

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CAMPUS DOIS VIZINHOS
CURSO DE BACHARELADO EM ZOOTECNIA

ANGELA ELIS SCHNEIDER

**CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO *IN VITRO* DE DIETAS COM
DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ENZIMAS FIBROLÍTICAS**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

DOIS VIZINHOS
2017

ANGELA ELIS SCHNEIDER

**CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO *IN VITRO* DE DIETAS COM
DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ENZIMAS FIBROLÍTICAS**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado ao Curso de Zootecnia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Dois Vizinhos, como requisito parcial à obtenção do título de Zootecnista.

Orientador: Prof. Dr. Douglas Sampaio Henrique

DOIS VIZINHOS

2017



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Dois Vizinhos
Gerência de Ensino e Pesquisa
Curso de Zootecnia



**TERMO DE APROVAÇÃO
TCC**

**CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO *IN VITRO* DE DIETAS COM
DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ENZIMAS FIBROLÍTICAS**

Autor: Angela Elis Schneider

Orientador: Prof. Dr. Douglas Sampaio Henrique

TITULAÇÃO: Zootecnista

APROVADO em 23 de junho de 2017.

**Prof. Me. Lilian Regina Rothe
Mayer**

Roberta Turmina

**Prof. Dr. Douglas Sampaio Henrique
(Orientador)**

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente aos meus pais, Maria Salete Schneider e Ernesto Schneider (*in memoriam*) pela educação, apoio, ensinamentos e amor que me deram durante a minha vida, também aos meus irmãos, Luiz, Vera e Sandra que sempre me apoiaram durante a faculdade e sempre cobraram o meu melhor. Ao Prof. Dr. Douglas Sampaio Henrique pela oportunidade de trabalhar com o seu grupo, por acreditar na minha capacidade, pelos ensinamentos, paciência e conselhos durante esses últimos dois anos. A Prof. Dra. Lilian Mayer por me dar a oportunidade de trabalhar ao seu lado e sempre aprender coisas novas. As mestrandas Joziane Batiston e Raquel S. Kölln que me ajudaram durante todo o trabalho e tiveram paciência comigo, além das ótimas conversas jogadas fora. Agradeço especialmente aos meus amigos Isabela Lopes dos Santos e Mateus Henrique Gorges que sempre estiveram ao meu lado durante a faculdade, com as risadas soltas, preocupações com trabalhos e provas e nas festas mais divertidas. Ao meu amigo e companheiro Adriano Moraes que sempre esteve ao meu lado quando mais precisei. A Érica Militão pelas palavras de incentivo e por não me deixar desistir. A Juliana Reolon por me ajudar com as correções, pela puxada de orelha e pelo apoio. E agradeço também a UTFPR-DV por me possibilitar a oportunidade de elaborar o experimento nas suas dependências, e pela bolsa fomento ao TCC que possibilitou a melhoria do trabalho realizado.

RESUMO

SCHNEIDER, Angela Elis. Cinética de degradação *in vitro* de dietas com diferentes concentrações de enzimas fibrolíticas. 2016. TCC (Trabalho conclusão de curso) – Graduação em Bacharelado em Zootecnia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2016.

As forrageiras são consideradas a maior fonte de energia para os ruminantes, mas a degradação desse alimento ainda é um fator limitante no aproveitamento desta. Existem muitos estudos visando melhorar o aproveitamento da energia por meio de aditivos como enzimas fibrolíticas, celulase e xilanase, que aumentam a degradação da parede celular do volumoso dentro do rúmen. O presente trabalho teve por objetivo comparar as curvas de produção de gás *in vitro* obtidas através de dietas com diferentes níveis de enzimas. O trabalho foi desenvolvido na Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Dois Vizinhos, onde foram incubadas, em sistema *in vitro* amostras de uma dieta total contendo volumoso e concentrado para bovinos leiteiros com níveis crescentes de enzimas fibrolíticas (0, 600, 1200, 1800, 2400, 3000 e 3600 UI por kg de MS de ração total) com seis repetições para cada nível. Os efeitos do nível de enzima na cinética de degradação foram verificados por meio de análise de variância (ANOVA) que mostrou que não houve efeito significativo para os tratamentos. Não foi possível determinar qual o melhor nível enzimático para a dieta, pois não houve diferença entre os tratamentos.

Palavras-chave: Aditivos. Alimentação de Ruminantes. Degradabilidade Ruminal.

ABSTRACT

SCHNEIDER, Angela Elis. Degradation kinetics in vitro of diets with different concentrations of enzymes fibrolytic. 2016. TCC (Labor course completion) – Undergraduate Degree in Animal Science, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2016.

The foragers are considered a major source of energy for ruminants, but the degradation of that food is still a limiting factor in the use of energy. There are many studies to improve the utilization of energy by means of additives as fibrolytic enzymes (cellulase and xylanase), which increase the degradation of the cell wall of roughage into the rumen. This study aims to compare the gas production curves in vitro obtained from diets with different levels of enzymes. The work will be developed at the Universidade Federal do Paraná - Campus Dois Vizinhos, in vitro samples of a total diet containing volumine and concentrate for dairy cattle with increasing levels of fibrolitic enzymes (0, 600, 1200, 1800, 2400, 3000 and 3600 IU per kg DM of total ration) with six replications for each level. The effects of the enzyme level on degradation kinetics were verified through analysis of variance (ANOVA), which showed that there was no significant effect for the treatments. It was not possible to determine the best enzymatic level for the diet, since there was no difference between the treatments.

Keywords: Additives. Ruminant Feed. Rumen degradability.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
2 OBJETIVOS	8
2.1 OBJETIVO GERAL.....	8
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
3.1 ENZIMAS	9
3.1.1 Enzimas na produção animal	10
3.1.2 Enzimas para ruminantes.....	10
3.2 TÉCNICA DE DIGESTIBILIDADE <i>IN VITRO</i> COM PRODUÇÃO DE GÁS	13
4 MATERIAL E MÉTODOS	15
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
6 CONCLUSÃO.....	22
REFERÊNCIAS	23

1 INTRODUÇÃO

As forrageiras são consideradas a maior fonte de energia e a mais barata para os ruminantes, cerca de 40 a 90% das exigências nutricionais são atendidas pelos volumosos, mas a degradação da parede celular no rúmen ainda é um limitante no aproveitamento de energia do volumoso (BEAUCHEMIN et al, 2003; MARTINS et al., 2006). Os ruminantes degradam e aproveitam os carboidratos que compõem a parede das células vegetais (celulose, hemicelulose e pectina) por meio da síntese de complexos enzimáticos produzidos pelos microrganismos que colonizam o rúmen. Essa degradação ocorre extracelularmente até as unidades fundamentais dos polissacarídeos (KOZLOSKI, 2009; MARTINS et al., 2007).

As enzimas digestivas foram inicialmente utilizadas como aditivos na alimentação de frangos de corte, tendo função de melhorar o valor nutritivo do alimento facilitando sua digestão. A suplementação de ruminantes com enzimas exógenas não era bem recebida, pois se acreditava que as enzimas exógenas eram destruídas pela proteólise no rúmen e que a alta atividade fibrolítica da microbiota ruminal impediria resultados significantes (BEAUCHEMIN;RODE, 1995).

O crescente uso de enzimas fibrolíticas exógenas para ruminantes traz como promessa a melhor utilização da forragem e maior eficiência na produção de carne e leite pelos ruminantes. E com o aumento da preocupação dos consumidores sobre o uso de promotores de crescimento e antibióticos na produção de ruminantes, e o potencial no aumento da produtividade que podem ser obtidos utilizando enzimas alimentares, estes produtos podem desempenhar um papel importante nos sistemas de produção (BEAUCHEMIN et al., 2002).

Com as perspectivas futuras da crescente utilização de enzimas digestivas para ruminantes, este trabalho pode auxiliar na determinação de níveis enzimáticos ideais para melhorar o desempenho para ruminantes e que possa ser viável economicamente para o produtor.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL:

Comparar as curvas de produção de gás *in vitro* obtidas a partir de dietas com adição de diferentes níveis de enzimas fibrolíticas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Estimar parâmetros da cinética de degradação *in vitro* de dietas suplementadas com diferentes concentrações de uma mistura composta pelas enzimas xilanase e celulase.
- Comparar os valores paramétricos obtidos a partir do ajuste dos modelos de curva de cinética de degradação ajustados à produção de gás de dietas com diferentes níveis da mistura de xilanase e celulase

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ENZIMAS

As enzimas são proteínas globulares, de estrutura terciária ou quaternária, funcionam como catalisadores biológicos que participam de diversas reações bioquímicas. Aceleram reações termodinamicamente favorecidas, são versáteis e possuem especificidade ao substrato que utilizam (COELHO et al., 2008; CHAMPE; HARVEY, 1989).

A propriedade característica das reações catalisadas pelas enzimas é que a reação ocorre em um local apropriado da enzima chamado de sítio ativo, sendo que apenas um substrato específico pode se ligar ao sítio ativo (NELSON; COX, 2011). A reação catalítica das enzimas é influenciada pela temperatura e pH. Em temperaturas ótimas a velocidade de destruição das enzimas pelo calor é equilibrada pelo aumento na reatividade enzima-substrato e a velocidade de reação é máxima. A concentração de H⁺ afeta a velocidade das reações químicas, sendo que extremos de pH podem levar à desnaturação das enzimas, mas cada enzima possui uma faixa de pH ideal (CAMPESTRINI et al., 2005).

As principais enzimas utilizadas como aditivos na alimentação animal são sintetizadas por quatro tipos de bactérias (*Bacillus subtilis*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, e *Streptococcus faecium*, spp.) e três tipos de fungos (*Aspergillus oryzae*, *Trichoderma reesei*, e *Saccharomyces cerevisiae*) (CAMPESTRINI et al., 2005). De acordo com Morgavi et al. (2000), grande parte das enzimas produzidas pela indústria são derivadas do fungo *Trichoderma*. O fungo consegue fazer a degradação da fibra e fazer a liberação das enzimas individualmente no meio, que agem sequencialmente na degradação do substrato. Este sistema difere do mecanismo da microbiota ruminal, em que a maioria sintetiza complexos multienzimáticos. Atualmente tem se intensificado o estudo na identificação de novos microrganismos produtores de enzimas, para a produção com maior efetividade (CHENG, 2000).

3.1.1 Enzimas na produção animal

Enzimas digestivas na alimentação animal já são amplamente utilizadas em aves e suínos para aumentar a digestibilidade de nutrientes de rações contendo milho e soja, aumentando a eficiência na produção animal (CAMPESTRINI et al., 2005). As enzimas são utilizadas na alimentação animal com dois propósitos: complementar as enzimas produzidas pelo próprio animal em quantidades insuficientes e fornecer enzimas aos animais que eles não conseguem sintetizar naturalmente (FISCHER et al, 2002).

As enzimas podem ser fornecidas na forma de coquetel ou separadas, segundo Wenk et al.(1993), a utilização de enzima separada é feita quando precisa degradar um determinado fator anti-nutricional ou quando se sabe que uma enzima usada com outra pode afetar a ação de ambas. O fornecimento de enzimas em forma de coquetel é feito quando se tem vários fatores anti-nutricionais na dieta ou para determinada categoria animal que esteja passando por estresse, como por exemplo, leitões recém desmamados (FERKET, 1996).

3.1.2 Enzimas para ruminantes

Os ruminantes são caracterizados por possuírem um grande estômago com divisão em vários compartimentos distintos. Sendo o rúmen, o retículo e o omaso revestidos por epitélio estratificado queratinizado aglandular. O abomaso é o compartimento glandular, o único que possui a capacidade de secreção de fluidos digestivos (PEIXOTO;MOURA;FARIA, 1995).

O rúmen é considerado um ecossistema microbiano diverso e único, possui meio anaeróbico, com temperatura em torno de 39°C, pH variando entre 6,0 e 7,0, e com presença de substratos e de atividade fermentativa, embora com intensidade variável. O rúmen é colonizado por três tipos de microrganismos: bactérias, fungos e protozoários, sendo as bactérias e fungos que secretam os complexos enzimáticos (KOZLOSKI, 2009). Graças à secreção destes complexos enzimáticos que ocorre a

degradação dos alimentos consumidos pelos ruminantes, principalmente os carboidratos da parede celular de forrageiras.

A parede celular pode ser definida como uma matriz complexa composta de polissacarídeos, proteínas, compostos fenólicos, água e minerais, sendo os principais polissacarídeos a celulose, hemicelulose e pectina (HATFIELD, 1989 apud LARA, 2013). Segundo Van Soest (1994) os polissacarídeos da parede celular podem ser divididos em duas classes: aqueles que não têm ligações covalentes com o centro lignificado e que acabam sendo mais solúveis e completamente fermentáveis no rúmen, e aqueles que possuem algumas ligações covalentes com o centro lignificado e assim são incompletas ou apenas parcialmente digestíveis.

Produtos enzimáticos na alimentação de ruminantes podem ser considerados como, misturas de diferentes celulases e xilanases, e que originalmente foram produzidas para outros fins. Esses produtos também podem apresentar atividades enzimáticas secundárias, como proteases, amilases e pectinases (BEAUCHEMIN et al., 2003).

As enzimas fibrolíticas exógenas têm a promessa como um meio de aumento da utilização de forragens e melhorar a eficiência produtiva de ruminantes (BEAUCHEMIN et al., 2002). As forrageiras são a base da alimentação dos ruminantes, porém a eficiência da digestibilidade da parede celular ainda é um limitante, pois de acordo com Van Soest (1994), a parede celular de plantas compreende 40 a 70% da matéria seca para forragem, e que mesmo sob condições ideais de alimentação, a digestibilidade da parede celular no trato digestivo total é inferior a 65%.

Segundo Beauchemin e Rode (1996), o uso de suplementação exógena de enzimas fibrolíticas para melhorar a digestibilidade da fibra e a utilização do alimento foi examinada em primeiro lugar para ruminantes na década de 1960. Inicialmente, as enzimas não eram utilizadas rotineiramente na alimentação de ruminantes, uma vez que se assumia que estas proteínas poderiam ser rapidamente degradadas pelos microrganismos ruminais (BEAUCHEMIN;RODE;SEWALT, 1995).

Vários trabalhos que avaliaram o uso de enzimas fibrolíticas mostraram melhoria na conversão alimentar e no ganho de peso de bovinos, provavelmente resultantes do aumento da digestibilidade da matéria seca e da taxa de passagem do alimento (BEAUCHEMIN;RODE,1996; FENG et al., 1996). Pesquisadores também encontraram efeitos das enzimas fibrolíticas no intestino delgado, Hristov et

al. (2000), encontraram um aumento na atividade da xilanase no intestino, além da redução da viscosidade intestinal, resultando em uma maior absorção de nutrientes.

Segundo Brito (2010), um dos principais problemas para a realização de pesquisas nesta área é a incerteza dos resultados. Devido à variedade de produtos enzimáticos e condições experimentais distintas, as respostas encontradas para utilização de enzimas para ruminantes sofre muita variação. Esta variação pode ser devido a vários fatores, como: quando não possui limitação pela energia do alimento; diferença da atividade e características das enzimas utilizadas; super ou subdosagem; método de fornecimento; proporção da forragem na dieta; o pH do rúmen e a taxa de passagem do alimento pelo rúmen (BEAUCHEMIN et al., 2003; COLOMBATTO et al., 2003).

O nível de enzimas fornecidas aos animais é um dos principais fatores que geram ineficiência dos produtos enzimáticos. Subdosagens não conseguem causar melhora da digestibilidade e superdosagens podem interferir na atuação dos microrganismos, através da competição pelos mesmos sítios de adesão do substrato, ou podendo liberar fatores antinutricionais (BRITO, 2010).

Enzimas fibrolíticas aplicadas, 1,3 kg/ton de MS, no concentrado de dietas de vacas no início da lactação tem um grande potencial para aumentar a produção de leite através do aumento da digestibilidade do alimento, Rode et al. (1999) encontraram um aumento não significativo de 3,6 kg/dia na produção de leite, redução de 0,3 % na gordura do leite e melhora nos coeficientes de digestibilidade da matéria seca (MS), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e proteína bruta (PB).

Lewis et al. (1999), obtiveram maior produção de leite, 1,3 kg/dia e melhora na condição corporal de vacas no início e meio da lactação alimentadas com enzimas fibrolíticas aplicadas sobre o volumoso. Yang et al. (1999), fornecendo dois níveis diferentes de produto enzimático em uma dieta com 45% de concentrado, observaram aumento de 7% na produção de leite de vacas alimentadas com enzimas comparadas com vacas alimentadas com a dieta controle. Também observaram maior digestibilidade da matéria orgânica (MO) e FDN.

Kung Jr. et al. (2000) pulverizando dois níveis diferentes de enzimas fibrolíticas em silagem de milho e feno de alfafa antes de formar uma ração mista contendo 50% de concentrado, encontraram um aumento de 2,5 kg/dia de leite de vacas alimentadas com o nível médio de enzimas comparadas as sem alimentação

enzimática. Beauchemin et al. (1999) também observaram maior produção de leite e melhoria na digestibilidade dos nutrientes com o uso de enzimas fibrolíticas na dieta de vacas leiteiras.

Giraldo et al. (2007) utilizando um conjunto de enzimas comerciais contendo xilanase, endoglucanase e exoglucanase fornecendo 40 e 80 unidades enzimáticas/g de MS de substrato, encontraram em 8h de incubação um aumento na degradabilidade do substrato (feno de capim), na produção de ácidos graxos voláteis (AGVs) e no gás. Jalilvand et al. (2008) utilizaram três níveis de enzimas comerciais em três substratos diferentes (feno de alfafa, silagem de milho e palha de trigo) e encontraram efeitos mais significativos na produção de gás as 6 e 12 h utilizando a palha de trigo. Os autores concluíram que a adição de enzima afeta fermentação ruminal de forma diferente dependendo do alimento ingerido pelo animal.

Beauchemin et al. (2002), afirmam que ainda são necessários mais estudos para determinar o modo de ação e os níveis ideais, de modo que a formulação de misturas de enzimas possa ser otimizado melhorando o desempenho zootécnico em sistemas de produção de ruminantes.

3.2 TÉCNICA DE DIGESTIBILIDADE *IN VITRO* COM PRODUÇÃO DE GÁS

Esta técnica consiste na incubação do alimento com líquido ruminal, tampão e meio de cultura. Os gases produzidos através do processo de fermentação são medidos como indicadores indiretos da cinética de fermentação. Após a incubação do alimento, este primeiramente degradado sendo que a fração degradada pode ser fermentada e produzir gases e ácidos da fermentação ou ser incorporada à biomassa microbiana (RYMER,2005).

Existem fatores que podem comprometer a fermentação *in vitro*, sendo estes a fonte e o preparo do inóculo, a composição e preparo do meio e o preparo do substrato. Os dados obtidos de produção de gases *in vitro* podem ser úteis quando são complementados com outros dados, como composição química do substrato e/ou sua digestão *in vitro*, para atuar em modelos matemáticos mais complexos que predizem fenômenos relacionados com o funcionamento do rúmen (KRISHNAMOORTHY, 2005).

Os sistemas de produção de gases *in vitro* proporcionam uma estimativa da digestibilidade da matéria seca e/ou da matéria orgânica, e servem com um indicador direto dos produtos finais produzidos, como a produção de gases, e indireta como ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (BUENO et al., 2005). Getachew et al. (2004) afirma que a quantidade de gases produzidos de um alimento em incubação reflete a produção de AGCC, sendo estes a principal fonte de energia dos ruminantes. Os gases surgem diretamente da degradação microbiana dos alimentos, e indiretamente da reação do tampão com os ácidos gerados como resultado da fermentação.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho se conduziu na Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Dois Vizinhos e recebeu aprovação da Comissão de Ética para o uso de Animais, com o protocolo 07/2016 para o uso de animais fistulados. Foram incubadas *in vitro* amostras de ração composta para bovinos leiteiros na base da matéria seca com níveis crescentes de enzimas fibrolíticas (0, 600, 1200, 1800, 2400, 3000 e 3600 UI por kg de MS de ração total) e seis repetições para cada nível. O produto contendo as enzimas possuía uma proporção de 80:20 de xilanase e celulase, respectivamente, para se acrescentar na ração total, composta de silagem de milho, casca de soja, feno de aveia, concentrado e torta de soja, como mostra a tabela 1. A mistura das enzimas com o substrato ocorreu 12 horas antes da incubação, para a mistura utilizou-se 0,5 kg de amostra da dieta para a mistura com a quantidade de cada tratamento. Foi realizada a devida homogeneização da amostra com bastão de vidro durante 3 minutos para cada tratamento.

Tabela 1. Quantidade dos alimentos consumidos pelos animais e proporção dentro da dieta.

Alimento	Kg/dia	Porcentagem
Silagem de milho	30,0	68,65 %
Casca de soja	1,2	2,75 %
Feno de aveia	1,5	3,43 %
Concentrado	8,0	18,31 %
Torta de soja	3,0	6,86 %
Total	43,7 Kg/dia	100 %

Também se realizou análises bromatológicas, sendo determinados a matéria seca (MS), matéria mineral (MM) e proteína bruta (PB), de acordo com a metodologia descrita por Silva e Queiroz (2002). Análise de fibra insolúvel em detergente neutro (FDN) foi realizada pelo método de Mertens et al. (2002).

Para a incubação *in vitro* em banho maria a 39° C, utilizou-se frascos de penicilina na cor âmbar de 100 mL vedados com tampas de borracha e lacres de alumínio. Aproximadamente 0,5 g ± 0,1 mg de amostra seca ao ar da ração foram

transferido para os frascos para serem incubadas com 40 mL de um meio de cultura reduzido e mais 10 mL de inóculo ruminal preparado de acordo com Goering e Van Soest (1970). O meio de cultura, a solução redutora e o inóculo foram preparados em lote único (HALL; MERTENS, 2008). O inóculo ruminal foi obtido de dois novilhos holandeses fistulados, sendo a obtenção e preparo conforme a metodologia descrita por Abreu et al. (2014). O equipamento para aferir a pressão e o volume do gás produzido é semelhante ao descrito por Malafaia et al. (1998) com algumas alterações (ABREU et al., 2014; OLIVEIRA, 2013). As leituras de pressão e de volume expressas em mL/0.1 g, foram realizadas a 1, 2, 3, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24, 30, 36, 48, 72, 96 e 144 horas de incubação. No término da incubação e abertura dos vidros, foi medido o pH de todas as amostras.

Foram utilizados quatro modelos matemáticos de cinética de produção de gás propostos por Zwietering et al. (1990) e Schofield et al. (1994):

$$V_t = V_f[1 - \exp(-kt)] + \varepsilon ; \quad (\text{Eq. 1})$$

$$V_t = V_f \exp\{-\exp[1 + ke(L - t)]\} + \varepsilon ; \quad (\text{Eq. 2})$$

$$V_t = V_{f1}[1 - \exp(-k_1t)] + V_{f2} \exp\{-\exp[1 + k_2e(L - t)]\} + \varepsilon ; \quad (\text{Eq. 3})$$

$$V_t = V_{f1} \exp\{-\exp[1 + k_1e(L - t)]\} + V_{f2} \exp\{-\exp[1 + k_2e(L - t)]\} + \varepsilon ; \quad (\text{Eq. 4})$$

V_t (Eqs. (1)–(4)) é a produção cumulativa de gases em função do tempo (t, h); V_f (Eqs. (1)–(2)) é o volume de gás assintótico produzido pela degradação do substrato que possui apenas um compartimento; k ($1/h$) é a taxa de degradação do substrato considerando apenas um compartimento (Eqs. (1)–(2)); e L (Eq. (2)) é o tempo de latência discreta (h). Eq. (3) é um modelo bicompartimental usado para estimar a produção assintótica de gás produzido pela degradação de substratos de rápida (V_{f1}) e lenta (V_{f2}) digestibilidade, com suas respectivas taxas de degradação k_1 e k_2 ambos expressos em ($1/h$). Na Eq. (3), o compartimento de rápida digestão é fermentado em um processo sem latência e o segundo compartimento segue um padrão logístico com tempo de latência (L ; h). A Eq. (4) foi desenvolvida para ajustar padrões de formato sigmóide no qual os compartimentos de rápida e lenta digestão produzem volume de gás assintótico (V_{f1} e V_{f2}) com suas taxas de degradação k_1 e k_2 ($1/h$) após um período de latência comum a ambos os compartimentos (L ; h). O termo e é a base dos logaritmos naturais (Eqs. (2)–(4)), e ε é o erro aleatório (Eqs.

(1)–(4)). A taxa média de digestão (TMD, h) para cada equação pode ser calculada como se segue: $TMD = 1/k$ para Eq. (1); $TMD = 1/k + L$ para Eq. (2;3;4); e $TMD = 1/k_1 + 1/k_2 + L$.

A linearidade entre o volume e a pressão observados nas leituras de produção de gás (THEODOROU et al., 1994) foi verificada por meio do método de regressão robusta do SAS. Os parâmetros dos diferentes modelos não lineares (Eqs. (1) a (4)) foram estimados pelo procedimento NLIN do SAS. A verossimilhança das Eqs. (1) a (4) em reproduzir o perfil de produção de gás foi conferida pelo cômputo do critério de Akaike (AKAIKE, 1974).

Os possíveis efeitos do nível de enzima na cinética de degradação foram verificados por meio de análise de variância (ANOVA) e no caso da identificação de efeito significativo pela ANOVA foi realizada a análise de regressão robusta dos parâmetros de degradação em função do nível de enzima usando o SAS.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para este trabalho a equação que melhor se ajustou aos dados obtidos, segundo o Critério de Akaike Corrigido, foi a Eq. 3 que se adequou de forma satisfatória. Para a elaboração das curvas de degradação foi necessário estimar os valores paramétricos, especificados na tabela 2.

Tabela 2. Média e intervalo de confiança (IC 95%) dos parâmetros em relação aos tratamentos

Níveis de Tratamento	Média (g kg ⁻¹) / Variáveis				
	Vf1	K1	Vf2	K2	L
0	28,47±6,309	0,09±0,019	9,13±6,059	0,02±0,007	0
600	30,15±2,685	0,09±0,008	9,07±2,502	0,01±0,003	0
1200	31,35±2,384	0,08±0,007	7,59±2,063	0,01±0,004	0
1800	29,05±2,713	0,09±0,010	9,88±2,505	0,01±0,003	0
2400	28,92±2,783	0,09±0,009	9,96±2,633	0,01±0,003	0
3000	31,63±2,897	0,08±0,009	7,45±2,453	0,01±0,005	0
3600	32,17±1,984	0,08±0,006	6,90±1,526	0,01±0,004	0
ANOVA	0,2372	0,1053	0,0410	0,0536	

Vf1, e Vf2 são os volumes máximo de gás produzido pela degradação da fração solúvel de rápida digestão e fração insolúvel potencialmente degradável de digestão lenta respectivamente, expressos em mL 0,1 g⁻¹ de MS.

k1 e k2, são as taxa específica de produção de gás pela degradação da fração solúvel de rápida digestão e fração insolúvel potencialmente degradável de digestão lenta, expressos em h⁻¹.

L representa a latência expresso em tempo

Analisando os valores paramétricos pode se observar que o Vf₁ apresentou valores superiores ao Vf₂, isso é devido a dieta utilizada possuir valores altos de carboidratos não fibrosos, assim esse compartimento teve mais produção de gás comparado ao compartimento de carboidrato fibroso. Em outros trabalhos (MALAFAIA, 1998; OLIVEIRA, 2016) os valores de Vf₂ foram maiores que o Vf₁, isso porque os autores trabalharam apenas com espécies forrageiras, que naturalmente

possuem maior quantidade de carboidratos fibrosos ligados ao segundo compartimento.

As taxas de degradação, k_1 e k_2 , se mostraram compatíveis com a literatura (MALAFAIA et al., 1998; BÜRQUER et al., 2000), onde a k_1 possui valor maior que o k_2 , isto devido ao carboidrato não fibroso ser mais digestível e conseqüentemente apresentar valor maior de taxa de degradação.

Na tabela 2 também é possível identificar que o valor de latência de todos os tratamentos ficou zero, acreditamos que isso se deve ao fato da dieta ter altos valores de concentrado e fibra de alta qualidade, com valor baixo de lignina no alimento, assim teve pouca interferência na degradação da fibra pela microbiota ruminal, possibilitando o início imediato da colonização dos microrganismos, produção dos complexos enzimáticos e início da degradação do alimento.

Os valores de pH ao final da incubação tiveram pouca variação, de 6,42 a 6,55, parecidos com os valores encontrados por Giraldo et al. (2007), que segundo o autor é o ideal para a degradação da fibra.

Conforme demonstrado na tabela 2, houve efeito significativo apenas ($P > 0,05$) para o parâmetro Vf_2 , volume de gás do carboidrato fibroso. Após feito regressão linear gerou o valor $P = 0,2825$, mostrando que não houve efeito significativo ($P > 0,05$) para o Vf_2 .

Segundo Gallardo et al. (2010) um dos fatores que pode influenciar a atuação das enzimas na taxa de degradação *in vitro* é a composição química do alimento, no caso dele, das forrageiras. Jalilvand et al. (2008) diz que as enzimas fibrolíticas possuem maior ação para alimentos mais fibrosos, com maiores valores de FDN, assim comparado com os resultados obtidos por esse experimento, pode se dizer que devido ao baixo valor de FDN, descrito na tabela 2, pode ter sido um dos motivos da falta de eficácia das enzimas.

Tabela 3. Valores bromatológicos dos alimentos e ração total.

Alimento	MS %	MM%	EE%	PB %	FDN %
Silagem de milho	29,9	6,0	5,5	8,0	38,2
Casca de Soja	86,5	7,2	2,0	13,1	61,6
Feno de Aveia	64,0	10,9	3,0	14,0	58,1
Concentrado	79,6	9,4	3,6	23,5	17,7
Torta de Soja	85,5	6,9	5,8	41,7	11,6
Ração Total	66,7	8,0	4,0	18,5	32,1

MS: Matéria Seca; MM: Matéria Mineral; PB: Proteína Bruta; EE: Extrato Étereo; FDN: Fibra em Detergente Neutro

O valor de FDN (Fibra em Detergente Neutro) demonstra os valores de celulose, hemicelulose e lignina no alimento, portanto é possível ter noção da quantidade de carboidratos fibrosos presente no alimento. As enzimas fibrolíticas utilizadas, celulase e xilanase, foram escolhidas com o intuito de degradar a celulose e a hemicelulose respectivamente, entretanto não se sabe se a quantidade desses componentes da dieta possa ter afetado a degradação, pois caso a dieta tivesse maior quantidade de lignina aderida a parede celular este fator iria interferir no acesso das enzimas ao substrato, dificultando a ação das mesmas.

Analisando a proporção dos ingredientes e qualidade nutricional da dieta, podemos presumir que outro motivo para ineficiência da ação das enzimas pode ser devido a alta qualidade do alimento. A dieta fornecida aos animais possui pouca quantidade de alimento fibroso, e o principal volumoso, silagem de milho, é de ótima qualidade sendo facilmente degradado no rúmen. Assim valores baixos de fibra no alimento juntamente com ingredientes de boa qualidade nutricional já garantem uma boa digestibilidade e aproveitamento por parte do animal sem necessidade de outros aditivos.

Outro fator que deve ser considerado é a possibilidade da degradação dessas enzimas pelos microrganismos presentes no líquido ruminal, mas como já citados anteriormente, diversos trabalhos mostraram melhoria na digestibilidade e aumento na produção de leite mesmo com a aplicação da enzima um pouco antes da ingestão do alimento.

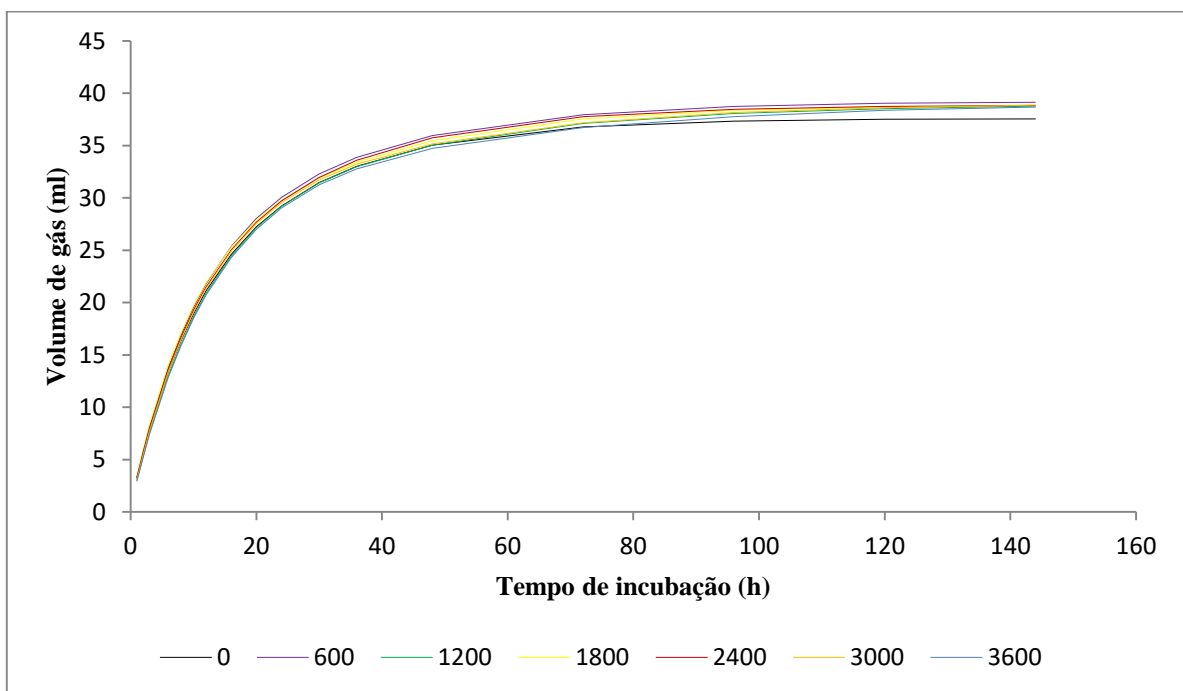
Segundo Beauchemin et al. (1995) o tempo de exposição das enzimas com o alimento antes da ingestão do animal também pode interferir no resultado, mas não

se tem um tempo ideal para interação entre as enzimas e o substrato que comprove alguma eficácia.

Na curva de produção de gás acumulativa (Figura 1) é possível verificar que nas primeiras 24 horas de incubação houve maior produção de gás, isso se deve ao fato de no início ocorrer a degradação total dos carboidratos não fibrosos que acabam liberando mais gás em curto tempo, após este período a produção de gás é a partir da mudança da taxa de degradação dos carboidratos fibrosos e *turnover* microbiano. (CABRAL et al., 2000).

Esperávamos que houvesse diferença nas curvas de produção de gás dos tratamentos, principalmente entre o tratamento controle e o nível 3600 UI de enzimas, mas como não houve diferença significativa entre as curvas não se torna possível fazer a comparação mais detalhada das curvas, e nem a elaboração das curvas de carboidratos não fibrosos e fibrosos.

Figura 1. Curva de produção acumulativa de gás dos tratamentos conforme tempo de incubação.



6 CONCLUSÃO

As enzimas fibrolíticas utilizadas neste trabalho, xilanase e celulase, não mostraram efeito sobre dieta de vacas leiteiras usada na cinética *in vitro* com produção de gás.

REFERÊNCIAS

ABREU, Matheus. L. C. et al.. Clitoria ternatea L. as a potential high quality forage legume. **Asian Australasian Journal of Animal Science**, v. 27, n.02, p. 169-178, 2014.

AKAIKE, Hirotugu. A new look at the statistical model identification. **IEEE Transactions on Automatic Control**, v.19, n. 06 p.716-723. 1974.

BEAUCHEMIN K. A. et al. Mode of action of exogenous cell wall degrading enzymes for ruminants. **Canadian Journal of Animal Science**. v.84. p.13–22. 2003.

BEAUCHEMIN K. A. et al. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. **Journal of Animal Science**. v.81(E. Suppl. 2):E37–E47. 2002.

BEAUCHEMIN K. A.; RODE L. M.; KARREN D.. Use of feed enzymes in feedlot finishing diets. **Canadian Journal of Animal Science**. v. 79. p. 243–246. 1999.

BEAUCHEMIN K. A.; YANG W. Z.; RODE L. M. Effects of grain source and enzyme additive on site and extent of nutrient digestion in dairy cows. **Journal of Dairy Science** v. 82. p.378–390. 1999.

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

BEAUCHEMIN, K.A; RODE, L.M. The potencial use of feed enzymes for ruminants. In: **Cornell Nutrition Conference For Feed Manufacturers**, 58th 1996.

BRITO, Fernando O. **Níveis de complexo enzimático em dietas para ruminantes**. 2010. 82f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2010.

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.

- BÜRQUER, Peter Johann et al. Taxas de passagem e cinética da degradação ruminal em bezerros holandeses alimentados com dietas contendo diferentes níveis de concentrado. **Revista Brasileira de Zootecnia**. p 225-235. 2000.
- CABRAL, Luciano da Silva et al. Frações de carboidratos de alimentos volumosos e suas taxas de degradação estimadas pela técnica de produção de gases. **Revista Brasileira de Zootecnia**. p :2087-2098. 2000.
- CAMPESTRINI, Evandro; SILVA, V.T.M.; APPELT, Matias D. Utilização de enzimas na alimentação animal. **Revista Eletrônica Nutritime**.v.2.nº6.p.259-272. 2005.
- CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A. Enzimas. In: **Bioquímica Ilustrada**, 2 ed. 446p. p53-66.São Paulo: Artes médicas, 1989.
- CHENG, K.J. Fibrolytic enzymes from ruminal microorganisms. **Lethbridge Research Centre**. 2000.
- COELHO, Maria A.Z.; SALGADO, Andrea M.; RIBEIRO, Bernardo D. **Tecnologia Enzimática**. Petrópolis- RJ, EPUB, 2008. p.288.
- COLOMBATTO, D.; MOULD, F.L., BHAT, M.K.; OWEN. Use of fibrolytic enzymes to improve the nutritive value of ruminant diets. A biochemical and in vitro rumen degradation assessment. **Animal Feed Science and Technology**. v107. p201-209, 2003.
- FENG, P.; HUNT, C.W.; PRITCHARD, G.T.; JULIEN, W.E. Effects of enzyme preparations in situ and in vitro degradation and in vivo digestive characteristics of mature cool-season grass. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 1349-1357, 1996.
- FERKET, P. **Enzymes offer way to reduce waste, improve performance**. Feedstuffs. p. 30-34, 1996.
- FISCHER, Geferson et al. Desempenho de Frangos de Corte Alimentados com Dietas à Base de Milho e Farelo de Soja, com ou sem Adição de Enzimas. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.31. n.1. p.402-410. 2002.
- GETACHEW, G.; ROBINSON, P. H.; DEPETERS, E. J.; TAYLOR, S. J. Relationship between chemical composition, dry matter degradation and *in vitro* gas production of several ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 111, n. 1-4, p. 57-71, 2004.

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**. v.141. p.306–325. 2008.

GOERING, H.K., VAN SOEST, P.J. **Forage fiber analysis**. Agricultural handbook n.379. U.S.D.A., Washington, 1970.

HALL, Mary B., MERTENS, David.R. In vitro fermentation vessel type and method alter fiber digestibility estimates. **Journal of Dairy Science**. v.91, p. 301-307, 2008.

HATFIELD, R. D. Structural polysaccharides in forages and their degradability. Agron. J. 1989 apud LARA, Erika C. **Produção e avaliação de enzimas fibrolíticas exógenas na ensilagem de milho**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal, 2013.

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

JALILVAND G. et al. Effects of different levels of an enzyme mixture on in vitro gas production parameters of contrasting forages. **Animal Feed Science and Technology**. v.146. p.289–301. 2008.

KOZLOSKI, Gilberto V. **Bioquímica de Ruminantes**. ed 2. p 216. Santa Maria: Ed. da UFSM, 2009.

KRISHNAMOORTHY, U.; RYMER, C.; ROBINSON, P. H. The *in vitro* gas production technique: limitations and opportunities. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 123-124, n.1, p. 1-7, 2005.

KUNG Jr, L. et al. The effect of treating forages with fibrolytic enzymes on its nutritive value and lactation performance of dairy cows. **Journal of Dairy Science**. vol. 83, No. 1, 2000.

LEWIS, G.E. et al. Effect of direct-fed fibrolytic enzymes on the lactational performance of dairy cows. **Journal of Dairy Science**.v. 82. P.611–617. 1999.

MALAFAIA, Pedro A. M. et al. Cinética Ruminal de Alguns Alimentos Investigada por Técnicas Gravimétricas e Metabólicas. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.27, n.2, p.370-380, 1998.

MARTINS, Adriana S. et al. Consumo e digestibilidade aparente total em bovinos sob suplementação com enzimas fibrolíticas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.5, p.2118-2124, 2006.

MARTINS, Adriana S. et al. Degradabilidade in situ e observações microscópicas de volumosos em bovinos suplementados com enzimas fibrolíticas exógenas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.6, p.1927-1936, 2007.

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

MORGAVI, D.P. et al. Synergy between ruminal fibrolytic enzymes and enzymes from *Trichoderma longibrachiatum*. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 1310-1321, 2000.

NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. ed 5. p. 1274. Porto Alegre: Artmed, 2011.

OLIVEIRA, Jhone Gleyson. Cinética **de degradação in vitro da aveia IAPAR 126 sob diferentes períodos de descanso**. Trabalho de Conclusão de Curso, Dois Vizinhos – PR, 63f, 2013.

PEIXOTO, Aristeu M.; MOURA, José C.; FARIA, Vidal P. **Nutrição de Bovinos**. ed 5. vol 7. p 563. Piracicaba: FEALQ, 1995.

RODE, L.M.; YANG, W.Z.; BEAUCHEMIN, K.A. Fibrolytic Enzyme Supplements for Dairy Cows in Early Lactation. **Journal of Dairy Science**. v.82. p.2121–2126. 1999.

RYMER, C. In vitro cumulative gas production techniques: History, methodological considerations and challenges. **Animal Feed Science and Technology**. 123–124. 9–30. 2005.

SCHOFIELD, Peter; PELL, Alice N. Measurement and kinetic-analysis of the neutral detergent-soluble carbohydrate fraction of legumes and grasses. **Journal of Animal Science**, v. 73, 3455-3463, 1995.

SILVA, D. J. DA ; QUEIROZ, A. C. de. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3ª edição Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2002. p. 235.

THEODOROU, Michael 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**, n.48, v.3-4, p.185-197, 1994.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of ruminant**. 2.ed. Ithaca: Cornell University Press, p. 476, 1994.

WENK, C. What are the benefits of carbohydrase in the nutrition of monogastric farm animals. In: WENK, C.; BOESSINGER, M. (Eds.) **Enzymes in animal nutrition**. Kartause Ittingen, Switzerland: 1993.

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

ZWIETERING, M.H. Modeling of the bacterial growth curve. **Applied Environmental Microbiology**. vol. 56 no. 6. p.1875-1881. 1990.