM), foram utilizadas para determinação da curva analítica. Uma solução de oxipurinol foi utilizada como padrão interno com concentrações de 500 a 1500 μM . Para quantificação dos derivados de purina, utilizaram-se os comprimentos de onda de 225 nm para alantoína e creatinina, 267 nm para xantina, 284 nm para ácido úrico e 254 nm parahipoxantina e oxipurinol.

O nitrogênio microbiano (NM) absorvido no intestino delgado foi calculado de acordo com Makkar e Chen (2004):

$$\text{NM} = (\text{MDP} \times \text{Teor de N}_{\text{purinas}}) / (\text{N}_{\text{purina}}:\text{N}_{\text{microbiano}} \times \text{digestibilidade das purinas microbianas} \times 1000) \quad (6)$$

NM = nitrogênio microbiano absorvido no intestino delgado (g N dia^{-1}); MDP = metabólitos derivados de purina absorvidos ($\text{mmol dia}^{-1} \text{kg}^{0,75^{-1}}$); Teor de $\text{N}_{\text{purinas}} = 70 \text{ mg N mmol}^{-1}$; $\text{N}_{\text{purina}}:\text{N}_{\text{microbiano}} = 0,116$; digestibilidade das purinas microbianas = 0,83.

O cálculo do MDP foi realizado através da equação:

$$\text{MDP} = (\text{área do metabólito} \times \text{concentração de oxipurinol no padrão} \times \text{FD}) / ((\text{FC} \times \text{área do oxipurinol no padrão}) \times \text{volume de urina (mL)}) \quad (7)$$

MDP = metabólito derivado de purina ($\mu\text{M L}^{-1}$); concentração de oxipurinol no padrão = 50; FD = fator de diluição (2,5); FC = fator de correção dos metabólitos de purina.

Para o cálculo do FC utilizou-se valores médios de injeções de padrão:

$$\text{FC} = (\text{área do metabólito no padrão} \times \text{concentração do oxipurinol no padrão}) / (\text{concentração do metabólito no padrão} \times \text{área do oxipurinol no padrão}) \quad (8)$$

4.2.7 Parâmetros de fermentação ruminal

Ao final do último dia do ensaio de digestibilidade, foi realizada colheita de líquido ruminal para determinação dos parâmetros fermentativos ruminais.

A colheita foi realizada quatro horas após o fornecimento da refeição matinal com auxílio de uma sonda esofágica de silicone conectada a uma seringa de 60 mL (Becton-Dickson Indústria Cirúrgica, Curitiba – PR, Brasil) através de sucção. Foi colhido aproximadamente 60 mL do líquido ruminal, armazenados em três tubos de vidro destinados para quantificação dos AGCC, N-NH₃ e protozoários. Os tubos para determinação dos AGCC e N-NH₃ foram armazenados a -20°C até realização das análises e os tubos para contagem de protozoários foram mantidos em temperatura ambiente após a adição de 2 mL de líquido ruminal em 4 mL de solução salina methylgreen formalina (M.F.S.).

Imediatamente após a colheita, o material foi levado para o laboratório e foi mensurado o pH com auxílio de um pHmetro digital (PG 2000 – Gehaka, São Paulo – SP, Brasil). A concentração dos AGCC foi quantificada de acordo com metodologia descrita por Palmquist e Conrad (1971) com adaptações de Lima et al. (2018) utilizando cromatógrafo gasoso após determinação das curvas de calibração com concentrações conhecidas de cada AGCC. O N-NH₃ foi determinado pelo método micro-Kjeldahl com destilação a vapor seguindo a metodologia de Preston (1995). A contagem de protozoários foi realizada com auxílio de um microscópio (Olympus CX31) com objetiva de 40x após adição de 10 µL do conteúdo de cada frasco em câmaras de Neubauer seguindo metodologia de Dehority, Damron e McLaren (1983).

4.2.8 Análise estatística

Os dados do ensaio de hidrólise foram submetidos a análise de variância (ANOVA) utilizando procedimento de modelos lineares mistos (MIXED) do software SAS v. 9.4 (Statistical Analysis System Inst., Cary - NC, USA) avaliando os efeitos fixos de dose e tempo e sua interação (dose x tempo). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade. Os dados experimentais foram analisados de acordo com o modelo estatístico abaixo:

$$Y_{ijk} = \mu + D_i + T_j + (D \times T)_{ij} + e_{ijk} \quad (9)$$

Y_{ijk} = variável dependente; μ = média geral; D = efeito fixo de dose; T = efeito fixo de tempo; $D \times T$ = efeito fixo da interação entre dose e tempo; e = erro experimental.

Para avaliação das respostas *in vivo*, os dados foram submetidos à ANOVA utilizando procedimento MIXED do software SAS v. 9.4 (Statistical Analysis System Inst., Cary - NC, USA). As médias foram comparadas pelo teste t com 5% de significância. Os dados obtidos foram analisados de acordo com o modelo estatístico abaixo:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + S_j + (T \times S)_{ij} + e_{ijk} \quad (10)$$

Y_{ijk} = variável dependente; μ = média geral; T = efeito fixo de tratamento; S = efeito fixo de sexo; T x S = efeito de interação entre tratamento e sexo; e = erro experimental.

4.3 Resultados

4.3.1 Ensaio de hidrólise da fibra

Nas Tabelas 4.4 e 4.5 são apresentados os efeitos de dose e tempo sobre a hidrólise da fração fibrosa do substrato feno de Tifton-85. Verificou-se maior redução ($P < 0,05$) da hemicelulose com a dose de $20 \mu\text{L g}^{-1}$ sobre a redução da fração hemicelulose; nas demais frações não foram observados efeito das doses utilizadas. Contudo, foi observado tendência ($P = 0,06$) em aumentar a hidrólise da celulose com a dose de $40 \mu\text{L g}^{-1}$.

Com relação ao tempo de incubação, foi observado que a partir de 24 horas a redução nas frações FDN e hemicelulose foram significativamente maiores quando comparado com o tempo 0. Não foi observado efeito ($P > 0,05$) de interação entre dose e tempo.

Tabela 4.4 – Valores médios dos parâmetros fibra em detergente neutro, fibra em detergente ácido, hemicelulose e celulose com diferentes doses do extrato de enzimas fibrolíticas

Dose ($\mu\text{L g}^{-1}$)	FDN	FDA	HEM	CEL
0	0,677	0,415	0,262 ^a	0,328
20	0,670	0,418	0,252 ^b	0,328
40	0,660	0,407	0,253 ^{ab}	0,322
80	0,679	0,424	0,256 ^a	0,330
E.P.M.	0,01	0,01	0,01	0,01
Valor de P	0,3869	0,5608	0,0381	0,0650

FDN = fibra em detergente neutro (g); FDA = fibra em detergente ácido (g); HEM = hemicelulose (g); CEL = celulose (g); E.P.M. = erro padrão da média.

Médias seguidas de letras sobrescritas diferentes na coluna diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Tabela 4.5 – Valores médios dos parâmetros fibra em detergente neutro, fibra em detergente ácido, hemicelulose e celulose em diferentes tempos de incubação com extrato de enzimas fibrolíticas

Tempo (h)	FDN	FDA	HEM	CEL
0	0,735 ^a	0,450 ^a	0,286 ^a	0,357 ^a
12	0,703 ^{ab}	0,420 ^a	0,283 ^a	0,344 ^b
24	0,666 ^b	0,423 ^a	0,242 ^b	0,323 ^c
36	0,665 ^b	0,432 ^a	0,232 ^b	0,318 ^c
48	0,589 ^c	0,355 ^b	0,234 ^b	0,292 ^d
E.P.M.	0,01	0,01	0,004	0,003
Valor de P	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

FDN = fibra em detergente neutro (g); FDA = fibra em detergente ácido (g); HEM = hemicelulose (g); CEL = celulose (g); E.P.M. = erro padrão da média.

Médias seguidas de letras sobrescritas diferentes na coluna diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância.

4.3.2 Ensaio metabolismo animal

A composição bromatológica dos fenos oferecidos para os animais do grupo CTL e ENZ 24 horas após aplicação da água destilada e do EEF são apresentadas na Tabela 4.6. A aplicação da água destilada e do EEF não proporcionaram alterações ($P > 0,05$) na composição bromatológica dos fenos ofertados 24 horas após a aplicação.

Tabela 4.6 – Composição bromatológica dos fenos 24 horas após aplicação de água destilada e extrato de enzimas fibrolíticas

Parâmetros	Tratamentos		E.P.M.	Valor de P
	CTL	ENZ		
MS (g kg ⁻¹)	738	741	13,21	0,8470
MO (g kg ⁻¹)	944	946	2,91	0,6283
FDN (g kg ⁻¹)	811	810	8,15	0,8851
FDA (g kg ⁻¹)	502	510	8,84	0,4150
Lignina (g kg ⁻¹)	107	109	4,57	0,6742
PB (g kg ⁻¹)	56	56	3,00	0,9520

MS = matéria seca; MO = matéria orgânica; FDN = fibra em detergente neutro; FDA = fibra em detergente ácido; PB = proteína bruta; HEM = hemicelulose; CEL = celulose; CTL = grupo controle; ENZ = grupo enzima; E.P.M. = erro padrão da média.

Médias comparadas pelo teste t a 5% de significância.

As médias do consumo diário (g dia⁻¹) e digestibilidade aparente dos nutrientes ingeridos (%) são apresentados na Tabela 4.7. A suplementação com o EEF não alterou ($P > 0,05$) o consumo dos nutrientes ingeridos nos animais experimentais. A digestibilidade dos nutrientes MS, MO, FDN e PB não foram afetados ($P > 0,05$) pela suplementação com o EEF, no entanto ocorreu um aumento ($P < 0,01$) na digestibilidade da FDA nos animais que receberam dieta com EEF. Ademais, os animais suplementados com o EEF apresentaram tendência de maior consumo ($P = 0,05$) de água quando comparado com os animais controle.

O sexo dos animais não influenciou ($P > 0,05$) o consumo dos nutrientes, contudo os animais machos apresentaram maior digestibilidade da FDA ($P < 0,05$) quando comparado com as fêmeas (64,4 vs 62,4 %, respectivamente). Não foram observados efeito ($P > 0,05$) de interação entre tratamento e sexo.

Tabela 4.7 – Consumo médio diário e digestibilidade aparente dos nutrientes de ovinos suplementados ou não com extrato de enzimas fibrolíticas exógenas

Parâmetros	Tratamentos		E.P.M.	Valor de P		
	CTL	ENZ		Trat.	Sexo	T x S
Consumo (g dia ⁻¹)						
MS	545,1	578,2	61,03	0,4426	0,0977	0,6573
MO	514,4	545,4	57,58	0,4414	0,0977	0,6566
FDN	335,1	355,5	39,87	0,4668	0,1219	0,7811
FDA	371,4	401,8	40,30	0,2922	0,0817	0,5359
PB	114,5	122,7	11,78	0,3252	0,0641	0,3774
H ₂ O (mL dia ⁻¹)	1213	1437	0,16	0,0543	0,1330	0,2094
Digestibilidade (%)						
MS	48,4	49,7	1,58	0,2284	0,1131	0,3689
MO	49,9	51,3	1,61	0,2332	0,1257	0,3426
FDN	35,1	37,1	2,67	0,2925	0,1108	0,2086
FDA	62,3 ^b	64,5 ^a	1,00	0,0059	0,0104	0,4342
PB	73,5	74,0	1,02	0,4556	0,0938	0,2474

MS = matéria seca; MO = matéria orgânica; FDN = fibra em detergente neutro; FDA = fibra em detergente ácido; PB = proteína bruta; CTL = grupo controle; ENZ = grupo enzima; E.P.M. = erro padrão da média; Trat. = efeito fixo de tratamento; Sexo = efeito fixo de sexo; T x S = efeito de interação entre tratamento e sexo. Médias seguidas de letras sobrescritas diferentes na linha diferem pelo teste de t a 5% de significância.

4.3.3 Balanço de nitrogênio

O consumo de nitrogênio, a quantidade de nitrogênio excretado nas fezes e na urina e a quantidade de nitrogênio retido (Tabela 4.8) não foram alterados ($P > 0,05$) pela suplementação do EEF. Os animais machos apresentaram maior ($P < 0,05$) quantidade de nitrogênio retido comparado com as fêmeas (10,7 vs 8,5 g dia⁻¹, respectivamente), entretanto, não foi observado ($P > 0,05$) efeito de interação entre tratamento e sexo.

Tabela 4.8 – Balanço de nitrogênio de ovinos suplementados ou não com extrato de enzimas fibrolíticas exógenas

Balanço N	Tratamentos		E.P.M.	Valor de P		
	CTL	ENZ		Trat.	Sexo	T x S
N consumido (g dia ⁻¹)	18,3	19,6	1,89	0,3252	0,0641	0,3778
N excretado (g dia ⁻¹)	8,9	9,9	1,09	0,3237	0,7545	0,3378
N retido (g dia ⁻¹)	9,5	9,8	1,23	0,7321	0,0168	0,8320

CTL = grupo controle; ENZ = grupo enzima; E.P.M. = erro padrão da média; Trat. = efeito fixo de tratamento; Sexo = efeito fixo de sexo; T x S = efeito de interação entre tratamento e sexo.

Médias comparadas pelo teste t a 5% de significância.

4.3.4 Síntese de proteína microbiana por derivados de purina

Os resultados dos derivados de purinas excretados na urina (mmol dia^{-1} e $\mu\text{mol dia}^{-1} \text{kg}^{-0,75}$) e a estimativa de nitrogênio microbiano absorvido não foram influenciados pela adição do EEF, como demonstrado na Tabela 4.9. Não foi observado efeito de sexo ($P > 0,05$) e efeito de interação entre tratamento e sexo sobre os parâmetros analisados.

Tabela 4.9 – Síntese de proteína microbiana por derivados de purinas de ovinos suplementados ou não com extrato de enzimas fibrolíticas exógenas

Balanço N	Tratamentos		E.P.M.	Valor de P		
	CTL	ENZ		Trat.	Sexo	T x S
DP (mmol dia^{-1})	30,04	33,48	8,58	0,5678	0,8393	0,2029
DP ($\mu\text{mol dia}^{-1} \text{kg}^{-0,75}$)	3402,05	3647,43	637,67	0,6823	0,4995	0,1726
NM _{absorvido} (g N dia^{-1})	3,53	3,59	0,14	0,5719	0,2179	0,6066

DP = derivados de purina excretados na urina; NM = nitrogênio microbiano; CTL = grupo controle; ENZ = grupo enzima; E.P.M. = erro padrão da média; Trat. = efeito fixo de tratamento; Sexo = efeito fixo de sexo; T x S = efeito de interação entre tratamento e sexo.

Médias comparadas pelo teste t a 5% de significância.

4.3.5 Parâmetros de fermentação ruminal

Os resultados dos parâmetros de fermentação ruminal são apresentados na Tabela 4.10. A adição do EEF não alterou ($P > 0,05$) a produção de acetato (C2), propionato (C3), butirato (C4), isobutirato, isovalerato, relação acetato:propionato (C2:C3) e a produção total de AGCC. Entretanto, maior produção de valerato ($P < 0,05$) foi observada nos animais suplementados com o EEF. Foi verificado efeito de sexo ($P < 0,001$) sobre a produção de isobutirato, com maior produção desse ácido graxo nas fêmeas ($0,61$ vs $0,78 \text{ mmol L}^{-1}$, respectivamente para macho e fêmea).

Além disso, efeito de interação entre tratamento e sexo foi observado sobre os parâmetros isobutirato e isovalerato. Foi observado que os animais machos do grupo ENZ apresentaram maiores concentrações ($P < 0,05$) de isobutirato e isovalerato quando comparado com os animais machos do grupo CTL ($0,68$ vs $0,53 \text{ mmol L}^{-1}$ isobutirato; $1,81$ vs $1,35 \text{ mmol L}^{-1}$ isovalerato, respectivamente para ENZ e CTL).

Para os parâmetros pH, N-NH₃ e protozoários, não foi verificado efeito ($P > 0,05$) de tratamento, sexo e interação tratamento e sexo com a adição do EEF.

Tabela 4.10 – Parâmetros de fermentação ruminal de ovinos suplementados ou não com extrato de enzimas fibrolíticas exógenas

Parâmetros	Tratamentos		E.P.M.	Valor de P		
	CTL	ENZ		Trat.	Sexo	T x S
AGCC totais (mmol L ⁻¹)	80,98	84,23	2,43	0,1798	0,4567	0,1767
C2 (mmol L ⁻¹)	56,65	59,28	2,01	0,1886	0,7240	0,5634
C3 (mmol L ⁻¹)	13,98	14,41	0,72	0,5365	0,1045	0,8703
C4 (mmol L ⁻¹)	7,37	7,17	0,86	0,8070	0,8815	0,0716
Isobutirato (mmol L ⁻¹)	0,71	0,67	0,05	0,3074	0,0006	0,0146
Isovalerato (mmol L ⁻¹)	1,56	1,76	0,09	0,0590	0,1381	0,0167
Valerato (mmol L ⁻¹)	0,70 ^b	0,85 ^a	0,53	0,0047	0,0552	0,3666
C2:C3	4,10	4,19	0,27	0,7328	0,2389	0,7182
pH	6,79	6,65	0,13	0,2853	0,5331	0,0578
N-NH ₃ (mg dL ⁻¹)	33,07	30,60	2,21	0,2444	0,1073	0,4884
Protozoários (x10 ⁵ mL ⁻¹)	8,03	10,14	2,32	0,3395	0,0602	0,4019

AGCC = ácidos graxos de cadeia curta (somatória de todos os ácidos graxos demonstrados); C2 = acetato; C3 = propionato; C4 = butirato; C2:C3 = relação acetato propionato; CTL = grupo controle; ENZ = grupo enzima; E.P.M. = erro padrão da média; Trat. = efeito fixo de tratamento; Sexo = efeito fixo de sexo; T x S = efeito de interação entre tratamento e sexo.

Médias com letras sobrescritas diferentes na linha diferem pelo teste t a 5% de significância.

4.4 Discussão

O ensaio de hidrólise da fibra foi realizado para determinar qual das doses utilizadas seria mais eficiente em reduzir a fração fibrosa do substrato feno de Tifton-85 mimetizando as condições ruminais (temperatura e pH controlados). Apesar da dose de 20 $\mu\text{L g}^{-1}$ ter apresentado melhor resposta sobre a hidrólise da hemicelulose, foi selecionada a dose de 40 $\mu\text{L g}^{-1}$ para ser utilizada no ensaio *in vivo*, pois além dessa dose não diferir estatisticamente da dose de 20 $\mu\text{L g}^{-1}$ sobre a redução da hemicelulose, esta apresentou um potencial superior sobre a redução da FDN e FDA em comparação com as demais, apesar de não significativo.

Ademais, o ensaio de hidrólise demonstrou que quanto maior o tempo de incubação maior redução sobre a fração fibrosa. Assim, a aplicação do EEf foi realizada 24 horas antes do fornecimento de cada refeição para prolongar o tempo de permanência das enzimas com o substrato e aumentar as chances das enzimas agirem em nível ruminal decorrente de sua complexação com o substrato (complexo enzima-substrato), reduzindo as chances das enzimas serem hidrolisadas e/ou escaparem rapidamente do ambiente ruminal, o que diminuiria seu efeito (BEAUCHEMIN et al., 2003; HE et al., 2015).

Após análise bromatológica dos fenos pré tratados com água destilada e EEf 24 horas antes do fornecimento da refeição, nenhum efeito do EEf (efeito pré ingestivo) foi observado sobre a fração fibrosa. Romero et al. (2015) testaram o efeito de 12 enzimas fibrolíticas sobre a hidrólise do substrato Tifton-85. Os resultados sobre a hidrólise pré

ingestiva 24 horas após adição das enzimas foram bem variados e dependeram da enzima utilizada, contudo os autores concluíram que diversas enzimas podem hidrolisar a fração fibrosa desse substrato, além de verificarem maior efetividade das enzimas em hidrolisar a hemicelulose do que a FDA.

Giraldo et al. (2007) verificaram redução nas frações FDN, FDA e hemicelulose do feno de alfafa pré tratados por 24 horas com celulases de diferentes fungos, concluindo que o pré tratamento por 24 horas proporcionou uma alteração na fração fibrosa do substrato utilizado. De modo semelhante, Díaz et al. (2015) testaram o efeito da adição de três enzimas fibrolíticas (celulase, xilanase e celulase + xilanase) sobre a composição bromatológica de diferentes forrageiras tropicais após período de pré tratamento por 24 horas. Os pesquisadores verificaram redução nas frações FDN, FDA e hemicelulose em alguns substratos utilizados apenas com a adição da enzima celulase, não observando nenhum efeito com a adição apenas de xilanases, demonstrando que as características das forragens determinam os efeitos das enzimas sobre a composição da parede celular vegetal em questão.

Muitas vezes, o pré tratamento com enzimas fibrolíticas podem causar alterações sobre os constituintes da parede celular vegetal, através da remoção de alguns constituintes estruturais (SONG et al., 2018) ou mesmo pela alteração ou enfraquecimento da estrutura da parede celular (DÍAZ et al., 2015), contudo, essas alterações podem não ser retratadas em reduções nas frações fibrosas (DÍAZ et al., 2015).

A adição de enzimas fibrolíticas exógenas parece não afetar o consumo dos nutrientes da dieta como observado nesse estudo e em diversos estudos encontrados na literatura (ARRIOLA et al., 2011; SALEM et al., 2013; WANG; XUE, 2016; ARRIOLA et al., 2017; YUANGKLANG et al., 2017; SONG et al., 2018). Entretanto, outros estudos verificaram aumento no consumo de matéria seca (CMS) em ovinos suplementados com enzimas fibrolíticas exógenas (VALDES et al., 2015; VALLEJO et al., 2016) e vacas leiteiras (GADO et al., 2009). Tirado-González et al. (2018) publicaram uma meta-análise avaliando a adição de enzimas fibrolíticas exógenas na dieta de vacas em lactação, bovinos de corte e ovinos recebendo dietas com baixo volumoso (<50% volumoso da dieta) e alto volumoso (>50% volumoso na dieta). Os resultados observados sobre o CMS foram dependentes do tipo de animal e do tipo da dieta.

Segundo Yuangklang et al. (2017), especula-se que o CMS pode ser dependente do tipo de volumoso utilizado assim como da eficácia das enzimas fibrolíticas em influenciar a taxa de desaparecimento das partículas alimentares de cada volumoso no rúmen. Além disso, muitas vezes o CMS pode variar dependendo da dose utilizada, como demonstrado por

Vallejo et al. (2016), que utilizaram três doses de um produto enzimático comercial na dieta de ovinos e verificaram que a dose mais baixa e a dose intermediária aumentaram o CMS dos animais, no entanto, a dose mais alta proporcionou uma redução no CMS quando comparado com os animais controle.

Uma das hipóteses sustentadas pelos pesquisadores é que o pré tratamento com enzimas fibrolíticas (hidrólise pré ingestiva) possa levar ao aumento no CMS decorrente do aumento na hidrólise da fibra pelas enzimas, e dessa forma, reduzir o enchimento do trato gastrointestinal e estimulando o consumo (ROMERO et al., 2015). No presente estudo, apesar do consumo de nutrientes dos animais suplementados com o EEF não diferir dos animais controle, numericamente o consumo desses animais foi maior. Nesse sentido, o pré tratamento com o EEF por um período maior de tempo talvez resultasse em aumento na hidrólise pré ingestiva e, conseqüentemente, aumento no CMS pelos animais suplementados.

De acordo com pesquisas, a adição de enzimas fibrolíticas na dieta de ruminantes proporciona um aumento na digestibilidade aparente da MS, MO, FDN e FDA (ARRIOLA et al., 2011; ARRIOLA et al., 2017; YUANGKLANG et al., 2017; SONG et al., 2018). No presente estudo, verificou-se apenas aumento na digestibilidade da FDA nos animais suplementados com o EEF. Dessa forma, especula-se que a adição do EEF possa ter aumentado a quebra das ligações da hemicelulose com a celulose, facilitando o acesso e a colonização dos microrganismos ruminais e ação de suas enzimas endógenas sobre a fração FDA, além de estimular o crescimento de bactérias com atividade celulolítica.

Ações sinérgicas entre as enzimas fibrolíticas exógenas e enzimas endógenas foram descritas como possível mecanismo de ação (MEALE et al., 2014). Através da ação sinérgica entre ambas as enzimas, poderá ocorrer um aumento na atividade hidrolítica ruminal (BEAUCHEMIN et al., 2004; ELGHANDOUR et al., 2016), além de facilitar a aderência dos microrganismos ao substrato e estimular a colonização dos mesmos (BEAUCHEMIN et al., 2004; RIBEIRO et al., 2015). Wang et al. (2012) relataram que a adição de enzimas fibrolíticas exógenas possuem potencial de aumentar a digestibilidade da fração fibrosa pelos microrganismos celulolíticos ruminais, além de demonstrarem que a pré incubação do substrato com as enzimas aumentou a colonização por *Ruminococcus flavefaciens*.

O tratamento do feno com o EEF por um maior período de tempo poderia aumentar a ação hidrolítica das enzimas presentes no EEF e, dessa forma, aumentar a digestibilidade aparente dos demais nutrientes, visto que os animais suplementados com o EEF apresentaram um aumento de 1 a 2% na digestibilidade aparente da MS, MO e FDN quando comparado com os animais controle. Aboagye et al. (2015) relataram aumento na digestibilidade da FDN

e hemicelulose do feno de alfafa tratado com enzimas fibrolíticas exógenas e armazenados por 90 dias até serem fornecidos para ovinos. Os pesquisadores testaram um segundo tratamento adicionando a mesma mistura enzimática momentos antes do fornecimento da refeição, porém observaram efeito apenas na digestibilidade da MS e MO quando comparado com os animais controle e os animais alimentados com o feno tratado com as enzimas e armazenados por 90 dias. Esses pesquisadores sugeriram que haveria a necessidade de um longo período de interação entre as enzimas e o substrato para que se pudesse observar efeitos aparentes sobre a digestibilidade da FDN, como demonstrado pelos animais alimentados com o feno adicionado com enzimas fibrolíticas e armazenados por 90 dias.

O consumo de água foi medido nesse estudo para verificar se poderia ocorrer uma redução na ingestão de água pelos animais suplementados com o EEF decorrente do aumento no catabolismo de carboidratos (ENSMINGER; OLDFIELD; HEINEMANN, 1990), principalmente oriundo dos carboidratos fibrosos e, dessa forma, aumentando a quantidade de água metabólica produzida. No entanto, observou-se um aumento potencial no consumo de água pelos animais suplementados com o EEF. De acordo com Naqvi et al. (2017), fatores como o tipo da dieta, idade do animal, temperatura ambiental e qualidade da água podem afetar o consumo de água pelo animal. Contudo, os animais de ambos os tratamentos apresentavam a mesma idade, mesma raça, receberam o mesmo manejo e permaneceram no mesmo ambiente, dessa forma, o aumento no consumo de água possa estar relacionado com a maior necessidade de água exigida para o metabolismo dos animais ou devido a algum composto presente no EEF que proporcionou um estímulo no consumo de água.

É importante destacar que o volume médio de urina excretado pelos animais suplementados com o EEF também foi maior (1089 vs 1607 mL – $P = 0,07$, respectivamente para CTL e ENZ), contudo, a quantidade de umidade presente nas fezes permaneceu inalterada (42,1 vs 42,9%, respectivamente para CTL e ENZ). Nesse sentido, podemos observar que a excreção de urina pelos animais do grupo ENZ (1607 mL) foi superior à quantidade de água consumida (1437 mL), podendo sugerir maior catabolismo dos nutrientes e maior produção de água metabólica, uma vez que a quantidade de umidade presente na dieta e as condições experimentais (temperatura e umidade) foram as mesmas para ambos os tratamentos e presumindo que a quantidade de água perdida pelos processos de respiração e transpiração fossem iguais para ambos os animais experimentais, apesar de não mensurados.

Como já relatado, o consumo e o balanço de nitrogênio não foram influenciados pela adição do EEF corroborando com os resultados encontrados por Wang e Xue (2016).

Valdes et al. (2015) observaram aumento no consumo e balanço de nitrogênio de ovinos suplementados com mistura enzimática comercial, indicando melhor utilização dos nutrientes e, conseqüentemente, menor excreção de nitrogênio no ambiente. Além de que, pesquisas indicam que a adição de enzimas fibrolíticas pode aumentar o número total de microrganismos ruminais pelo estímulo na síntese de proteína microbiana devido ao aumento da digestibilidade da fibra, dessa forma, aumentando a quantidade de proteína microbiana a ser utilizada pelo organismo animal (GADO et al., 2009; SALEM et al., 2013; VALDES et al., 2015). Apesar do aumento da digestibilidade da FDA, a síntese de proteína microbiana não foi influenciada pela adição do EEF, sugerindo que possa ter ocorrido estímulo no crescimento de bactérias celulolíticas, contudo, sem afetar a população total de microrganismos ruminais, como observado por Chung et al. (2012), que verificaram que a adição de enzimas fibrolíticas não proporcionou aumento na densidade populacional de bactérias e protozoários totais, mas ocorreu aumento na densidade populacional de algumas espécies de bactérias.

A contagem total de protozoários não foi influenciada pela adição do EEF, concordando com resultados encontrados na literatura (CHUNG et al., 2012; YUANGKLANG et al., 2017; VALLEJO-HERNÁNDEZ et al., 2018).

A adição do EEF não afetou o pH ruminal nem a produção de AGCC e N-NH₃, estando de acordo com resultados verificados por Chung et al. (2012) e He et al. (2015) que também não observaram resultados sobre os parâmetros fermentativos após a adição de enzimas fibrolíticas. Contudo, diversos estudos relataram incrementos nos parâmetros fermentativos sem alteração do pH ruminal (SALEM et al., 2013; YUANGKLANG et al., 2017; SONG et al., 2018). Yuangklang et al. (2017) atribuíram o aumento nas concentrações dos AGCC após adição de enzimas fibrolíticas na dieta de cabritos ao aumento na digestibilidade da FDN e FDA. Dessa forma, como ocorreu um aumento numérico na produção total de AGCC e acetato no nosso estudo, caso tivesse ocorrido aumento na digestibilidade da FDN, e não somente da FDA, diferenças significativas poderiam ter sido observadas sobre os parâmetros fermentativos com a adição do EEF.

Pequena redução na concentração de N-NH₃ foi observada nos animais suplementados com o EEF. Song et al. (2018) observaram redução significativa na concentração de N-NH₃ após adição de enzimas fibrolíticas, relatando que essa redução poderia ser devido ao aumento na digestibilidade das frações FDN e FDA, proporcionando um aumento na síntese de proteína microbiana. No entanto, estudos relataram que o uso de enzimas fibrolíticas exógenas são capazes de aumentar a concentração de N-NH₃ ruminal

decorrente do aumento da atividade proteolítica por proteases que possam estar presentes nas misturas enzimáticas (GADO et al., 2009; SALEM et al., 2013).

A maior produção de valerato nos animais suplementados com o EEF pode estar relacionada com a maior eficiência alimentar, como demonstrado por Guan et al. (2008), que verificaram que bovinos com maior eficiência alimentar, parâmetro mensurado através do consumo alimentar residual, produziam maiores quantidades de valerato quanto comparado com animais menos eficientes. Além disso, esses pesquisadores também observaram uma maior concentração de AGCC totais e de C2 (apesar de não significativo) nos animais com melhor eficiência alimentar, como observado no presente estudo, onde os animais suplementados com o EEF apresentaram valores numericamente maiores de AGCC totais e de C2 produzidos, podendo indicar uma melhor eficiência alimentar dos animais suplementados com o EEF.

O aumento na produção de valerato nos animais de ambos os sexos e isobutirato e isovalerato nos animais machos do grupo ENZ, pode propiciar o crescimento de bactérias fermentadoras de carboidratos fibrosos, uma vez que essas bactérias utilizam apenas a amônia para sintetizar seus aminoácidos e necessitam de esqueletos de carbono provenientes dos ácidos graxos de cadeia ramificada para que ocorra a incorporação da molécula de amônia (SANTOS, 2006; KOZLOSKI, 2016). Nesse sentido, a maior digestibilidade da FDA poderia ser oriunda do aumento na população de bactérias celulolíticas decorrente do aumento de substratos (valerato, isovalerato e isobutirato) necessários para seu crescimento.

4.5 Conclusão

Conclui-se que o EEF pode ser utilizado para incrementar a digestibilidade da FDA de forrageiras com baixa qualidade nutricional podendo ser uma estratégia para aumentar a produtividade animal, principalmente em regiões tropicais, onde as forrageiras apresentam alta sazonalidade e elevada proporção de parede celular.

Novos estudos devem ser conduzidos para padronização dos métodos de aplicação do EEF sobre as forrageiras e para determinar o tempo de pré ingestão necessário para obter redução nas frações fibrosas após a aplicação do EEF. Assim, melhores resultados poderão ser observados sobre a digestibilidade dos nutrientes.

Referências

ABDALLA FILHO, A. L. et al. Performance, metabolic variables and enteric methane production of Santa Inês hair lambs fed *Orbignya phalerata* and *Combretum leprosum*. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 101, n. 3, p. 457–465, 2017.

ABOAGYE, I. A. et al. Digestibility and growth performance of sheep fed alfalfa hay treated with fibrolytic enzymes and a ferulic acid esterase producing bacterial additive. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 203, p. 53–66, 2015.

ADESOGAN, A. T. et al. Improving cell wall digestion and animal performance with fibrolytic enzymes. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 92, n. 4, p. 1317–1330, 2014.

ARRIOLA, K. G. et al. Effect of fibrolytic enzyme application to low- and high-concentrate diets on the performance of lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 94, n. 2, p. 832–841, 2011.

ARRIOLA, K. G. et al. A meta-analysis on the effect of dietary application of exogenous fibrolytic enzymes on the performance of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 100, n. 6, p. 4513–4527, 2017.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 18. 4 ed. Arlington: AOAC International, 2011.

BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 23, n. 3, p. 257–270, 1992.

BEAUCHEMIN, K. A. et al. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 81, n. 14, p. E37–E47, 2003. Suppl. 2.

BEAUCHEMIN, K. A. et al. Mode of action of exogenous cell wall degrading enzymes for ruminants. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 84, n. 1, p. 13–22, 2004.

CHUNG, Y.-H. et al. A fibrolytic enzyme additive for lactating Holstein cow diets: Ruminal fermentation, rumen microbial populations, and enteric methane emissions. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 95, n. 3, p. 1419–1427, 2012.

COLOMBATTO, D.; BEAUCHEMIN, K. A. A proposed methodology to standardize the determination of enzymic activities present in enzyme additives used in ruminant diets. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 83, n. 3, p. 559–568, 2003.

DEHORITY, B. A. A.; DAMRON, W. S. S.; MCLAREN, J. B. B. Occurrence of the Rumen Ciliate *Oligoisotricha bubali* in Domestic Cattle (*Bos taurus*). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 45, n. 4, p. 1394–1397, 1983.

DÍAZ, A. et al. Treatment of tropical forages with exogenous fibrolytic enzymes: effects on chemical composition and in vitro rumen fermentation. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 99, n. 2, p. 345–55, 2015.

ELGHANDOUR, M. M. Y. et al. Influence of the addition of exogenous xylanase with or without pre-incubation on the in vitro ruminal fermentation of three fibrous feeds. **Czech Journal of Animal Science**, Prague, v. 61, n. 6, p. 262–272, 2016.

ENSMINGER, M.; OLDFIELD, J.; HEINEMANN, W. **Feeds and nutrition digest**. 2. ed. Clovis, CA: Ensminger Publishing Company, 1990. 794 p.

GADO, H. M. et al. Influence of exogenous enzymes on nutrient digestibility, extent of ruminal fermentation as well as milk production and composition in dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 154, n. 154, p. 36–46, 2009.

GADO, H. M. et al. Influence of exogenous enzymes ensiled with orange pulp on digestion and growth performance in lambs. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 165, n. 1–2, p. 131–136, 2011.

GIRALDO, L. A. et al. Effects of exogenous cellulase supplementation on microbial growth and ruminal fermentation of a high-forage diet in Rusitec fermenters1. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 85, n. 8, p. 1962–1970, 2007.

GUAN, L. L. et al. Linkage of microbial ecology to phenotype: correlation of rumen microbial ecology to cattle's feed efficiency. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 288, n. 1, p. 85–91, 2008.

HE, Z. X. et al. Effect of wheat dried distillers grains with solubles and fibrolytic enzymes on ruminal fermentation, digestibility, growth performance, and feeding behavior of beef cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 93, n. 3, p. 1218, 2015.

KOZLOSKI, G. V. **Bioquímica dos ruminantes**. 3. ed. Santa Maria: Editora UFSM, 2016. 212 p.

LIMA, P. M. T. et al. Nutritional evaluation of the legume *Macrotyloma axillare* using in vitro and in vivo bioassays in sheep. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 102, n. 2, p. e669–e676, 2018.

MAKKAR, H. P. S.; CHEN, X. B. **Estimation of microbial protein supply in ruminants using urinary purine derivatives**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2004.

MEALE, S. J. et al. BOARD-INVITED REVIEW: Opportunities and challenges in using exogenous enzymes to improve ruminant production. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 92, n. 2, p. 427–442, 2014.

MERTENS, D. R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: collaborative study. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 85, n. 6, p. 1217–1240, 2002.

NAQVI, S. M. K. et al. Climate changes, water use and survival during severe water deprivation. In: SEJIAN, V. et al. (Ed.). **Sheep production adapting to climate change**. Singapore: Springer Singapore, 2017. p. 173–187.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of small ruminants: sheep, goats, cervids, and world camelids**. Washington, DC: National Academies Press, 2007.

NSEREKO, V. L. et al. Effects of fungal enzyme preparations on hydrolysis and subsequent degradation of alfalfa hay fiber by mixed rumen microorganisms in vitro. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 88, n. 3–4, p. 153–170, 2000.

PALMQUIST, D. L.; CONRAD, H. R. Origin of plasma fatty acids in lactating cows fed high grain or high fat diets. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 54, n. 7, p. 1025–1033, 1971.

PRESTON, T. R. Biological and chemical analytical methods. In: PRESTON, T. R. (Ed.). **Tropical animal feeding: a manual for research workers**. Ho Chi Minh: FAO, 1995. p. 181–239.

RIBEIRO, G. O. et al. Effect of fibrolytic enzymes added to a *Andropogon gayanus* grass silage-concentrate diet on rumen fermentation in batch cultures and the artificial rumen (Rusitec). **Animal**, Cambridge, v. 9, n. 7, p. 1153–1162, 2015.

ROMERO, J. J. et al. Screening exogenous fibrolytic enzyme preparations for improved in vitro digestibility of bermudagrass haylage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 98, n. 4, p. 2555–2567, 2015.

SALEM, A. Z. M. et al. Effects of exogenous enzymes on nutrient digestibility, ruminal fermentation and growth performance in beef steers. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 154, n. 1–3, p. 69–73, 2013.

SANTOS, F. A. P. Metabolismo de proteínas. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. (Ed.). **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal: FUNEP, 2006. p. 255–286.

SNIFFEN, C. J. et al. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 70, n. 11, p. 3562–3577, 1992.

SONG, S. D. et al. Effects of exogenous fibrolytic enzyme supplementation to diets with different NFC/NDF ratios on the growth performance, nutrient digestibility and ruminal fermentation in Chinese domesticated black goats. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 236, p. 170–177, 2018.

TIRADO-GONZÁLEZ, D. N. et al. Meta-analysis: effects of exogenous fibrolytic enzymes in ruminant diets. **Journal of Applied Animal Research**, Oxford, v. 46, n. 1, p. 771–783, 2018.

VALDES, K. I. et al. Influence of exogenous enzymes in presence of *Salix babylonica* extract on digestibility, microbial protein synthesis and performance of lambs fed maize silage. **The Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 153, n. 4, p. 732–742, 2015.

VALLEJO-HERNÁNDEZ, L. H. et al. Environmental impact of yeast and exogenous xylanase on mitigating carbon dioxide and enteric methane production in ruminants. **Journal of Cleaner Production**, Oxford, v. 189, p. 40–46, 2018.

VALLEJO, L. H. et al. Effects of xylanase supplementation on feed intake, digestibility and ruminal fermentation in Rambouillet sheep. **The Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 154, n. 6, p. 1110–1117, 2016.

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**, Champaign, v. 74, n. 10, p. 3583–3597, 1991.

WANG, L.; XUE, B. Effects of cellulase supplementation on nutrient digestibility, energy utilization and methane emission by boer crossbred goats. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, Seoul, v. 29, n. 2, p. 204–210, 2016.

WANG, Y. et al. Effect of exogenous fibrolytic enzyme application on the microbial attachment and digestion of barley straw in vitro. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, Seoul, v. 25, n. 1, p. 66–74, 2012.

WILKINSON, J. M.; LEE, M. R. F. Use of human-edible animal feeds by ruminant livestock. **Animal**, Cambridge, v. 12, n 8, p. 1–9, 12, 2018.

WOOD, T. M.; BHAT, K. M. Methods for measuring cellulase activities. In: WOOD, W. A.; KELLOGG, S. T. (Ed.). **Methods in enzymology**. London:, Elsevier, 1988. v. 160. p. 87–112.

YUANGKLANG, C. et al. Growth performance and macronutrient digestion in goats fed a rice straw based ration supplemented with fibrolytic enzymes. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 154, p. 20–22, 2017.

5. EFEITOS DA ADIÇÃO DE ENZIMAS FIBROLÍTICAS EXÓGENAS SOBRE O DESEMPENHO ANIMAL E PRODUÇÃO DE METANO ENTÉRICO DE OVINOS EM CRESCIMENTO

Resumo

O aumento da população mundial traz consigo a preocupação com a segurança alimentar. Nesse contexto, o aumento na produtividade pecuária torna-se necessário para poder atender à demanda de proteína animal. Nos últimos anos a atividade pecuária vem sofrendo pressão decorrente dos impactos ambientais causados, principalmente pela grande contribuição nas emissões de metano (CH₄) entérico emitido pelos animais ruminantes, contribuindo com o aquecimento global. Dessa forma, há a necessidade de aliar o aumento na produtividade com as reduções dos impactos ambientais causados pela produção de ruminantes. Enzimas fibrolíticas exógenas passaram a ser utilizadas na nutrição de ruminantes para incremento na produtividade e como uma possível estratégia de mitigação de CH₄ entérico por unidade de proteína animal produzida. Contudo, poucos estudos *in vivo* foram realizados para sustentar essa hipótese em condições tropicais. O objetivo do estudo foi avaliar o efeito da adição de uma mistura enzimática na dieta de ovinos sobre os parâmetros produtivos e de saúde, assim como a produção de CH₄ entérico. Foram utilizados 19 ovinos em crescimento distribuídos em dois grupos, controle (CTL) e enzima (ENZ). Os animais foram alimentados com feno de Tifton-85 e mistura concentrada numa proporção de 70:30 (volumoso:concentrado) por 73 dias. Foi utilizado um extrato de enzimas fibrolíticas (EEF) aplicado manualmente sobre o feno 24 horas antes do fornecimento da dieta. Não foram observadas diferenças ($P > 0,05$) sobre o consumo diário de matéria seca, consumo de água, ganho médio diário de peso (GMDP) e conversão alimentar. Contudo, os animais suplementados com o EEF apresentaram maior percentual médio de ganho de peso. Os parâmetros sanguíneos demonstraram que o EEF não apresentou efeitos nocivos à saúde dos animais. Os animais suplementados com o EEF apresentaram menor produção ($P < 0,05$) de CH₄ entérico por kg de matéria seca ingerida e potencial de redução ($P = 0,09$) de CH₄ por kg de GMDP. Conclui-se que o EEF pode ser utilizado na dieta de ruminantes sem efeitos nocivos à saúde dos animais além de ser uma estratégia para incremento na produtividade pecuária e redução nas emissões de CH₄ entérico, podendo promover maior sustentabilidade a cadeia de produção de ruminantes.

Palavras-chave: Enzimas fibrolíticas. Percentual de ganho de peso. Mitigação de metano. Sustentabilidade.

5. Effects of exogenous fibrolytic enzymes addition on animal performance and enteric methane production in growing sheep

Abstract

The increase in world population brings with it concern for food security. In this context, the increase in livestock production becomes necessary to meet the demand for animal protein. In recent years' livestock production has been under pressure due to the environmental impacts, mainly due to the great contribution of enteric methane (CH₄) emissions from ruminant animals, contributing to the global warming. Thus, there is a need to combine productivity gains with reductions in environmental impacts caused by ruminant production. Exogenous fibrolytic enzymes have been used in ruminant nutrition to increase productivity and as a possible strategy to mitigate enteric CH₄ per unit of animal protein produced. However, few *in vivo* studies have been conducted to support this hypothesis. The aim of this study was to evaluate the effect of the addition of an enzymatic mixture in the diet of sheep on health and performance parameters and enteric CH₄ production. It was used 19 growing sheep divided in two groups, control (CTL) and enzyme (ENZ). The animals were fed with 70% of Tifton-85 hay and 30% of concentrate mixture for 73 days. The fibrolytic enzyme extract (FEE) was manually applied 24 hours before each meal supply. No differences ($P > 0,05$) were observed on daily dry matter intake, water consumption, average daily gain (ADG), and feed conversion ratio. However, animal supplemented with FEE showed a higher average percentage of weight gain. Blood parameters showed that FEE did not have harmful effects on animal health. Animals supplemented with FEE showed lower ($P < 0,05$) enteric CH₄ production per kg of dry matter intake and potential reduction ($P = 0,09$) of CH₄ per kg of ADG. It can be concluded that the FEE can be used in the diet of ruminants without harmful effects to the animal's health besides being a strategy to increase the livestock production and reduce enteric CH₄ emissions, which may promote greater sustainability of ruminant production system.

Keywords: Fibrolytic enzymes. Percentage of weight gain. Methane mitigation. Sustainability.

5.1 Introdução

A criação de ruminantes apresenta papel importante no fornecimento de carne e leite em todo mundo, além de ser considerada fonte de subsistência para as populações mais pobres (EISLER et al., 2014). A principal fonte de nutrientes desses animais são as forrageiras, demonstrando sua vantagem em converter alimentos fibrosos em proteínas de alta qualidade nutricional (WILKINSON; LEE, 2018) sem utilizar ingredientes da nutrição humana (VAN SOEST, 1994), tornando uma atividade que poderá ajudar a solucionar os problemas de segurança alimentar decorrente do aumento da população mundial (MCAULIFFE et al., 2018).

No entanto, os animais ruminantes contribuem com grande parte das fontes antropogênicas dos gases de efeito estufa (GEE) (GERBER et al., 2013; HAMMOND et al., 2016) sendo representado principalmente pelo metano (CH_4) entérico (CERRI et al., 2016; HERNANDEZ et al., 2017). Além de contribuir com os impactos ambientais, o CH_4 entérico representa uma perda energética (carbono) para o animal, reduzindo a eficiência produtiva da cadeia de produção de ruminantes (GERBER et al., 2013). Dessa forma, a menor emissão de CH_4 entérico pode proporcionar um aumento na eficiência alimentar (BEAUCHEMIN et al., 2008; QIAO; TAN; WANG, 2014) além de reduzir as emissões geradas pela produção pecuária.

Nesse contexto, a utilização de aditivos enzimáticos passou a ser pesquisados pela comunidade científica como uma possível estratégia para incremento na produtividade e mitigação de CH_4 entérico (ARRIOLA et al., 2011; CHUNG et al., 2012; WANG; XUE, 2016; KHOLIF et al., 2017; VALLEJO-HERNÁNDEZ et al., 2018). Nenhum efeito direto é atribuído a adição das enzimas fibrolíticas exógenas na redução do CH_4 , sendo alguns resultados atribuídos a melhora na digestibilidade dos nutrientes e aumento na produtividade animal, mas as respostas são inconsistentes e não compreendidas (HRISTOV et al., 2013).

Diversos estudos *in vitro* concluíram que a adição de enzimas fibrolíticas exógenas consiste em um método eficiente de reduzir as emissões de CH_4 na cadeia de produção de ruminantes (HERNANDEZ et al., 2017; HERNÁNDEZ et al., 2017; VALLEJO-HERNÁNDEZ et al., 2018). Apesar de existir a hipótese de mitigação de CH_4 entérico com a utilização de enzimas fibrolíticas exógenas, poucos estudos *in vivo* foram publicados e que podem sustentar essa hipótese, principalmente devido aos resultados inconsistentes observados na literatura (GRAINGER; BEAUCHEMIN, 2011).

O objetivo do presente estudo foi avaliar a adição de um extrato de enzimas fibrolíticas (EEF) exógenas sobre o desempenho e produção de CH₄ entérico de ovinos em crescimento. O estudo foi fundamentado na hipótese de que o uso de um produto enzimático produzido por fungo que utiliza substratos de baixa qualidade nutricional para seu desenvolvimento consiga produzir as enzimas necessárias para degradar de forma efetiva os carboidratos fibrosos das forrageiras, principalmente em épocas onde as forragens apresentam baixa qualidade e produtividade, forçando os produtores a utilizarem alternativas alimentares (fenos, silagens, capineira e diferimento de pastagens) que usualmente apresentam baixa qualidade nutricional e assim, proporcionando melhor aproveitamento dos nutrientes da dieta e aumentando a produtividade animal, além de ser uma possível estratégia de mitigação de CH₄ entérico por unidade de proteína animal produzida.

5.2 Materiais e métodos

5.2.1 Local e declaração de ética

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CEUA/CENA – Protocolo 014/2016). A parte experimental e as análises laboratoriais foram desenvolvidas no Laboratório de Nutrição Animal (LANA) do Centro de Energia Nuclear na Agricultura – Universidade de São Paulo, situado no município de Piracicaba – SP, Brasil, entre os meses de outubro e novembro de 2017.

5.2.2 Extrato de enzimas fibrolíticas e atividade enzimática

A descrição do produto enzimático utilizado, amostragem e ensaio de atividade enzimática estão apresentados no Capítulo 4 na subseção 4.2.2.

O ensaio de atividade enzimática do EEF seguiu a metodologia de Wood e Bhat (1988) para determinação da atividade celulolítica das enzimas fibrolíticas endoglucanase (EC 3.2.1.4) e exoglucanase (3.2.1.91) e Bailey, Biely e Poutanen (1992) para determinação da atividade xilanolítica da enzima xilanase (3.2.1.8) seguindo as modificações de Colombatto e Beauchemin (2003) para determinação de atividade enzimática de produtos utilizados na nutrição de ruminantes com pH e temperatura controlados.

Tabela 5.1 - Atividade enzimática do extrato bruto de enzimas fibrolíticas produzido pelo fungo *Trichoderma reesei* utilizando palha de cana-de-açúcar como substrato

Atividade enzimática* (UI mL ⁻¹ do EEF)	Endoglucanase**	Exoglucanase**	Xilanase***
	4,6	0,02	94,3

EEF = extrato de enzimas fibrolíticas; UI = unidades internacionais ($\mu\text{mol min}^{-1}$).

* Atividade enzimática determinada a 39°C e pH 6,6. ** $\mu\text{mol de glicose min}^{-1} \text{ mL}^{-1}$ liberado da carboximetilcelulose sódica e sigmacell microcristalina, respectivamente para endoglucanase e exoglucanase.

*** = $\mu\text{mol de xilose min}^{-1} \text{ mL}^{-1}$ liberado do xilano obtido de madeira de Faia.

5.2.3 Animais e delineamento experimental

Os animais utilizados no experimento eram descendentes de fêmeas Santa Inês que compunham o plantel do Laboratório de Nutrição Animal. Do nascimento até o início do experimento, os filhotes foram mantidos confinados para evitar infecções parasitárias. Para condução do experimento, foram utilizados 19 ovinos em crescimento, sendo dez machos castrados e nove fêmeas não castradas, com peso corporal médio de $15 \pm 1,96$ kg e idade média de $81 \pm 7,8$ dias.

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso com dois tratamentos (controle e enzima) e nove repetições para o grupo controle (CTL – n = 9) e dez repetições para o grupo enzima (ENZ – n = 10), considerando o sexo dos animais como bloco.

5.2.4 Manejo e tratamentos

Os animais foram mantidos em baias individuais (150 cm x 110 cm) cobertas com livre acesso a água fresca e sal mineral sendo a dieta fornecida em duas refeições diárias em proporções iguais (50:50 p/p) as 8:30 horas e as 16:30 horas. A dieta (Tabela 5.2) era composta de 70% de feno de Tifton-85 (*Cynodon* spp.) e 30% de mistura concentrada (70% farelo de soja e 30% de milho) formulada seguindo as recomendações do NRC (2007). O feno e o concentrado foram ofertados em cochos separados, sendo fornecido primeiramente o concentrado e posteriormente o feno. A dieta foi fornecida à vontade sendo ajustada quando as sobras eram inferiores a 10%.

O feno de Tifton-85 foi picado utilizando triturador de feno (Charger 15.0 – Menxon Máquinas Agrícolas, Cajuru – SP, Brasil) em partículas com 3 cm e o milho foi moído utilizando um triturador (Nogueira DPM2 – Nogueira S/A Máquinas Agrícolas, São João da Boa Vista – SP, Brasil). O milho triturado e o farelo de soja foram misturados com auxílio de um misturador com capacidade de 500 kg (M.A.P. Equipamentos

Agropecuários e Industriais Ltda., Londrina – PR, Brasil) por 15 minutos e armazenados em bombonas plásticas de 100 L em local seco e sem exposição solar.

Tabela 5.2 - Composição bromatológica (g kg^{-1} MS) dos ingredientes que compuseram a dieta experimental utilizadas nos ensaios de desempenho animal e produção de metano entérico

Composição Bromatológica	Feno Tifton-85	Concentrado*
MS	856	900
MO	942	945
EE	14	29
PB	53	421
MM	58	55
FDN	819	364
FDA	521	199
Lignina	108	56
Hemicelulose**	298	164
Celulose**	413	172
EB (kcal g^{-1} MS)	4,31	4,62

MS = matéria seca; MO = matéria orgânica; EE = extrato etéreo; PB = proteína bruta; MM = matéria mineral; FDN = fibra em detergente neutro; FDA = fibra em detergente ácido; EB = energia bruta.

* Concentrado composto por 70% de farelo de soja e 30% de milho.

** Hemicelulose calculada pela diferença entre FDN e FDA; Celulose calculada pela diferença entre FDA e lignina (SNIFFEN et al., 1992).

Os animais foram divididos em dois grupos experimentais: grupo controle (CTL), composto por nove animais, sendo cinco machos e quatro fêmeas; grupo enzima (ENZ), composto por dez animais, sendo cinco machos e cinco fêmeas. O experimento teve duração de 73 dias, sendo 15 dias de adaptação dos animais a dieta e ao manejo, 45 dias de ensaio de desempenho animal, sete dias de ensaio de Metabolismo animal (digestibilidade aparente dos nutrientes – Capítulo 4) e seis dias para quantificação de CH_4 entérico utilizando câmaras de respiração semiabertas.

O EEF foi aplicado 24 horas antes do fornecimento da refeição com dosagem de $0,04 \text{ mL g}^{-1}$ matéria fresca, diluído em água destilada para completar o volume aplicado de $0,15 \text{ mL g}^{-1}$ matéria fresca (MF). O mesmo procedimento foi realizado com a dieta dos animais controle, onde foi aplicado $0,15 \text{ mL g}^{-1}$ MF de água destilada. A aplicação do EEF e da água destilada ocorreu de forma manual, com auxílio de seringas de 5 mL, 10 mL e 20 mL (Becton-Dickson Indústria Cirúrgica, Curitiba – PR, Brasil) para obtenção dos volumes desejados de EEF e água destilada, colocados dentro de pulverizadores de bico spray e borrifados diretamente sobre o feno pesado dentro de sacos plásticos com identificação individual por animal e misturados manualmente até completa homogeneização.

A quantidade de cada ingrediente utilizado para formulação da dieta experimental assim como sua composição bromatológica 24 horas após a adição de água destilada e EEF estão apresentados na Tabela 5.3.

Tabela 5.3 - Descrição dos ingredientes e composição bromatológica das dietas experimentais 24 horas após a adição da água destilada e do extrato de enzimas fibrolíticas

Itens	Dietas Experimentais	
	Grupo Controle (CTL)	Grupo Enzima (ENZ)
Feno Tifton-85 (%)	70	70
Milho triturado (%)	10	10
Farelo de soja (%)	20	20
EEF (mL g ⁻¹ MF)	-	0,04
H ₂ O (mL g ⁻¹ MF)	0,15	0,11
Total (%)	100	100
Composição bromatológica (g kg⁻¹ MS)		
MS	926	923
MO	939	939
EE	15	14
PB	144	144
MM	61	61
FDN	662	669
FDA	423	427
Lignina	96	93
Hemicelulose*	239	241
Celulose*	327	334
EB (kcal g ⁻¹ MS)	4,33	4,32

EEF = extrato de enzimas fibrolíticas; MF = matéria fresca; H₂O = água destilada; MS = matéria seca a 105°C; MO = matéria orgânica; EE = extrato etéreo; PB = proteína bruta; MM = matéria mineral; FDN = fibra em detergente neutro; FDA = fibra em detergente ácido; EB = energia bruta.

* Hemicelulose calculada pela diferença entre FDN e FDA; Celulose calculada pela diferença entre FDA e LDA (SNIFFEN et al., 1992).

5.2.5 Ensaio de desempenho animal

O ensaio de desempenho animal teve duração de 60 dias, sendo 15 dias de adaptação dos animais ao manejo e às dietas e 45 dias experimentais. As baias dos animais ficaram mantidas em local coberto com laterais providas de cortinas de lona permitindo a exposição matinal dos animais a luz solar (Figura 5.1). A temperatura média durante o período experimental foi de $23 \pm 4,9^\circ\text{C}$, com temperatura mínima média de $19 \pm 2,1^\circ\text{C}$ e temperatura máxima média de $27 \pm 2,5^\circ\text{C}$.

Figura 5.1 – Salão onde foram mantidas as baias individuais utilizadas no decorrer dos 60 dias de alojamento dos animais experimentais



Para determinação do ganho de peso total (GPT) durante o experimento e cálculo do ganho médio diário de peso (GMDP), os animais foram pesados no primeiro (D1) e no último dia do período experimental (D45) além de serem realizadas pesagens semanais para acompanhar a evolução do ganho de peso corporal. Os animais eram pesados pela manhã, antes do fornecimento da primeira refeição diária. Foi calculado o percentual médio de ganho de peso (% MGP) dos animais através da equação:

$$\% \text{ MGP} = (\text{PVF} - \text{PVI}) / \text{PVI} \times 100 \quad (11)$$

PVF = peso vivo final (kg); PVI = peso vivo inicial (kg).

Diariamente, as sobras da dieta ofertada do dia anterior eram retiradas e pesadas, antes do fornecimento da refeição matinal, para determinação do consumo diário de matéria seca (CDMS) e consumo total de matéria seca (CTMS) ao final do período experimental. Três vezes por semana, amostras das sobras de cada animal eram amostradas para compor um *pool* de sobras referente àquela semana, sendo armazenadas em freezer a -20°C até posterior análise bromatológica. Foi calculado a conversão alimentar (CA), através da relação entre o CTMS e o GPT.

Durante o período experimental, foi mensurado o consumo de água utilizando baldes graduados. Foram fornecidos diariamente cinco litros de água, sendo mensuradas as sobras no dia seguinte antes do fornecimento da primeira refeição diária.

Duas vezes por semana eram preparadas amostras de 25 gramas de feno fornecido para o grupo CTL (com adição de 3,75 mL de água destilada) e 25 gramas de feno fornecido para o grupo ENZ (com adição de 1,0 mL de EEF + 2,75 mL de água destilada), durante as oito semanas de período experimental. Da mesma forma, o feno utilizado (sem adição de água e EEF) e o concentrado ofertado foram amostrados duas vezes por semana. Todas as amostras foram armazenadas em freezer a -20°C para posterior avaliação bromatológica da dieta ofertada (dieta total) e do feno e concentrado ofertados.

Ao término do experimento, as amostras foram descongeladas, pesadas e secas em estufa de circulação forçada de ar (MA 037 – Marconi, Piracicaba – SP, Brasil) a 55°C até peso constante. Posteriormente, as amostras foram moídas em moinho tipo Wiley (Marconi, Piracicaba – SP, Brasil) com peneira com crivo de 1 mm. Todas as amostras coletadas no decorrer do período experimental foram submetidas a análise bromatológica para determinação da matéria seca (MS), matéria mineral (MM), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB) e extrato etéreo (EE) seguindo a metodologia da AOAC (2011) e FDN, FDA e lignina de acordo com Van Soest, Robertson e Lewis (1991) adaptado por Mertens (2002).

A energia bruta dos ingredientes da dieta e das dietas experimentais foram determinados após a combustão das amostras em bomba calorimétrica (6200 - Parr Instrument Company, Moline – IL, USA).

5.2.6 Avaliação da morfometria e escore de condição corporal

No dia D1, após a pesagem dos animais, foi realizada avaliação corporal através das mensurações de comprimento corporal (CC), altura de cernelha (AC), altura de garupa (AG), largura de garupa (LG), perímetro torácico (PT), perímetro abdominal (PA) e escore de condição corporal (ECC).

As mensurações foram realizadas a cada 15 dias após a pesagem dos animais utilizando fita métrica (cm) e sempre feita pelo mesmo avaliador. Os animais foram mantidos em posição correta de aprumos em piso reto e de cimento, sendo as medidas realizadas sempre pelo lado direito do animal. As medidas foram realizadas da seguinte forma: CC = distância (em linha reta) entre o início da escápula e a tuberosidade coxal do íleo; AC = distância entre o solo e o ponto mais alto da região interescapular; AG = distância entre a tuberosidade sacral do íleo e o solo; LG = distância entre as duas tuberosidades coxais; PT = medida da circunferência da cavidade torácica; PA = medida da circunferência passando pela linha da cicatriz umbilical. A escala do ECC variou entre 1 a 5 pontos com intervalos de 0,25, onde 1 representa animais muito magros e 5 animais obesos.

5.2.7 Parâmetros hematológicos e bioquímicos

No último dia do ensaio de desempenho animal (D45), após pesagem e mensuração corporal, foi colhido sangue dos animais para avaliação hematológica e bioquímica. A colheita de sangue procedeu-se através de punção da veia jugular utilizando tubos a vácuo (Becton-Dickson Indústria Cirúrgica, Curitiba – PR, Brasil) com EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) para determinação dos glóbulos brancos (GB), glóbulos vermelhos (GV) e plaquetas e tubos sem anticoagulante para determinação dos parâmetros glicose, proteínas totais (ProT), aspartato aminotransferase (AST), ureia e creatinina.

A avaliação hematológica foi determinada com o uso de um analisador automático (pocH-100iV Diff). O sangue colhido nos tubos sem anticoagulante foi centrifugado a 2000 x g por dez minutos a 4°C (IEC Centra-7R - Thermo Scientific IEC, USA) para obtenção do soro sanguíneo. O sobrenadante obtido após centrifugação foi pipetado e armazenados em tubos tipo eppendorf até realização das análises com o uso de kits comerciais Labtest® e leitura em espectrofotômetro (JENWAY 7315 – Cole-Parmer, UK) seguindo as recomendações do fabricante.

5.2.8 Quantificação das emissões de metano entérico

A quantificação das emissões de CH₄ entérico ocorreu após o término do ensaio de metabolismo animal utilizando câmaras de respiração seguindo a metodologia descrita por Abdalla et al. (2012).

Dez gaiolas metálicas (157 x 71 x 167 cm – volume 1,9 m³) semiabertas foram utilizadas para realização do ensaio. Os animais foram separados em dois lotes, o primeiro com dez animais e o segundo com nove animais, totalizando seis dias de ensaio, sendo um dia para adaptação dos animais e posterior dois dias de amostragem dos gases para cada lote de animais, sendo que cada lote de animal permaneceu por 44 horas em período de coleta de gases.

A temperatura média durante o período de amostragem foi de 26,0 ± 2,5°C e umidade média de 76,6 ± 7,4 %, ambas observadas no interior das gaiolas, medido com termômetro digital interno, assim como as mensurações de fluxo de saída de ar medido com anemômetro, foram mensuradas em seis horários diferentes no decorrer das 22 horas por ciclo de amostragem (7h, 9:40h, 12h, 15:30h, 18h e 21h).

As gaiolas eram conectadas por tubulações a uma bomba de exaustão permitindo a remoção dos gases do interior das gaiolas com fluxo de 202 L min⁻¹ mensurado com auxílio de um anemômetro (AD-250 Digital – Instrutherm, São Paulo - SP, Brasil). Os gases retirados

de dentro das gaiolas foram amostrados por 22 horas (início as 9:30 horas e término as 7:30 horas do dia seguinte) em balões metalizados de sete litros através de uma bomba peristáltica. Ao final de cada coleta, 10 mL dos gases presentes dentro de cada balão foram amostrados em triplicata, após homogeneização, com seringa de 20 mL e armazenados em tubos a vácuo de 10 mL.

Os tubos com os gases amostrados foram levados para o laboratório para análise da concentração de CH₄ entérico por cromatografia gasosa (GC-2010, Shimadzu, Tokio, Japão) utilizando detector por ionização de chama (FID) com coluna micro empacotada Shincarbon ST 100/120, mantendo a temperatura da coluna a 60°C, temperatura do injetor a 200°C e temperatura do detector a 240°C. O gás de arraste utilizado foi o gás hélio com fluxo constante de 10 mL min⁻¹. O CH₄ foi calculado após determinação da curva de calibração nas concentrações de 0, 30, 90 e 120 mL L⁻¹ de gás CH₄ com 99,5% de pureza (99,5% de pureza – White Martins Indústria de Gases, Osasco – SP, Brasil).

5.2.9 Análise estatística

Os dados foram submetidos a ANOVA utilizando procedimento MIXED do software SAS v. 9.4 (Statistical Analysis System Inst., Cary – NC, USA). Os parâmetros GMDP, % MGPA, morfometria corporal e escore de condição corporal foram avaliados como médias repetidas no tempo para avaliação do efeito de tratamento, dia e a interação tratamento x dia. Para os demais parâmetros foram considerados como efeitos fixos o tratamento, o sexo e a interação entre tratamento e sexo. As médias foram comparadas pelo teste t com 5% de significância.

5.3 Resultados

5.3.1 Desempenho animal

Os dados de desempenho animal estão apresentados na Tabela 5.4. Não foi observado diferença ($P > 0,05$) sobre os parâmetros CDMS, CTMS, consumo de H₂O, peso inicial e final, GMDP, GTP e CA de ovinos suplementados ou não com EEF. No caso do % MGP, verificou-se que os animais do grupo ENZ apresentaram um percentual de ganho de peso maior ($P < 0,01$) que os animais do grupo CTL.

Foi testado efeito de interação entre tratamento e sexo sobre os parâmetros analisados (Tabela 5.4) observando-se diferença significativa apenas para % MGP, onde os animais machos do grupo ENZ apresentaram maior ($P < 0,001$) média quando comparados com os animais machos do grupo CTL. As fêmeas do grupo CTL e ENZ não apresentaram diferenças ($P > 0,05$) sobre o % MGP.

Tabela 5.4 – Consumo de matéria seca, consumo de água e desempenho de ovinos suplementados ou não com extrato de enzimas fibrolíticas

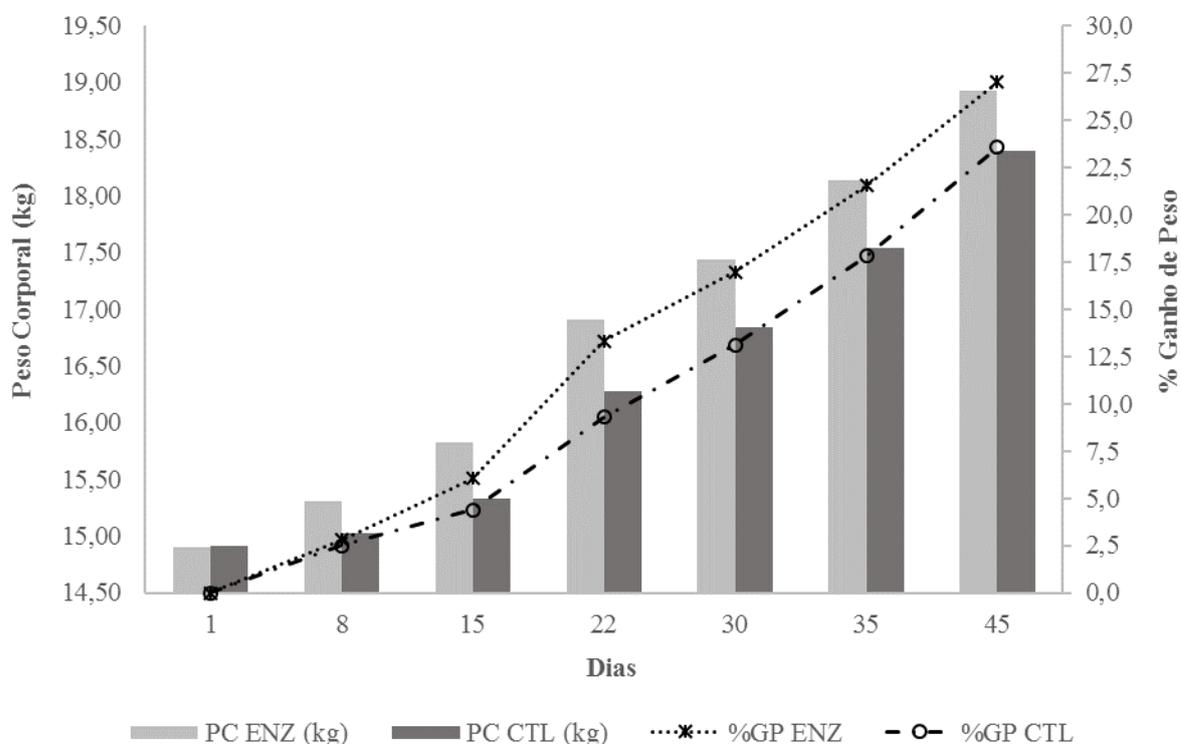
Parâmetros	Tratamentos		E.P.M.	Valor de P		
	CTL	ENZ		Trat.	Sexo	T x S
CDMS (g MS dia ⁻¹)	465,0	484,0	51,68	0,6003	0,0761	0,5024
CTMS (kg MS)	20,9	21,8	2,32	0,5991	0,0760	0,5060
Consumo H ₂ O (mL)	1153	1320	195,84	0,2344	0,4073	0,4990
Peso Inicial (kg)	14,8	14,9	1,33	0,9497	0,1294	0,9818
Peso Final (kg)	18,3	18,9	1,67	0,6016	0,1452	0,7263
GMDP (g dia ⁻¹)	77,3	89,6	14,27	0,2295	0,5174	0,3937
GTP (kg)	3,5	4,0	0,64	0,2296	0,5173	0,3936
% MGP	11,6 ^b	14,6 ^a	3,63	0,0025	0,9997	0,0331
CA	6,3	5,5	0,83	0,1672	0,2640	0,3578

CTL = grupo controle; ENZ = grupo enzima; CDMS = consumo diário de matéria seca (feno + concentrado); CTMS = consumo total de matéria seca (feno + concentrado); GMDP = ganho médio diário de peso; GTP = ganho total de peso; % MGP = percentual médio de ganho de peso; CA = conversão alimentar; E.P.M. = erro padrão da média; Trat. = efeito fixo de tratamento; Sexo = efeito fixo de sexo; T x S = efeito de interação entre tratamento e sexo.

Médias com letras sobrescritas diferentes na mesma linha diferem pelo teste t a 5% de significância.

Não foi observado efeito de tratamento sobre a evolução do peso corporal (Figura 5.2) dos animais no decorrer do período experimental. Como esperado, foi observado efeito de dia ($P < 0,0001$) sobre o peso corporal dos animais e efeito de sexo ($P < 0,0001$), onde os animais machos apresentaram maior peso corporal do que as fêmeas (17,3 vs 15,7, respectivamente). Foi testado efeito de interação entre tratamento e dia (T x D) e tratamento e sexo (T x S) para a variável peso corporal nos animais suplementados ou não com o EEF, para verificar se ocorreram diferenças no decorrer dos 45 dias experimentais, no entanto, nenhum efeito ($P > 0,05$) foi observado.

Figura 5.2 – Evolução do peso corporal (PC) e percentual de ganho de peso (%GP) de ovinos suplementados (ENZ) ou não (CTL) com extrato de enzimas fibrolíticas exógenas



5.3.2 Morfometria corporal e escore de condição corporal

As médias dos parâmetros morfométricos e ECC entre os tratamentos, dia e interação tratamento e dia estão apresentados na Tabela 5.5. Não foi verificado efeito da suplementação com o EEF sobre os parâmetros ECC, AC, AG, CC, LG e PA, contudo, os animais do grupo ENZ apresentaram maior ($P < 0,05$) PT aos 30 dias do período experimental quando comparado com os animais controle. Observou-se efeito de dia ($P < 0,05$) sobre os parâmetros AG, CC, LG, PT e PA, mas sem diferenças para ECC e AG. Não foi verificado efeito de interação ($P > 0,05$) entre tratamento e dia.

A comparação das médias para efeito de sexo e interação tratamento e sexo não são demonstradas. No entanto, não foi observado efeito de sexo ($P > 0,05$) sobre os parâmetros ECC, AC, AG e LG. Para os demais parâmetros, observou-se efeito sobre o CC (48,8 vs 47,2 cm – $P < 0,05$), o PT (63,3 vs 61,1 cm – $P < 0,001$) e o PA (78,2 vs 75,5 cm – $P < 0,01$), respectivamente para machos e fêmeas, entretanto nenhum efeito de interação ($P > 0,05$) foi observado entre os animais experimentais.

Tabela 5.5 – Escore de condição corporal e morfometria corporal de ovinos suplementados ou não com extrato de enzimas fibrolíticas

Parâmetros	Tratamentos								E.P.M.	Valor de P		
	CTL				ENZ					Trat.	Dia	T x D
	1	15	30	45	1	15	30	45				
ECC	2,80	2,80	2,88	2,77	2,68	2,90	2,78	2,82	0,12	0,7564	0,7564	0,6636
AC (cm)	53,4	53,5	53,9	54,1	53,1	53,3	53,4	54,3	1,18	0,7348	0,7291	0,9799
AG (cm)	55,1	55,3	56,0	56,7	53,7	54,5	55,7	57,0	0,92	0,3835	0,0356	0,7779
CC (cm)	46,0	46,4	47,3	49,6	47,2	47,4	48,1	51,2	1,45	0,1404	0,0014	0,9809
LG (cm)	17,4	17,8	17,8	18,5	16,6	17,6	17,7	18,4	0,41	0,1862	0,0014	0,7511
PT (cm)	59,8	60,8	61,6 ^b	63,4	60,7	61,8	64,4 ^a	64,8	1,42	0,0191	0,0003	0,6937
PA (cm)	71,5	73,6	79,2	79,9	73,0	76,8	79,8	80,3	1,90	0,1178	0,0001	0,6911

CTL = grupo controle; ENZ = grupo enzima; ECC = escore de condição corporal; AC = altura de cernelha; AG = altura de garupa; CC = comprimento corporal; LG = largura de garupa; PT = perímetro torácico; PA = perímetro abdominal; E.P.M. = erro padrão da média; Trat. = efeito fixo de tratamento; Dia = efeito fixo de dia; T x D = efeito de interação entre tratamento e dia.

Médias com letras sobrescritas diferentes na mesma linha dentro de cada dia diferem pelo teste t a 5% de significância.

5.3.3 Parâmetros hematológicos e bioquímicos

Os parâmetros hematológicos GB, GV e plaquetas estão apresentados na Tabela 5.6. Não foram observados efeitos de tratamento, sexo e interação tratamento e sexo ($P > 0,05$) com o uso do EEF sobre as células sanguíneas quando comparado com os animais controle.

Tabela 5.6 – Parâmetros hematológicos de ovinos suplementados ou não com extrato de enzimas fibrolíticas

Parâmetros	Tratamentos		Ref.*	E.P.M.	Valor de P		
	CTL	ENZ			Trat.	Sexo	T x S
GB ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$)	8,63	7,73	4 - 12	0,57	0,2677	0,1017	0,5143
GV ($\times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$)	12,60	12,86	8 - 16	0,33	0,5739	0,3833	0,9696
Plaquetas ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$)	459,40	532,98	300 - 800	66,43	0,4466	0,8494	0,9281

GB = glóbulos brancos; GV = glóbulos vermelhos; CTL = grupo controle; ENZ = grupo enzima; E.P.M. = erro padrão da média; Trat. = efeito fixo de tratamento; Dia = efeito fixo de dia; T x D = efeito de interação entre tratamento e dia.

* Ref. - Valores de referência segundo Meyer e Harvey (2004).

Médias comparadas pelo teste t a 5% de significância.

Os resultados bioquímicos estão apresentados na Tabela 5.7. Não foi verificado diferença significativa entre os tratamentos sobre os parâmetros glicose, ProT, ureia e creatinina. Entretanto, foi observado redução ($P < 0,05$) no parâmetro AST nos animais suplementados com o EEF. Não foi observado efeito de sexo ($P > 0,05$) e interação tratamento e sexo.

Tabela 5.7 – Parâmetros bioquímicos de ovinos suplementados ou não com extrato de enzimas fibrolíticas

Parâmetros	Tratamentos		Ref.*	E.P.M.	Valor de P		
	CTL	ENZ			Trat.	Sexo	T x S
Glicose (mL dL^{-1})	67,58	75,78	50 -80	9,83	0,2319	0,9453	0,4890
ProT (g dL^{-1})	6,06	6,30	6 - 7,9	0,68	0,6002	0,8953	0,5834
AST (U L^{-1})	118,76 ^a	92,61 ^b	60 – 280	15,63	0,0203	0,6691	0,1019
Ureia (mg dL^{-1})	41,60	39,24	17,1 – 42,8	4,07	0,4063	0,1872	0,1356
Creatinina (mg dL^{-1})	1,18	1,17	1,2 – 1,9	0,16	0,9543	0,1739	0,6317

ProT = proteínas totais; AST = aspartato aminotransferase; CTL = grupo controle; ENZ = grupo enzima; E.P.M. = erro padrão da média; Trat. = efeito fixo de tratamento; Dia = efeito fixo de dia; T x D = efeito de interação entre tratamento e dia.

* Ref. - Valores de referência segundo Meyer e Harvey (2004).

Médias seguidas de letras sobrescritas diferentes na mesma linha diferem pelo teste t a 5% de significância.

5.3.4 Quantificação de metano entérico

As médias dos parâmetros analisados no decorrer do ensaio de produção de CH₄ entérico com o uso das câmaras de respiração estão apresentadas na Tabela 5.8. Não foi observado ($P > 0,05$) efeito sobre a quantidade de matéria seca ingerida (MSI) entre os tratamentos. Entretanto, a produção de CH₄ entérico por kg de MSI dos animais do grupo ENZ foi significativamente menor do que os animais do grupo CTL. Além disso, os animais suplementados com o EFF apresentaram tendência ($P = 0,09$) em produzir menor quantidade de CH₄ entérico por kg de ganho médio diário de peso quando comparados com os animais sem suplementação. Não foram observados efeitos ($P > 0,05$) de sexo e interação entre tratamento e sexo sobre a produção de CH₄ entérico dos animais.

Tabela 5.8 – Produção de metano entérico de ovinos suplementados ou não com extrato de enzimas fibrolíticas

Parâmetros	Tratamentos		E.P.M.	Valor de P		
	CTL	ENZ		Trat.	Sexo	T x S
MSI (g MS dia ⁻¹)	474,9	527,0	29,95	0,2245	0,3673	0,5449
CH ₄ (L kg MSI ⁻¹)	36,8 ^a	28,1 ^b	2,36	0,0169	0,6269	0,1155
CH ₄ (L kg GMDP ⁻¹)	240,9	169,8	28,81	0,0927	0,9146	0,2731

MSI = matéria seca ingerida; MS = matéria seca; CH₄ = metano entérico; GMDP = ganho médio diário de peso; CTL = grupo controle; ENZ = grupo enzima; E.P.M. = erro padrão da média; Trat. = efeito fixo de tratamento; Sexo = efeito fixo de sexo; T x S = efeito de interação entre tratamento e sexo.

Médias com letras sobresscritas diferentes na mesma linha diferem pelo teste t a 5% de significância.

5.4 Discussão

O consumo de matéria seca (CMS) não diferiu entre os animais experimentais. Estudos sugerem que a adição de enzimas fibrolíticas exógenas possam promover aumento no CMS decorrente do aumento da digestibilidade dos nutrientes proporcionando maior fluxo de saída do alimento e estimulando o consumo (ROMERO et al., 2015). Segundo Tirado-González et al. (2018), as respostas da adição das enzimas sobre o CMS são dependentes do tipo da dieta utilizada e da espécie animal, ou mesmo da concentração de enzima aplicada sobre o substrato (VALLEJO et al., 2016).

Pesquisas relataram aumentos no GMDP de bovinos (BEAUCHEMIN; RODE; SEWALT, 1995; SALEM et al., 2013), caprinos (YUANGKLANG et al., 2017; SONG et al., 2018) e ovinos (GADO et al., 2011; VALDES et al., 2015). Apesar dos animais do grupo ENZ apresentarem ganho de peso maior quando comparado com os animais CTL, essa diferença não foi significativa, concordando com resultados de outros estudos

(ABOAGYE et al., 2015; HE et al., 2015a, 2015b). No entanto, o % MGP dos animais suplementados com o EEF foi maior, indicando melhor aproveitamento dos nutrientes da dieta, como demonstrado no Capítulo 4 dessa Tese, onde os animais suplementados com o EEF apresentaram maior digestibilidade da FDA.

Beauchemin, Rode e Sewalt (1995) testaram doses crescentes de enzimas fibrolíticas na dieta de bovinos confinados recebendo três substratos como volumoso. Os pesquisadores relataram aumento no GMDP dos animais suplementados com a adição das enzimas fibrolíticas em dois dos três substratos utilizados, atribuindo esse incremento ao aumento na digestibilidade da FDA para o feno de alfafa e aumento no CMS para o feno de capim Timothy (*Phleum pratense*). He et al. (2015a) observaram tendência de redução no CMS de bovinos confinados, contudo, sem diminuir o peso corporal ou o GMDP, sugerindo um pequeno incremento na digestibilidade da MS pelas enzimas fibrolíticas.

A redução na CA alimentar observada nos animais suplementados com o EEF é de grande importância, uma vez que esse resultado demonstra que o animal foi mais eficiente em converter os nutrientes ingeridos em proteína animal necessitando consumir menores quantidades de alimento para ganharem a mesma quantidade de peso que os animais não suplementados. Dessa forma, melhores respostas sobre esse parâmetro, apesar de não significativos, apresentam importância econômica (BEAUCHEMIN; RODE; SEWALT, 1995) decorrente do aumento na produtividade animal.

Tirado-González et al. (2018) publicaram uma meta-análise avaliando o efeito da adição de enzimas fibrolíticas em dois tipos de dietas experimentais (> 50% volumoso e < 50% volumoso) para ovinos, relatando que o uso de enzimas fibrolíticas na dieta de ovinos não apresentaram resultados positivos sobre o GMDP e CA. Meale et al. (2014) avaliaram estudos publicados com a utilização de pequenos ruminantes suplementados com enzimas fibrolíticas. Os autores concluíram que a adição de enzimas fibrolíticas na dieta de ovinos e caprinos normalmente proporciona respostas mínimas sobre o desempenho dos animais, como verificado no presente estudo. Como vários estudos na literatura reportaram resultados positivos sobre o GMDP e CA (SALEM et al., 2013; VALDES et al., 2015; YUANGKLANG et al., 2017; SONG et al., 2018), a condução de experimentos mais longos e com maior número de animais pode resultar em melhores respostas sobre os GMDP e CA de ovinos em crescimento suplementados com o EEF.

As medidas morfométricas foram realizadas no decorrer do experimento para se obter um parâmetro a mais sobre o desenvolvimento dos animais e verificar se a adição do EEF causaria mudanças nas mensurações corpóreas decorrente do maior ganho de peso dos

animais. A falta de significância sobre o ganho de peso corporal pode ter impactado sobre os resultados morfométricos. No entanto, foi observado que os animais suplementados com o EEF apresentaram maior perímetro torácico ao trigésimo dia do período experimental, podendo essa variação estar relacionada ao maior peso corporal desses animais devido ao perímetro torácico ter uma alta correlação com o peso vivo (SOWANDE; SOBOLA, 2008), entretanto, nenhuma diferença entre o peso corporal dos animais experimentais foi observada, apesar dos animais suplementados com o EEF apresentarem pesos corpóreos numericamente superiores aos animais CTL. Ademais, alguns parâmetros morfométricos foram superiores nos animais machos quando comparado com as fêmeas como demonstrado na literatura (COSTA JÚNIOR et al., 2006).

Não foi observado diferenças nos perfis hematológico e bioquímico dos animais experimentais, demonstrando que a saúde dos animais não foi afetada pela adição do EEF. Por se tratar de uma mistura enzimática nova, nunca utilizada em dietas para animais, havia a necessidade de avaliação da saúde dos animais para verificar aspectos relacionados a toxicidade, que poderia prejudicar os processos fermentativos ruminais e o desenvolvimento dos animais.

Os resultados encontrados para os parâmetros proteínas totais e AST indicam bom funcionamento do tecido hepático dos animais. Apesar dos animais CTL terem apresentado valores significativamente maiores de AST quando comparado aos animais ENZ, os resultados encontrados permaneceram dentro dos valores de referência (MEYER; HARVEY, 2004), não indicando danos sobre esse tecido. Da mesma forma, os valores normais de ureia e creatinina demonstram que a atividade renal não foi influenciada pela adição do EEF.

A adição do EEF na dieta influenciou a produção de CH₄ entérico por kg MSI, proporcionando menores produções nos animais suplementados com o EEF. Estudos propuseram que a adição de enzimas fibrolíticas pode ser uma estratégia de mitigação de CH₄ entérico (BEAUCHEMIN et al., 2008). Alterações nas proporções dos AGCC com redução de acetado e com aumento ou manutenção da concentração de propionato resultam na redução da relação acetato:propionato (EUN; BEAUCHEMIN, 2007; GIRALDO et al., 2008; ARRIOLA et al., 2011), considerado um dos mecanismos primários para redução nas produções de CH₄ entérico (BEAUCHEMIN et al., 2008; GRAINGER; BEAUCHEMIN, 2011).

Contudo, no presente estudo não foi observado alterações nas proporções dos AGCC e na relação acetato:propionato, como demonstrado no Capítulo 4 (capítulo anterior). Além disso, apesar de não significativo, verificou-se um aumento numérico sobre a produção de acetato nos animais suplementados com o EEF, provavelmente decorrente da maior

fermentação e digestibilidade da FDA (Capítulo 4), que resulta em maior produção de hidrogênio (H_2) no ambiente ruminal (SOLTAN et al., 2013; GEMEDA; HASSEN, 2015). O H_2 é um dos substratos utilizados pelas bactérias metanogênicas para reduzir o dióxido de carbono (CO_2) através de processos sucessivos até a formação do CH_4 (QIAO; TAN; WANG, 2014). Esse processo de produção de CH_4 pela redução do CO_2 pelo H_2 é considerado um dos mecanismos de remoção de H_2 do ambiente ruminal (HILL et al., 2016), tornando-se necessário para manter o pH dentro dos valores ideais para evitar acidose e cessação dos processos fermentativos (ØRSKOV, 1994). Nesse sentido, a maior fermentação e digestibilidade da FDA poderia resultar em maior produção de CH_4 e não sua redução.

Dessa forma, os resultados encontrados nesse estudo podem estar relacionados a alterações nas populações de bactérias metanogênicas (ZHOU et al., 2011) ou no fluxo de saída da digesta do rúmen (GUYADER et al., 2016; JANSSEN, 2010) com o uso do EEF, apesar desses fatores não terem sido determinados. Zhou et al. (2011) testaram a influência da adição de enzimas fibrolíticas exógenas na dieta de vacas em lactação sobre a população de bactérias metanogênicas através de estudo moleculares. Os pesquisadores observaram aumento na produção de CH_4 entérico com a adição de enzimas fibrolíticas e alterações na estrutura das comunidades metanogênicas, porém sem afetar a densidade total dessas bactérias. Além disso, os autores sugeriram futuras avaliações utilizando metodologias para determinação de genes envolvidos no metabolismo do CH_4 para que se consigam associar a utilização de enzimas fibrolíticas e a produção de CH_4 .

Estudos analisaram a microbiota de ovinos através de análises de metagenômica e metatranscriptômica após mensuração da quantidade de CH_4 produzido pelos animais, verificando que a transcrição dos genes envolvidos na via da metanogênese foi aumentada nos animais com maior produção de CH_4 . Os pesquisadores sugeriram que essa alteração na transcrição dos genes possa ter sido mediada pelo substrato através de diferentes tempos de retenção das partículas alimentares no rúmen (SHI et al., 2014). Nesse contexto, a avaliação da microbiota ruminal de ovinos suplementados com enzimas fibrolíticas através de análises de metagenômica e metatranscriptômica podem explicar os achados do presente estudo.

Janssen (2010) revisou diversos estudos sobre a influência da taxa de passagem na produção de CH_4 entérico, associando a menor produção a maior taxa de passagem do alimento pelo rúmen. Ademais, esse pesquisador aliou o aumento na taxa de passagem ao aumento na digestibilidade do alimento, estando associada a menor produção de CH_4 por unidade de alimento digerido. Assim, a menor produção de CH_4 pelos animais suplementados com o EEF pode estar relacionado ao aumento na digestibilidade da FDA proporcionado pelo

EEF, como demonstrado no capítulo anterior, propiciando maior fluxo de saída da digesta do rúmen e reduzindo a produção de CH₄.

Complementando os resultados observados sobre a produção de CH₄, pode-se associar o aumento no percentual médio de ganho de peso à redução na quantidade de CH₄ entérico produzido com a adição do EEF, resultando em menor perda energética e maior eficiência de uso da energia oriunda da dieta para os processos metabólicos do animal e, conseqüentemente, maior produtividade (QIAO; TAN; WANG, 2014).

5.5 Conclusão

Conclui-se que o EEF resultou em aumento no percentual médio de ganho de peso dos animais suplementados, podendo ser uma alternativa para incremento na produtividade de animais alimentados com forragens que apresentam baixa qualidade, além de apresentar potencial de redução nas emissões de CH₄ entérico oriundos dos processos fermentativos ruminais, garantindo menores impactos ambientais causados pela cadeia de produção de ruminantes. Além disso, os exames hematológicos e bioquímicos demonstraram que o EEF não apresentou nenhum efeito prejudicial à saúde dos animais, permitindo sua utilização na nutrição animal.

Referências

ABDALLA, A. L. et al. In vitro evaluation, in vivo quantification, and microbial diversity studies of nutritional strategies for reducing enteric methane production. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v. 44, n. 5, p. 953–964, 2012.

ABOAGYE, I. A. et al. Digestibility and growth performance of sheep fed alfalfa hay treated with fibrolytic enzymes and a ferulic acid esterase producing bacterial additive. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 203, p. 53–66, 2015.

ARRIOLA, K. G. et al. Effect of fibrolytic enzyme application to low- and high-concentrate diets on the performance of lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 94, n. 2, p. 832–841, 2011.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 18. 4 ed. Arlington: AOAC International, 2011.

BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 23, n. 3, p. 257–270, 1992.

BEAUCHEMIN, K. A. et al. Nutritional management for enteric methane abatement: a review. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Victoria, v. 48, n. 2, p. 21, 2008.

BEAUCHEMIN, K. A.; RODE, L. M.; SEWALT, V. J. H. Fibrolytic enzymes increase fiber digestibility and growth rate of steers fed dry forages. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 75, n. 4, p. 641–644, 1995.

CERRI, C. C. et al. Assessing the carbon footprint of beef cattle in Brazil: a case study with 22 farms in the State of Mato Grosso. **Journal of Cleaner Production**, Oxford, v. 112, p. 2593–2600, 2016.

CHUNG, Y.-H. et al. A fibrolytic enzyme additive for lactating Holstein cow diets: Ruminal fermentation, rumen microbial populations, and enteric methane emissions. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 95, n. 3, p. 1419–1427, 2012.

COLOMBATTO, D.; BEAUCHEMIN, K. A. A proposed methodology to standardize the determination of enzymic activities present in enzyme additives used in ruminant diets. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 83, n. 3, p. 559–568, 2003.

COSTA JÚNIOR, G. da S. et al. Caracterização morfométrica de ovinos da raça Santa Inês criados nas microrregiões de Teresina e Campo Maior, Piauí. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 35, n. 6, p. 2260–2267, 2006.

EISLER, M. C. et al. Agriculture: Steps to sustainable livestock. **Nature**, London, v. 507, n. 7490, p. 32–34, 2014.

EL-BORDENY, N. E. et al. Effect of Exogenous Fibrolytic Enzyme Application on Productive Response of Dairy Cows at Different Lactation Stages. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, New York, v. 10, n. 5, p. 226–236, 2015.

EUN, J.-S.; BEAUCHEMIN, K. A. Assessment of the efficacy of varying experimental exogenous fibrolytic enzymes using in vitro fermentation characteristics. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 132, n. 3–4, p. 298–315, 2007.

GADO, H. M. et al. Influence of exogenous enzymes ensiled with orange pulp on digestion and growth performance in lambs. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 165, n. 1–2, p. 131–136, 2011.

GEMEDA, B. S.; HASSEN, A. Methane production of two roughage and total mixed ration as influenced by cellulase and xylanase enzyme addition. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 72, n. 1, p. 11–19, 2015.

GERBER, P. J. et al. **Tackling climate change through livestock**: a global assessment of emissions and mitigation opportunities. Roma: FAO, 2013.

GIRALDO, L. A. et al. Effects of exogenous fibrolytic enzymes on in vitro ruminal fermentation of substrates with different forage:concentrate ratios. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 141, n. 3–4, p. 306–325, 2008.

GRAINGER, C.; BEAUCHEMIN, K. A. Can enteric methane emissions from ruminants be lowered without lowering their production? **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 166–167, p. 308–320, 2011.

GUYADER, J. et al. Forage use to improve environmental sustainability of ruminant production. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 94, n. 8, p. 3147, 2016.

HAMMOND, K. J. et al. Review of current in vivo measurement techniques for quantifying enteric methane emission from ruminants. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 219, p. 13-30, 2016.

HE, Z. X. et al. Effect of wheat dried distillers grains with solubles and fibrolytic enzymes on ruminal fermentation, digestibility, growth performance, and feeding behavior of beef cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 93, n. 3, p. 1218, 2015a.

HE, Z. X. et al. Effect of wheat dried distillers grains and enzyme supplementation on growth rates, feed conversion ratio and beef fatty acid profile in feedlot steers. **Animal**, Cambridge, v. 9, n. 10, p. 1740–1746, 2015b.

HERNANDEZ, A. et al. The effect of garlic oil, xylanase enzyme and yeast on biomethane and carbon dioxide production from 60-d old Holstein dairy calves fed a high concentrate diet. **Journal of Cleaner Production**, Oxford, v. 142, p. 2384–2392, 2017.

HERNÁNDEZ, A. et al. Effectiveness of xylanase and *Saccharomyces cerevisiae* as feed additives on gas emissions from agricultural calf farms. **Journal of Cleaner Production**, Oxford, v. 148, p. 616–623, 2017.

HILL, J. et al. Measuring Methane Production from Ruminants. **Trends in Biotechnology**, London, v. 34, n. 1, p. 26–35, 2016.

HRISTOV, A. N. et al. Special topics--Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: I. A review of enteric methane mitigation options. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 91, n. 11, p. 5045–5069, 2013.

JANSSEN, P. H. Influence of hydrogen on rumen methane formation and fermentation balances through microbial growth kinetics and fermentation thermodynamics. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 160, n. 1–2, p. 1–22, 2010.

KHOLIF, A. E. et al. Anaerobic ensiling of raw agricultural waste with a fibrolytic enzyme cocktail as a cleaner and sustainable biological product. **Journal of Cleaner Production**, Oxford, v. 142, p. 2649–2655, 2017.

MCAULIFFE, G. A. et al. Distributions of emissions intensity for individual beef cattle reared on pasture-based production systems. **Journal of Cleaner Production**, Oxford, v. 171, p. 1672–1680, 2018.

MEALE, S. J. et al. Opportunities and challenges in using exogenous enzymes to improve ruminant production. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 92, n. 2, p. 427–442, 2014.

MERTENS, D. R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: collaborative study. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 85, n. 6, p. 1217–1240, 2002.

MEYER, D. J.; HARVEY, J. W. **Veterinary laboratory medicine: interpretation and diagnosis**. 3. ed. Philadelphia: Saunders, 2004. 351 p.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of small ruminants: sheep, goats, cervids, and world camelids**. Washington, DC: National Academies Press, 2007.

ØRSKOV, E. R. Recent advances in understanding of microbial transformation in ruminants. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 39, n. 1, p. 53–60, 1994.

QIAO, J.; TAN, Z.; WANG, M. Potential and existing mechanisms of enteric methane production in ruminants. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 71, n. 5, p. 430–440, 2014.

ROMERO, J. J. et al. Screening exogenous fibrolytic enzyme preparations for improved in vitro digestibility of bermudagrass haylage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 98, n. 4, p. 2555–2567, 2015.

SALEM, A. Z. M. et al. Effects of exogenous enzymes on nutrient digestibility, ruminal fermentation and growth performance in beef steers. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 154, n. 1–3, p. 69–73, 2013.

SHI, W. et al. Methane yield phenotypes linked to differential gene expression in the sheep rumen microbiome. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 24, n. 9, p. 1517–1525, 2014.

SNIFFEN, C. J. et al. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 70, n. 11, p. 3562–3577, 1992.

SOLTAN, Y. A. et al. Response of different tropical pasture grass species to treatments with fibrolytic enzymes in terms of in vitro ruminal nutrient degradation and methanogenesis. **Animal Nutrition and Feed Technology**, Amsterdam, v. 13, n. 3, p. 551–568, 2013.

SONG, S. D. et al. Effects of exogenous fibrolytic enzyme supplementation to diets with different NFC/NDF ratios on the growth performance, nutrient digestibility and ruminal fermentation in Chinese domesticated black goats. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 236, p. 170–177, 2018.

SOWANDE, O. S.; SOBOLA, O. S. Body measurements of west African dwarf sheep as parameters for estimation of live weight. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v. 40, n. 6, p. 433–439, 2008.

TIRADO-GONZÁLEZ, D. N. et al. Meta-analysis: effects of exogenous fibrolytic enzymes in ruminant diets. **Journal of Applied Animal Research**, Oxford, v. 46, n. 1, p. 771–783, 2018.

VALDES, K. I. et al. Influence of exogenous enzymes in presence of *Salix babylonica* extract on digestibility, microbial protein synthesis and performance of lambs fed maize silage. **The Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 153, n. 4, p. 732–742, 2015.

VALLEJO-HERNÁNDEZ, L. H. et al. Environmental impact of yeast and exogenous xylanase on mitigating carbon dioxide and enteric methane production in ruminants. **Journal of Cleaner Production**, Oxford, v. 189, p. 40–46, 2018.

VALLEJO, L. H. et al. Effects of xylanase supplementation on feed intake, digestibility and ruminal fermentation in Rambouillet sheep. **The Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 154, n. 6, p. 1110–1117, 2016.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2. ed. Ithaca, NY: Cornell University Press, 1994.

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**, Champaign, v. 74, n. 10, p. 3583–3597, 1991.

WANG, L.; XUE, B. Effects of cellulase supplementation on nutrient digestibility, energy utilization and methane emission by boer crossbred goats. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, Seoul, v. 29, n. 2, p. 204–210, 2016.

WILKINSON, J. M.; LEE, M. R. F. Use of human-edible animal feeds by ruminant livestock. **Animal**, Cambridge, v. 12, n. 8, p. 1735-1743, 2018.

WOOD, T. M.; BHAT, K. M. Methods for measuring cellulase activities. In: WOOD, W. A.; KELLOGG, S. T. (Ed.). **Methods in enzymology**. London: Elsevier, 1988. v. 160, p. 87–112.

YUANGKLANG, C. et al. Growth performance and macronutrient digestion in goats fed a rice straw based ration supplemented with fibrolytic enzymes. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 154, p. 20–22, 2017.

ZHOU, M. et al. Relationship between rumen methanogens and methane production in dairy cows fed diets supplemented with a feed enzyme additive. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 111, n. 5, p. 1148–1158, 2011.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por se tratar de um extrato enzimático nunca testado na nutrição animal, avaliações iniciais *in vitro* eram necessárias para certificar que os processos fermentativos no rúmen não seriam afetados. Tanto os resultados *in vitro* quanto os *in vivo* demonstraram que o EEF é um aditivo seguro e que pode ser utilizado na dieta de ruminantes sem trazer prejuízos aos processos fermentativos ruminais e a saúde do animal.

O EEF comprovou ser uma estratégia para aumentar a digestibilidade da fração fibrosa de substratos de baixa qualidade nutricional, podendo incrementar a produtividade animal como demonstrado pelo maior percentual médio de ganho de peso nos animais suplementados. Ademais, verificou-se que o EEF possibilitou uma redução na produção de CH₄ entérico e, dessa forma, além de contribuir com a menor emissão dos GEE e impacto ambiental, favorece o aumento na produtividade animal devido a melhor eficiência de utilização da energia oriunda da dieta.

Pesquisas futuras devem ser realizadas testando métodos práticos de aplicação do EEF, além de determinar o melhor tempo de aplicação para que ocorra o melhor aproveitamento dos nutrientes do alimento pelos animais. Além disso, experimentos mais longos são necessários para certificar os resultados encontrados no presente estudo e verificar se o maior período de tempo possa promover melhores respostas sobre o ganho de peso e digestibilidade dos demais nutrientes.