

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS  
ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA  
ANIMAL TROPICAL**

**JHONE TALLISON LIRA DE SOUSA**

**UTILIZAÇÃO DE ENZIMAS EXÓGENAS NA NUTRIÇÃO DE OVINOS**

**ARAGUAÍNA-TO  
2019**

**JHONE TALLISON LIRA DE SOUSA**

**Utilização de enzimas exógenas na nutrição de ovinos**

**Tese apresentada para obtenção do título de Doutor, junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical da Universidade Federal do Tocantins.**

**Área de Concentração: Nutrição de Ruminantes**

**Orientador: Prof. Dr. Luciano Fernandes Sousa**

**Comitê de orientação:**

**Prof. Dr. Gilberto de Lima Macedo Junior  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Deborah Alves Ferreira**

**ARAGUAÍNA-TO  
2019**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins**

---

S725u Sousa, Jhone Tallison Lira de.  
Utilização de enzimas exógenas na nutrição de ovinos. / Jhone Tallison Lira de Sousa. – Araguaína, TO, 2019.  
157 f.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Tocantins – Campus Universitário de Araguaína - Curso de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciência Animal Tropical, 2019.

Orientador: Luciano Fernandes Sousa

1. Nutrição. 2. Enzimas. 3. Amido. 4.  $\alpha$ -amilase. I. Título

**CDD 636.089**

---

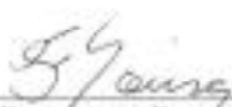
TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

**Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).**

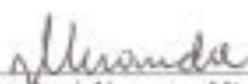
# UTILIZAÇÃO DE ENZIMAS EXÓGENAS NA NUTRIÇÃO DE OVINOS

JHONE TALLISON LIRA DE SOUSA

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor, junto ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal Tropical da Universidade Federal do Tocantins.



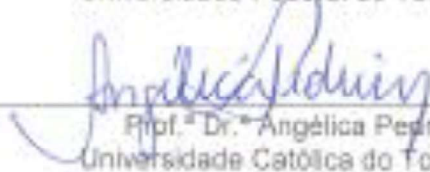
Prof. Dr. Luciano Fernandes Sousa  
Universidade Federal do Tocantins




Prof. Dr. José Neuman Miranda Neiva  
Universidade Federal do Tocantins



Prof.ª Dr.ª Deborah Alves  
Universidade Federal do Tocantins



Prof.ª Dr.ª Angélica Pedrico  
Universidade Católica do Tocantins



Presidente da Banca e Orientador  
Prof. Dr. Raylon Pereira Maciel  
Universidade Federal Rural da Amazônia  
Participação a distância de acordo com Resolução  
Do Consepe – UFT  
Nº 09, de 14 de março de 2018.

Araguaina, 15 de março de 2019



Universidade Federal de Uberlândia

- Comissão de Ética na Utilização de Animais -



## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Inclusão de níveis crescentes de enzimas sobre o consumo, digestibilidade, comportamento e bioquímica sanguínea de ovinos", protocolo nº 146/16, sob a responsabilidade de **Gilberto de Lima Macedo Junior** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião de **10 de fevereiro de 2017**.

(We certify that the project entitled "Inclusão de níveis crescentes de enzimas sobre o consumo, digestibilidade, comportamento e bioquímica sanguínea de ovinos", protocol 146/16, under the responsibility of Gilberto de Lima Macedo Junior - involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was approved for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of February 10th, 2017).

Vigência do Projeto	Início: 08/03/2017 Término: 25/05/2017
Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos	Ovino
Número de animais	20
Peso / Idade	45 kg / 10 meses
Sexo	Fêmeas
Origem / Local	Fazenda Experimental Capim Branco
Número da Autorização SISBIO	-
Atividade(s)	-

Uberlândia, 17 de fevereiro de 2017.

Prof. Dr. Lúcio Vilela Carneiro Girão  
Coordenador da CEUA/UFU

Aos meus pais Gonçalo Lira de Sousa e Maria Da Luz Sousa

**DEDICO!**

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus por me conceder o dom da vida e por realizar mais esse sonho, ao qual agradeço profundamente por não ter desistido.

Aos meus pais, Gonçalo Lira de Sousa e Maria Da Luiz Sousa por terem confiado em mim e me apoiado desde sempre me encorajando a seguir em frente sempre, fortalecendo-me em todos os momentos, vocês são minha fortaleza.

Aos meus irmãos, Jeferson Lira de Sousa, Jhennifer Lira de Sousa e Joana Patrícia Lira de Sousa que são meus pilares de sustentação.

A minha filha Jamilly Thábata Araújo Moreira Gonçalo Lira, você é minha princesa é minha luz, minha força, você é o bem mais preciso que tenho nessa vida.

As minhas sobrinhas, Nirvana, Nithelly Maria, Nítala e Maria Rita e sobrinho Gonçalo Neto espero poder recompensar todas as boas energias e renovação de espírito que vocês me deram em momentos cruciais da minha história.

A minha namorada, amiga e parceira de todas as horas Paola Rezende Ribeiro por sempre estar comigo desde o início do doutorado, agradeço imensamente pela ajuda e apoio em todos os momentos, principalmente na reta final dessa caminhada, sem você eu não teria conseguido.

Ao meu orientador, Luciano Fernandes Sousa, que além de ser um ótimo profissional é um exemplo de pai, pessoa e mais que isso é um grande amigo para mim.

Agradeço ao meu coorientador, Gilberto de Lima Macedo Junior que desde a graduação, já me inspirava a tentar ser alguém melhor.

Foi para mim motivo de satisfação contar com a professora Deborah Alves, agradeço por todo conhecimento transmitido e pela prestatividade.

Agradeço a oportunidade de ter trabalhado e estudado no Range Cattle Research & Education Center em Ona Flórida sob a orientação do professor Dr. João Vendramini e com o técnico Hiran Marcelo Siqueira da Silva.

Agradeço a Bárbara de Sá Cunha que realizou minhas análises no laboratório, principalmente durante o período dedicado ao Doutorado Sanduíche.

Aos meus amigos de Ona Flórida, João Sanchez, Hiran Marcelo, Marcelo Vedovatto, Jose Luiz, Matheus Piccolo, Claudinei, Miguel, Jim Beckley, Pedro Mamede.

Aos membros do Grupo de Estudo e Pesquisa em Nutrição de Ruminantes - GEPNUTRI, Carol Moreira, Karla Alves, Marco Túlio, Adriana, Maria Júlia, Wendell, Guilherme Vieira, Lucas Marcos, Adriano, Ariel Valadares, Thais, Lucas Queiroz,

Paulo Arthur, Marina Cerqueira, Jessica Souza, Jose Vítor, Luciana, Jéssica Rodrigues, Paola, Thuanne Lima, que auxiliaram na condução dos experimentos, meu muito obrigado.

A família que me acolheu em Uberlândia em nome do Nicolas Neves, Dona Vânia e Seu Ronaldo meu muito obrigado, serei eternamente grato pela ajuda.

Aos meus colegas do doutorado, Rafael (Paçoca), André (Gabiru), André (Coxinha), Vagner (Herói), Messias (Materinho), Marcos (Neguim), e Joquim de Paula.

Ao secretário da Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, Jeekyçon da Silva Cardoso, por toda a agilidade, competência e prestatividade em ajudar os alunos da pós-graduação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, da Universidade Federal do Tocantins, pelo aperfeiçoamento de minha formação profissional.

A Capes pela concessão do auxílio financeiro da bolsa.

Aos professores do programa de Pós-graduação em Ciência Animal Tropical, da Universidade Federal do Tocantins.

**Muito obrigado a todos!**



*“A menos que modifiquemos à nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”.*

*(Albert Einstein)*

## SUMÁRIO

RESUMO GERAL.....	i
ABSTRACT.....	iii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	v
LISTA DE TABELAS.....	vii
1.1 INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1. Enzimas: aspectos gerais.....	11
2.2. Classificação e características específicas.....	12
2.2.1. Produção das enzimas.....	14
2.3. O futuro dos aditivos enzimáticos na produção de ruminantes.....	15
2.4. Enzimas exógenas na produção de ruminantes de interesse zootécnico.....	16
2.4.1. Enzimas fibrolíticas.....	17
2.4.2. Enzimas amilolíticas.....	19
2.4.3. Complexos enzimáticos.....	21
3. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	22
4. REFERÊNCIAS.....	22

### **CAPÍTULO 2 - CONSUMO, DIGESTIBILIDADE, BALANÇO DE NITROGÊNIO E ENERGIA, COMPORTAMENTO INGESTIVO E METABÓLITOS SANGUÍNEOS DE BORREGAS ALIMENTADAS COM NÍVEIS CRESCENTES DE ENZIMA AMILOLÍTICA EXÓGENA NA DIETA.....**

Resumo.....	29
Abstract.....	30
1. INTRODUÇÃO.....	31
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
4. CONCLUSÃO.....	55
5. REFERÊNCIAS.....	56

### **CAPÍTULO 3 - CONSUMO, DIGESTIBILIDADE, BALANÇO DE NITROGÊNIO E ENERGIA, COMPORTAMENTO INGESTIVO E METABÓLITOS SANGUÍNEOS DE BORREGAS ALIMENTADAS COM NÍVEIS CRESCENTES DE ENZIMA FIBROLÍTICA EXÓGENA NA DIETA.....**

Resumo.....	62
Abstract.....	63
1. INTRODUÇÃO.....	64
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	65
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	75
4. CONCLUSÃO.....	88
5. REFERÊNCIAS.....	88

### **CAPÍTULO 4 - CONSUMO, DIGESTIBILIDADE, BALANÇO DE NITROGÊNIO E ENERGIA, COMPORTAMENTO E METABÓLITOS SANGUÍNEOS DE BORREGAS**

<b>ALIMENTADAS COM NÍVEIS CRESCENTES DE UM COMPLEXO ENZIMÁTICO EXÓGENO</b> .....	91
Resumo.....	92
Abstract.....	93
1. INTRODUÇÃO.....	94
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	95
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	105
4. CONCLUSÃO.....	119
5. REFERÊNCIAS.....	119

<b>CAPÍTULO 5 - CONSUMO, DIGESTIBILIDADE, BALANÇO DE NITROGÊNIO E ENERGIA, COMPORTAMENTO E METABÓLITOS SANGUÍNEOS DE CORDEIROS ALIMENTADOS COM NÍVEIS CRESCENTES DE UM MIX DE ENZIMAS NA DIETA</b> .....	124
Resumo.....	125
Abstract.....	126
1. INTRODUÇÃO.....	127
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	128
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	138
4. CONCLUSÃO.....	150
5. REFERÊNCIAS.....	151
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	155

## RESUMO GERAL

### Utilização de enzimas exógenas na nutrição de ovinos

O presente trabalho foi dividido em quatro experimentos objetivando avaliar diferentes tipos de enzimas exógenas em níveis crescentes de inclusão na dieta de ovinos e avaliar seus efeitos sobre o consumo, a digestibilidade, o balanço de nitrogênio e energia, o comportamento ingestivo e os metabólitos sanguíneos. Os experimentos foram conduzidos na Universidade Federal de Uberlândia no setor de ovinos e caprinos da fazenda Capim Branco de fevereiro a maio de 2017. Os tratamentos consistiram em dieta controle e quatro níveis de inclusão de enzimas 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0%. Os produtos comerciais avaliados foram AMAIZE™ (enzima amilolítica), FIBROZYME® (enzima fibrolítica), (ALLZYME® SSF) (complexo enzimático), e um MIX desses três produtos em proporções iguais. Para condução dos experimentos todos os animais utilizados foram alojados em gaiolas metabólicas individuais, durante sessenta dias. Todos os ensaios foram conduzidos em delineamento em quadrado latino (5x5), com cinco tratamentos e cinco repetições. **No experimento I** avaliou-se a inclusão da enzima amilolítica (AMAIZE™) na dieta. Foram utilizadas cinco borregas, com peso vivo inicial médio de  $54,04 \pm 4,5$  kg e aproximadamente oito meses de idade. Houve diferença significativa para o coeficiente de digestibilidade aparente da matéria seca, matéria orgânica, carboidratos totais, carboidratos não fibrosos, nutrientes digestíveis totais e digestibilidade da energia bruta. A digestibilidade de energia bruta apresentou efeito quadrático com ponto de máxima em 0,82% de inclusão da enzima, mesmo comportamento observado para a digestibilidade da matéria seca. Os demais parâmetros avaliados não foram influenciados pelo acréscimo de enzima amilolítica na dieta. **No experimento II** avaliou-se a inclusão da enzima fibrolítica (FIBROZYME®) na dieta. Foram utilizadas cinco borregas, com peso inicial médio de  $46,48 \pm 5,60$  kg e aproximadamente sete meses de idade. As concentrações de creatinina apresentaram comportamento linear decrescente de 0,22 mg/dL para cada 0,5% de inclusão da enzima, os outros parâmetros avaliados não sofreram alterações com a inclusão da enzima fibrolítica na dieta. **No experimento III** avaliou-se a adição de um complexo enzimático composto por pectinase, protease, fitase, betaglucanase, xilanase, celulase e amilase (ALLZYME® SSF) na dieta. Foram utilizadas cinco borregas, com peso inicial médio de  $61,16 \pm 5,80$  kg e aproximadamente oito meses de idade. Houve diferença significativa para os metabólitos sanguíneos albumina e aspartatoaminotransferase (AST) apresentando comportamento linear decrescente, com redução de 0,085 mg/dL e 8,9 UI/L para cada 0,5% de inclusão do complexo enzimático, para albumina e AST, respectivamente, o complexo enzimático não foi efetivo em alterar o consumo e a digestibilidade dos nutrientes. **No experimento IV** avaliou-se a adição do MIX de enzimas que era composto por três produtos comerciais nas seguintes proporções  $\frac{1}{3}$ -AMAIZE™;  $\frac{1}{3}$ -FIBROZYME®; e  $\frac{1}{3}$ -ALLZYME® SSF. Foram utilizados cinco borregos, com peso inicial médio de  $25,89 \pm 2,6$  kg e aproximadamente quatro meses de idade. Não houve diferença significativa para o consumo de matéria seca em função do peso  $\%PV^{-1}$  e peso metabólico  $PV^{-0,75}$ . Não houve diferença significativa para o coeficiente

de digestibilidade aparente da matéria seca e escore fecal. O peso das fezes na matéria natural diferiu significativamente com a inclusão do MIX de enzimas. O consumo de água aumentou linearmente com a inclusão do MIX apresentando acréscimo de 183 mL para cada 0,5% de inclusão. Houve diferença significativa para os metabolitos sanguíneos glicose e aspartatoaminotransferase apresentando comportamento linear decrescente com a inclusão da do MIX de enzimas. Apenas os produtos MIX de enzimas e AMAIZE™ foram capazes de causar efeito significativas no consumo e digestibilidade aparente dos nutrientes. Para que a enzima tenha efeito positivo e exerça seu papel de lise no ambiente ruminorreticular é necessário que se utilize produtos capazes de degradar substratos específicos como amido ou celulose, dessa maneira, pode-se amplificar as taxas de degradação ruminal de nutrientes melhorando o desempenho animal.

**Palavras-chave:** aditivos, alfa-amilase, amido, dieta alto concentrado, ruminantes.

## ABSTRACT

### Exogenous enzymes in sheep nutrition

The present study was divided into four experiments aiming to evaluate the effects of different types and dietary levels of exogenous enzymes on feed intake, digestibility, nitrogen and energy balance, feeding behavior and blood metabolites in sheep. The experiments were conducted at the Federal University of Uberlândia in the Sheep and Goat Research Center of the Capim Branco farm from February to May 2017. The treatments consisted of a control diet and four inclusion levels of enzymes (0.5; 1.0; 1.5 and 2.0%). The commercial products evaluated were AMAIZE™ (amylolytic enzyme), FIBROZYME® (fibrolytic enzyme), ALLZYME® SSF (enzyme complex), and a MIX of these three products in equal proportions. All animals were housed in individual metabolic cages for sixty days. All experiments were conducted using a Latin square design (5x5), with five treatments and five replicates. The dietary inclusion of the amylolytic enzyme (AMAIZE™) was evaluated in **experiment I**. Five ewe lambs with a mean initial body weight of  $54.04 \pm 4.5$  kg and aged eight months were used. There was a significant difference for apparent digestibility coefficient of dry matter, organic matter, total carbohydrates, non-fibrous carbohydrates, total digestible nutrients, and gross energy digestibility. Enzyme level had a quadratic effect on gross energy digestibility, reaching its peak at 0.82% of enzyme inclusion. The same trend was observed for dry matter digestibility. The remaining parameters were not influenced by the dietary inclusion of the amylolytic enzyme. The dietary inclusion of the fibrolytic enzyme (FIBROZYME®) was evaluated in **experiment II**. Five ewe lambs with a mean initial body weight of  $46.48 \pm 5.60$  kg and aged seven months were used. Creatinine concentration decreased linearly by 0.22 mg/dL with each 0.5% addition of enzyme, whereas the remaining parameters were not affected by the dietary inclusion of the fibrolytic enzyme. The dietary inclusion of an enzyme complex composed of pectinase, protease, phytase, beta-glucanase, xylanase, cellulase, and amylase (ALLZYME® SSF) was evaluated in **experiment III**. Five ewe lambs with a mean initial body weight of  $61.16 \pm 5.80$  kg and aged eight months were used. There was a significant difference for the blood metabolites albumin and aspartate aminotransferase (AST), with linear reductions of 0.085 mg/dL and 8.9 IU/L with each 0.5% addition of the enzyme complex, respectively. However, the enzyme complex was not effective in altering the feed intake and nutrient digestibility in lambs. The dietary inclusion of an enzyme MIX composed of three commercial products at the equal proportions ( $\frac{1}{3}$ -AMAIZE™;  $\frac{1}{3}$ -FIBROZYME®; and  $\frac{1}{3}$ -ALLZYME® SSF) was evaluated in **experiment IV**. Five male lambs with a mean initial body weight of  $25.89 \pm 2.6$  kg and aged four months were used. There was no significant difference for dry matter intake as a percent of body weight (%BW<sup>-1</sup>) and metabolic weight (BW<sup>0.75</sup>). There was no significant difference for apparent digestibility coefficient of dry matter and fecal score. The fecal output weight (organic matter basis) differed significantly in lambs fed different inclusion levels of the enzyme MIX. The water intake increased linearly by 183 mL with each 0.5% addition of the enzyme MIX. The blood metabolites glucose and aspartate aminotransferase reduced linearly with the inclusion of the

enzyme MIX. Only the enzyme MIX and AMAIZE™ products caused significant effects on apparent digestibility and nutrient intake. Products capable of degrading specific substrates such as starch or cellulose are necessary for enzymes to function properly and to exert their lytic effects on the ruminoreticular environment, resulting in higher ruminal degradation rates of nutrients and improved animal performance.

**Keywords:** additives, alpha-amylase, high-concentrate diet, ruminants, starch.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%Cons	Teor do Nutriente no Alimento Fornecido
%Sob	Teor do Nutriente nas Sobras
$\mu$	Média Geral
AFRC	Agricultural and Food Research Council
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
NRC	National Research Council
AST	Aspartatoaminotransferase
BENERG	Balanco Energético
BN	Balanco de Nitrogênio
CA	Consumo de Água
CCel	Consumo de Celulose
CCHT	Consumo de Carboidrato Total
CCNF	Consumo de Carboidrato Não Fibroso
CDap	Coefficiente de Digestibilidade Aparente
CEB	Consumo de Energia Bruta
CED	Consumo de Energia Digestível
CEE	Consumo de Extrato Etéreo
CEM	Consumo de Energia Metabolizável
CEUA	Comitê de Ética na Utilização de Animais
CFDA	Consumo de Fibra em Detergente Ácido
CFDN	Consumo de Fibra em Detergente Neutro
CHem	Consumo de Hemicelulose
CHT	Carboidratos Totais
Cm	Produção de Metano
CMO	Consumo de Matéria Orgânica
CN	Consumo de Nitrogênio
CNDT	Consumo de Nutrientes Digestíveis Totais
CNF	Carboidratos Não Fibrosos
CNFD	Carboidratos Não Fibrosos Digestíveis
CNut	Consumo do Nutriente
CPB	Consumo de Proteína Bruta
DCel	Digestibilidade da Celulose
DCHT	Digestibilidade de Carboidrato Total
DCNF	Digestibilidade de Carboidrato Não Fibroso
DEB	Digestibilidade de Energia Bruta
DHem	Digestibilidade da Hemicelulose
DMO	Digestibilidade da Matéria Orgânica
DMS	Digestibilidade da Matéria Seca
DNDT	Digestibilidade de Nutrientes Totais
EB	Energia Bruta
ECC	Escore de Condição Corporal
ED	Energia Digestível
EE	Extrato Etéreo
EIng	Eficiência de Ingestão
EM	Energia Metabolizável
EMast	Eficiência de Mastigação
EMVZ	Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia
ERum	Eficiência de Ruminação



FA	Fosfatase Alcalina
FC	Fator de Correção
FDA	Fibra Insolúvel em Detergente Ácido
FDN	Fibra Insolúvel em Detergente Neutro
FDNcp	Fibra em Detergente Neutro Corrigida para Cinzas
g	Gramas
GGT	Gama-Glutamiltransferase
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido Sulfúrico
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Ácido Bórico
HCl	Ácido Clorídrico
HCl	Ácido Clorídrico
kg	Quilogramas
L	Litros
máx.	Máximo
MG	Média Geral
mín.	Mínimo
mL	Mililitros
mm	Milímetros
MS	Matéria Seca
N	Nitrogênio
NaOH	Hidróxido de Sódio
NC	Nitrogênio Consumido
NDT	Nutrientes Digestíveis Totais
NEB	Nitrogênio Endógeno Basal
NET	Nitrogênio de Excreção Total
NF	Nitrogênio Nas Fezes
NU	Nitrogênio Excretado Na Urina
P	Peso
PB	Proteína Bruta
PBD	Consumo de Proteína Bruta Digestível
PSPS	Penn State Particle Size
PT	Proteínas Totais
PV	Peso Vivo
PV <sup>0,75</sup>	Peso Metabólico
RTM	Ração Total Misturada
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
V	Volume

## LISTA DE TABELAS

### **CAPÍTULO 2 - CONSUMO, DIGESTIBILIDADE, BALANÇO DE NITROGÊNIO E ENERGIA, COMPORTAMENTO INGESTIVO E METABÓLITOS SANGUÍNEOS DE BORREGAS ALIMENTADAS COM NÍVEIS CRESCENTES DE ENZIMA AMILOLÍTICA EXÓGENA NA DIETA**

<b>Tabela 1</b> – Proporção dos ingredientes na composição do concentrado e sal mineral das dietas experimentais e composição bromatológica da silagem e concentrado.....	33
<b>Tabela 2</b> – Descrição do produto AMAIZE <sup>(TM)</sup> pelo fabricante.....	33
<b>Tabela 3</b> – Perfil de distribuição descritiva das partículas das RTM's do ofertado, da silagem e do concentrado (%) em função dos tratamentos e dos tamanhos de partículas.....	40
<b>Tabela 4</b> - Consumo de nutrientes em grama animal dia ( $\text{g.animal}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ ), em função do peso vivo ( $\%PV^{-1}$ ) e em função do peso metabólico ( $PV^{-0,75}$ ), de borregas alimentadas com diferentes níveis de enzima amilolítica exógena na dieta.....	43-44
<b>Tabela 5</b> - Digestibilidade aparente dos nutrientes por borregas alimentadas com diferentes níveis de enzima amilolítica exógena na dieta.....	45
<b>Tabela 6</b> - Balanço de nitrogênio em borregas alimentadas com diferentes níveis de enzima amilolítica exógena na dieta.....	47
<b>Tabela 7</b> - Balanço de energia em borregas alimentadas com diferentes níveis de enzima amilolítica exógena na dieta.....	48
<b>Tabela 8</b> - Consumo de água ( $\text{L.animal}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ ), consumo de água em função do consumo de matéria seca ingerida ( $\text{L.kg.MS}$ ), consumo de água em função do peso vivo ( $\%PV^{-1}$ ), consumo de água em função do peso metabólico ( $PV^{-0,75}$ ), volume e densidade da urina, peso das fezes e escore fecal de borregas alimentadas com diferentes níveis de enzima amilolítica na dieta.....	49
<b>Tabela 9</b> - Comportamento ingestivo e eficiência alimentar de borregas alimentadas com níveis crescentes de enzima amilolítica exógena na dieta.....	51
<b>Tabela 10</b> - Perfil de distribuição das partículas, PB e FDN das sobras de alimento, de borregas em função dos tratamentos com inclusão de enzima amilolítica exógena na dieta.....	52
<b>Tabela 11</b> – Metabólitos sanguínea de borregas alimentadas com níveis crescentes de enzima amilolítica exógena na dieta.....	54
<b>Tabela 12</b> – Glicemia de borregas ( $\text{mg/dL}$ ) alimentadas com níveis crescentes de enzima amilolítica exógena na dieta.....	55

### **CAPÍTULO 3 - CONSUMO, DIGESTIBILIDADE, BALANÇO DE NITROGÊNIO E ENERGIA, COMPORTAMENTO INGESTIVO E METABÓLITOS SANGUÍNEOS DE BORREGAS ALIMENTADAS COM NÍVEIS CRESCENTES DE ENZIMA FIBROLÍTICA EXÓGENA NA DIETA**

<b>Tabela 1</b> – Proporção dos ingredientes na composição do concentrado e sal mineral das dietas experimentais e composição bromatológica da silagem e concentrado.....	66
<b>Tabela 2</b> – Descrição do produto FIBROZYME® pelo fabricante.....	66
<b>Tabela 3</b> – Perfil de distribuição descritiva das partículas das RTM's do ofertado, da silagem e do concentrado (%) em função dos tratamentos e dos tamanhos de partículas.....	73

<b>Tabela 4</b> - Consumo de nutrientes em grama animal dia ( $\text{g.animal}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ ), em função do peso vivo ( $\%PV^{-1}$ ) e em função do peso metabólico ( $PV^{-0,75}$ ), de borregas alimentadas com diferentes níveis de enzima fibrolítica exógena na dieta.....	76-77
<b>Tabela 5</b> - Digestibilidade aparente dos nutrientes por borregas alimentadas com diferentes níveis de enzima fibrolítica exógena na dieta.....	79
<b>Tabela 6</b> - Balanço de nitrogênio em borregas alimentadas com diferentes níveis de enzima fibrolítica exógena na dieta.....	80
<b>Tabela 7</b> - Balanço de energia em borregas alimentadas com diferentes níveis de enzima fibrolítica exógena na dieta.....	81
<b>Tabela 8</b> - Consumo de água ( $\text{L.animal}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ ), consumo de água em função do consumo de matéria seca ingerida ( $\text{L.kg.MS}$ ), consumo de água em função do peso vivo ( $\%PV^{-1}$ ), consumo de água em função do peso metabólico ( $PV^{-0,75}$ ), volume e densidade da urina, peso das fezes e escore fecal de borregas alimentadas com diferentes níveis de enzima fibrolítica na dieta.....	82
<b>Tabela 9</b> - Comportamento ingestivo e eficiência alimentar de borregas alimentadas com níveis crescentes de enzima fibrolítica exógena na dieta.....	84
<b>Tabela 10</b> - Perfil de distribuição das partículas, PB e FDN das sobras de alimento, de borregas em função dos tratamentos com inclusão de enzima fibrolítica exógena na dieta.....	85
<b>Tabela 11</b> – Metabólitos sanguínea de borregas alimentadas com níveis crescentes de enzima fibrolítica exógena na dieta.....	86
<b>Tabela 12</b> – Glicemia de borregas ( $\text{mg/dL}$ ) alimentadas com níveis crescentes de enzima fibrolítica exógena na dieta.....	88

#### **CAPÍTULO 4 - CONSUMO, DIGESTIBILIDADE, BALANÇO DE NITROGÊNIO E ENERGIA, COMPORTAMENTO E METABÓLITOS SANGUÍNEOS DE BORREGAS ALIMENTADAS COM NÍVEIS CRESCENTES DE UM COMPLEXO ENZIMÁTICO EXÓGENO**

<b>Tabela 1</b> – Proporção dos ingredientes na composição do concentrado e sal mineral das dietas experimentais e composição bromatológica da silagem e concentrado.....	96
<b>Tabela 2</b> – Descrição do produto ALLZYME® SSF pelo fabricante.....	96
<b>Tabela 3</b> – Número de unidades de atividade enzimática para cada enzima por tratamento.....	97
<b>Tabela 4</b> – Perfil de distribuição descritiva das partículas das RTM's do ofertado, da silagem e do concentrado (%) em função dos tratamentos e dos tamanhos de partículas.....	103
<b>Tabela 5</b> - Consumo de nutrientes em grama animal dia ( $\text{g.animal}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ ), em função do peso vivo ( $\%PV^{-1}$ ) e em função do peso metabólico ( $PV^{-0,75}$ ), de borregas alimentadas com diferentes níveis crescentes de complexo enzimático exógeno na dieta.....	106-107
<b>Tabela 6</b> - Digestibilidade aparente dos nutrientes por borregas alimentadas com diferentes níveis de complexo enzimático exógeno na dieta.....	108
<b>Tabela 7</b> - Balanço de nitrogênio em borregas alimentadas com diferentes níveis de complexo enzimático exógeno na dieta.....	109
<b>Tabela 8</b> - Balanço de energia em borregas alimentadas com diferentes níveis de complexo enzimático exógeno na dieta.....	110

<b>Tabela 9</b> - Consumo de água ( $L.animal^{-1}.dia^{-1}$ ), consumo de água em função do consumo de matéria seca ingerida ( $L.kg/MS$ ), consumo de água em função do peso vivo ( $\%PV^{-1}$ ), consumo de água em função do peso metabólico ( $PV^{-0.75}$ ), volume e densidade da urina, peso das fezes e escore fecal de borregas alimentadas com diferentes níveis de complexo enzimático na dieta.....	111
<b>Tabela 10</b> - Comportamento ingestivo e eficiência alimentar de borregas alimentadas com níveis crescentes de complexo enzimático exógeno na dieta.....	113
<b>Tabela 11</b> - Perfil de distribuição das partículas, PB e FDN das sobras de alimento, de borregas em função dos tratamentos com inclusão de complexo enzimático exógeno na dieta.....	114
<b>Tabela 12</b> – Metabólitos sanguínea de borregas alimentadas com níveis crescentes de complexo enzimático exógeno na dieta.....	117
<b>Tabela 13</b> – Glicemia de borregas (mg/dL) alimentadas com níveis crescentes de complexo enzimático exógeno na dieta.....	118

**CAPÍTULO 5 - CONSUMO, DIGESTIBILIDADE, BALANÇO DE NITROGÊNIO E ENERGIA, COMPORTAMENTO E METABOLITOS SANGUÍNEOS DE CORDEIROS ALIMENTADAS COM NÍVEIS CRESCENTES DE UM MIX DE ENZIMAS NA DIETA.....**

<b>Tabela 1</b> – Proporção dos ingredientes na composição do concentrado experimental e composição bromatológica da silagem e do concentrado.....	129
<b>Tabela 2</b> – Descrição do MIX de enzimático pelo autor.....	129
<b>Tabela 3</b> – Número de unidades de atividade enzimática para cada enzima por tratamento.....	130
<b>Tabela 4</b> – Perfil de distribuição descritiva das partículas da RTM do ofertado, da silagem e do concentrado (%) em função dos tamanhos de partículas.....	136
<b>Tabela 5</b> - Consumo de nutrientes em grama animal dia ( $g.animal^{-1}.dia^{-1}$ ), em função do peso vivo ( $\%PV^{-1}$ ) e em função do peso metabólico ( $PV^{-0.75}$ ), de borregos alimentadas com diferentes níveis de enzima exógena na dieta.....	140
<b>Tabela 6</b> - Digestibilidade aparente dos nutrientes por borregos alimentadas com diferentes níveis de enzima amilolítica exógena na dieta.....	141
<b>Tabela 7</b> - Balanço de N em borregos alimentadas com diferentes níveis de enzima amilolítica exógena na dieta.....	142
<b>Tabela 8</b> - Balanço de energia em borregos alimentadas com diferentes níveis de enzima amilolítica exógena na dieta.....	143
<b>Tabela 9</b> - Consumo de água ( $L.animal^{-1}.dia^{-1}$ ), consumo de água em função do consumo de matéria seca ingerida ( $L.kg.MS$ ), consumo de água em função do peso vivo ( $\%PV^{-1}$ ), consumo de água em função do peso metabólico ( $PV^{-0.75}$ ), volume e densidade da urina, de borregos alimentados com diferentes uma mistura de enzimas exógenas na dieta.....	144
<b>Tabela 10</b> - Comportamento ingestivo e eficiência alimentar de borregos alimentados com níveis crescentes de uma mistura de enzimas exógenas na dieta.....	146
<b>Tabela 11</b> - Perfil de distribuição das partículas das sobras de alimento de borregos em função dos tratamentos com inclusão de uma mistura de enzimas exógenas na dieta.....	147

<b>Tabela 12</b> – Bioquímica sanguínea de borregos alimentados com níveis crescentes de uma mistura de enzimas exógenas na dieta.....	149
<b>Tabela 13</b> – Glicemia de borregos (mg/dL) alimentados com níveis crescentes de um MIX de enzimas na dieta.....	150

## 1. INTRODUÇÃO

A demanda mundial por produtos de origem animal tem aumentado em ritmo acelerado, gerando a necessidade de aplicação de estratégias para melhorar a produtividade animal (SUJANI e SERESINHE, 2015). O sistema de confinamento é uma estratégia que tem ganhado espaço nas últimas décadas, graças as novas tecnologias que permitem a utilização de dietas para ruminantes com alta quantidade de grãos sem prejudicar a saúde ruminal (CERVIERI et al., 2009).

Dietas de maior concentração energética aumentam a eficiência de uso da energia metabolizável para ganho, isto é, maior parcela da energia consumida é depositada na carcaça, seja na forma de proteína ou gordura. Embora os animais ruminantes tenham evoluído para consumirem dietas a base de forragem é possível utilizar dietas com elevado teor de concentrado ou, até mesmo, com ausência de volumoso, entretanto, tal estratégia demanda manejo nutricional mais refinado e acompanhamento técnico rotineiro (PAULINO et al., 2013).

Para minimizar problemas em dietas com elevado teor de concentrado, o uso de aditivos são uma das ferramentas utilizadas para manipular a fermentação ruminal (VAN NEVEL, 1992), devido a ampla variedade de produtos disponíveis no mercado. O uso de microrganismos como aditivos em alimentos não é recente, pesquisas iniciais sobre a suplementação de dieta de ruminantes com enzimas exógenas tiveram início na década de 1960, considerando principalmente as enzimas amilolíticas (McCARTHY et al., 2013) e proteolíticas (VERA et al., 2012).

As enzimas exógenas podem promover melhorias nos parâmetros da cinética ruminal (ELGHANDOUR et al., 2013) e na digestibilidade dos nutrientes (TANG et al., 2008, YANG et al., 2011), além de permitirem a manipulação dos produtos finais da fermentação (TRICARICO et al., 2008) sem alterar a composição da dieta. Isso ocorre devido aos mecanismos e/ou processos bioquímicos e fisiológicos que precisam ser melhor compreendidos (YANG et al., 2011) como diferenças na atividade enzimática, taxa e composição da aplicação, modo e tempo de contato enzimático, atividade ruminal *in vitro* e estabilidade enzimática neste ambiente, e especificidade enzima-substrato (BEAUCHEMIN et al., 2003; ADESOGAN, 2014).

Enzimas, amilolíticas, fibrolíticas e proteolíticas são utilizadas para melhorar o valor nutritivo de silagens de cereais (YANG et al., 2011), uma vez que estas estão entre os principais alimentos utilizados na nutrição de ruminantes no Brasil (BERNARDES e REGO, 2014). Para se alcançar benefício máximo com o uso de

enzimas exógenas na nutrição de ruminantes, deveria ser utilizado na dieta quantidade expressiva de diferentes enzimas, ou uma enzima com ação sobre diversos substratos, visto que as rações de ruminantes são compostas por uma enorme variedade de alimentos incluindo volumosos, concentrados, sub e coprodutos (TAKIYA, 2016).

A utilização de ovinos em estudos de digestibilidade facilitam as pesquisas sobre a inclusão de novos produtos que podem ser introduzidos na alimentação de ruminantes, e permite maior elucidação sobre os efeitos da inclusão de enzimas exógenas nas dietas de ruminantes, o que auxilia os nutricionistas a identificarem preparações enzimáticas ideais e dosagens eficazes antes de criarem produtos comerciais lucrativos para a indústria (EUN e BEAUCHEMIN, 2005).

Há muitas incógnitas a serem exploradas em relação a adição de enzimas exógenas em dietas de ruminantes. Os efeitos dos aditivos microbianos no desempenho e no metabolismo são variáveis devido a diversos fatores, dentre eles pode-se destacar a diversidade de composição dos produtos microbianos, das dietas e da categoria animal avaliados (SILVA DE OLIVEIRA et al., 2005).

Objetivou-se com essa revisão fornecer uma visão geral e simplificada sobre aspectos relacionados as enzimas exógenas e sua utilização em dietas de ruminantes, visando direcionar pesquisas futuras sobre esse tema.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Enzimas: aspectos gerais**

O interesse da indústria da agricultura no uso enzimas teve início na década de 20. O isolamento e cristalização da primeira enzima (uréase) foi realizada pelo Dr. James B. Sumner (1926). Porém, só na década de 50, os cientistas norte-americanos iniciaram pesquisas pioneiras sobre os efeitos benéficos da adição de enzimas na alimentação animal (RYAN, 2018).

Nos últimos trinta anos, os avanços na compreensão dos processos químicos e metabólicos associados a substratos específicos em ingredientes de ração permitiram que as empresas produzissem enzimas para substratos-alvos. Além disso, o desenvolvimento das tecnologias de fermentação, microbiologia e biologia molecular possibilitaram a produção de enzimas alimentares com menor custo, tornando possível a inclusão em formulações comerciais (RAVINDRAN, 2013).

Os tipos e atividade das enzimas produzidas variam dependendo da cepa microbiana usada para fermentação, do substrato empregado e das condições de cultura utilizadas. Em comparação com os meios coletados, esses produtos enzimáticos são relativamente concentrados, purificados e com elevada função específica (THAMMIAH et al., 2017).

As principais enzimas alimentares do mercado são: as fitases, as xilanases e as  $\beta$ -glucanases (celulases). No entanto, pode-se registrar o aumento de outras enzimas, como: mananases,  $\alpha$ -galactosidases, pectinases, amilases e proteases (MENEZES-BLACKBURN e GREINER, 2015).

Os aditivos enzimáticos não possuem função nutricional direta, mas melhoram a digestibilidade dos nutrientes. Dentre os benefícios relacionados as enzimas exógenas na dieta de ruminantes destacam-se o aumento na eficiência alimentar, desmame precoce pelo melhor desenvolvimento do rúmen, rápida adaptação dos microrganismos ruminais a alterações na dieta, prevenção na ocorrência de distúrbios gastrintestinais (diarreias), além de melhorar a capacidade imunológica (CAMPESTRINI et al., 2005).

## **2.2. Classificação e características específicas**

Enzimas são proteínas globulares com alto peso molecular produzidas por células vivas e têm a capacidade de catalisar reações bioquímicas coordenadas. São classificadas em holoproteínas, formadas exclusivamente por aminoácidos, e heteroproteínas, que possuem uma parte não proteica, o cofator que é necessário à atividade catalítica (COURI e DAMASO, 2008).

No contexto dos aditivos alimentares para ruminantes, as enzimas são utilizadas para catalisar reações de degradação pelas quais os alimentos são reduzidos a seus componentes químicos (i.e., açúcares simples, aminoácidos, ácidos graxos). Estes, por sua vez, são utilizados para o crescimento celular, seja por microrganismos ruminais ou pelo hospedeiro animal (McALLISTER et al., 2001).

Para melhor compreender os limites do uso de enzimas alimentares, é necessário primeiro considerar as características específicas das enzimas. A natureza proteica tem implicações importantes quanto sua estabilidade durante a fabricação de alimentos e ao longo do trânsito no trato gastrointestinal (RAVINDRAN, 2013).



O processo catalítico de qualquer enzima é influenciado por fatores como a concentração do substrato, concentração da enzima, pH, temperatura e presença de ativadores ou inibidores (ROJO-RUBIO et al., 2007).

Baixas concentrações de substrato reduzem a velocidade da reação enzimática. Ao contrário, a velocidade tende a aumentar proporcionalmente com a inclusão de substrato em função da frequência de colisões entre a enzima e as moléculas reagentes. O efeito da adição de substrato se torna nulo à medida que a enzima alcança a velocidade máxima em se combinar com o reagente e formar produtos, atingindo o ponto de saturação. (Inserir citação – sobre o modo de ação)

Da mesma forma que ocorre para a maioria das reações químicas, a velocidade das reações catalisadas por enzimas geralmente aumenta com a elevação da temperatura devido ao aumento na energia cinética das moléculas e, conseqüentemente, a maior probabilidade de interação entre a enzima e o substrato. Porém, à altas temperaturas a maioria das enzimas sofrem mudanças conformacionais devido ao rompimento de ligações e interações fracas, um processo denominado desnaturação, que é irreversível (NELSON e COX, 2014).

O efeito do pH na atividade das enzimas se deve ao fato de essas serem constituídas por grupos químicos, principalmente aminoácidos, que podem ser ionizados e adquirir cargas temporárias, o que promove alterações nos grupos funcionais presentes na cadeia lateral, afetando o sistema “chave-fechadura”. O pH ótimo de uma enzima não é necessariamente idêntico ao do seu meio intracelular normal, isso sugere que a inter-relação pH atividade pode ser um fator de controle intracelular da atividade enzimática (CHAMPE et al., 2009).

Grande parte do poder catalítico das enzimas se deve a capacidade destas em interagir com o substrato em orientações favoráveis nos complexos enzima-substrato (ES). A inibição enzimática é um importante fator que tem sido explorado comercialmente. As enzimas podem ser inibidas por substâncias que se ligam à enzima livre ou ao complexo enzima-substrato ou competem pelo sítio catalítico da enzima (MONTEIRO e SILVA, 2009).

Vale destacar que as enzimas variam consideravelmente nas condições necessárias de reação dependendo de sua fonte (fungos vs. bactérias vs. leveduras). A fonte, portanto, tem grande influência sobre o grau de adaptação das enzimas em relação às condições prevalentes no trato digestivo, o que determina sua eficácia (RAVINDRAN, 2013).

### **2.2.1. Produção das enzimas**

Por mais de três décadas, enzimas têm sido empregadas para melhorar a eficiência da utilização de alimentos, e assim, solucionar problemas práticos no uso de rações como a redução da presença de fatores antinutricionais, aumento da digestibilidade dos constituintes da ração, redução da viscosidade no trato digestivo, inclusão de ingredientes de baixo custo e minimização de riscos ambientais relacionados com a eliminação de resíduos (MENEZES-BLACKBURN e GREINER, 2015).

A produção em larga escala de enzimas exógenas combina as ciências microbiologia, genética, bioquímica e engenharia com o princípio básico fermentação (SADHU e MAITI, 2013). Fermentação é a técnica biológica de conversão de substratos complexos em compostos simples por vários microrganismos, como bactérias e fungos (SUBRAMANIYAM e VIMALA, 2012). O método de fermentação é dividido em duas categorias, Fermentação no Estado Sólido (FES) e Fermentação Submersa (FSm) (MURAD e AZZAZ, 2010).

A FES é o cultivo de microrganismos em substratos sólidos úmidos como farelo, bagaço, palha de arroz, pasta de papel. Neste sistema, a água está presente no substrato sólido cuja capacidade de retenção varia com o tipo de material. Os substratos são utilizados de forma lenta e constante, podendo ser usados por longos períodos de fermentação. Assim, esta técnica suporta a liberação controlada de nutrientes. A FES é mais adequada para fermentação que envolve fungos e microrganismos que requerem menor conteúdo de umidade (SUBRAMANIYAM e VIMALA, 2012).

Em contraste, a FSm utiliza substratos líquidos de fluxo livre como melão e caldo de cultura. Neste sistema, tanto os nutrientes como os microrganismos são submersos em água. Os substratos são utilizados rapidamente e precisam ser constantemente suplementados com nutrientes. Os compostos bioativos são secretados no caldo de fermentação e a purificação de produtos é considerada mais fácil. Essa técnica é mais adequada para microrganismos como bactérias, que exigem alto teor de umidade (MURAD e AZZAZ, 2010).

A maior parcela das enzimas comerciais é produzida pelo método FSm, por permitir maior controle sobre as condições durante a fermentação. Por outro lado, o método FES desenvolve um contato firme com o substrato insolúvel, atingindo, assim, maior concentração de substrato para fermentação (SUJANI e SERESINHE, 2015).

As culturas resultantes são submetidas a processamento a jusante (i.e., centrifugação, filtração, desidratação) para assegurar que nenhum DNA recombinante geneticamente modificado seja detectado no produto final e que os resíduos de fermentação indesejáveis sejam removidos (SELINGER et al., 1996).

A proteína ativa é então formulada para estabilidade utilizando compostos tais como sorbitol e cloreto de sódio para assegurar as características gerais do produto. A tolerância térmica pode ser melhorada pelo uso de várias técnicas de revestimento, com a produção de um produto final granulado. Frequentemente, as enzimas de alimentação são fornecidas em uma variedade de concentrações, como produtos líquidos (geralmente para aplicação após peletização) ou produtos secos (ADEOLA e COWIESON, 2011).

Dentre as vantagens da utilização de microrganismos na produção de enzimas estão o rápido crescimento celular, curto tempo para produção de metabólitos, cepas com alto potencial de produção, meio de crescimento barato e fácil extração do produto (REIS et al., 2015).

As enzimas alimentares comerciais para ruminantes são produzidas utilizando sistemas de fermentação de espécies naturais e geneticamente modificadas derivadas principalmente de fungos (*Trichoderma reesei*, *T. longibrachiatum*, *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, e *Pichia pastoris*), e bactérias (*Bacillus subtilis*, *B. lentus*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, *L. bulgaricus*, *Enterococcus faecium* spp., *Escherichia coli* e *Penicillium funiculosum*) (RIBEIRO et al., 2016).

### **2.3. O futuro dos aditivos enzimáticos na produção de ruminantes**

A identificação das espécies, assim como o estudo do metabolismo das bactérias ruminais teve início após a Segunda Guerra Mundial através do desenvolvimento de técnicas de cultivo bacteriano em meio anaeróbico (KOZLOSKI, 2011). Apesar disso, estima-se que menos de 15% das bactérias do rúmen tenham sido cultivadas em laboratório (MORGAVI et al., 2013). A solução para este entrave tem sido examinar as comunidades microbianas como um todo ao invés de isolar espécies específicas. Esta abordagem recente foi denominada “meta-omics” (RIBEIRO et al., 2016).

O termo "meta-omics" indica um grupo definido de técnicas usadas para caracterizar comunidades de organismos: meta-genômica, meta-transcriptômica, meta-proteômica e metabolômica (PERŠOH, 2015). A metagenômica é o estudo de

todos os genes presentes no ecossistema e a metatranscriptômica o estudo de genes transcritos, a metaproteômica cataloga o complemento de proteína total da comunidade, e, por fim, a metabolômica quantifica os metabólitos (WALLACE et al., 2017).

A meta-genômica é a mais avançada dessas tecnologias e envolve o isolamento de fragmentos de DNA genômico de uma amostra da população ruminal, que é sequenciada, para identificar computacionalmente os microrganismos e reconstruir a comunidade microbiana. Essa abordagem pode ser usada não só para identificar os tipos de microrganismos presentes, mas também fornece informações sobre sua função metabólica naquele momento específico, possibilitando a compreensão de como as comunidades microbianas se adaptam ao seu ambiente (RIBEIRO et al., 2016).

A utilização destas tecnologias para examinar o rúmen possibilitou avanços no entendimento sobre a degradação da lignocelulose. Porém, até o momento, informações sobre os tipos de microorganismos e enzimas que estão presentes no rúmen não foram utilizadas para formular produtos de enzimas fibrolíticas que funcionem sob as condições do rúmen (i.e., faixa de pH 5,5-6,8; temperatura  $39 \pm 1^\circ\text{C}$ ) ou que atuem sinergicamente com as enzimas endógenas (RIBEIRO et al., 2016).

Um produto enzimático bem-sucedido terá de promover o aumento da biodegradação dos polissacarídeos da parede celular vegetal no rúmen, como as esterases do ácido ferúlico e as enzimas envolvidas na remoção da cadeia lateral da hemicelulose. As esterases microbianas cortam algumas das cadeias laterais e quebram as ligações cruzadas dos polímeros vegetais e, portanto, estão relacionadas com a solubilização da lignina e o aumento do acesso de outras enzimas à celulose e hemicelulose, aumentando a digestibilidade da forragem (JUNG e ALLEN, 1995).

#### **2.4. Enzimas exógenas na produção de ruminantes de interesse zootécnico**

Devido ação da microbiota ruminal, os ruminantes são únicos em sua capacidade de converter a biomassa lignocelulósica, constituída principalmente por três tipos de polímeros: (celulose, hemicelulose e lignina), em carne e leite para consumo humano (FLINT et al., 2008).

Dessa forma essa elevada capacidade é comercialmente explorada, o mercado mundial de enzimas para alimentos é dominado (cerca de 90%) pelas carboidrases e fitases, sendo as carboidrases o grupo mais importante utilizado como aditivo nas

dietas de ruminantes (ADEOLA e COWIESON, 2011). Carboidrases são enzimas que catalisam reações de degradação dos carboidratos, ou seja, reduzem os carboidratos de alto peso molecular em resíduos de menor peso molecular e baixa complexidade (NELSON e COX, 2014).

As preparações enzimáticas para ruminantes frequentemente são referidas como celulases ou xilanases. Contudo, nenhum desses produtos comerciais são preparações de enzimas únicas, atividades enzimáticas secundárias tais como amilases, proteases ou pectinases estão invariavelmente presentes (BEAUCHEMIN et al., 2010).

Isso é vantajoso por permitir uso diversificado de substratos que serão alvo de um único produto, mas apresenta problemas quanto ao controle de qualidade e extrapolação de resultados de pesquisa entre diferentes preparações, uma vez que, esses produtos não são padronizados para atividades secundárias (McALLISTER, 2001).

#### **2.4.1. Enzimas fibrolíticas**

A maioria das enzimas fibrolíticas produzidas comercialmente foi desenvolvida para as indústrias de alimentos, papel e celulose, têxtil, combustíveis e química (BHAT e HAZLEWOOD, 2001). Apesar disso, em termos de alimentação para ruminantes, as enzimas fibrolíticas são as mais pesquisadas pela comunidade científica com o intuito de reduzir a fração fibrosa do alimento e/ou aumentar a digestibilidade desta fração no ambiente ruminal e, assim, elevar a disponibilidade de energia das forragens aos ruminantes (REIS et al., 2015).

A celulase está entre as enzimas hidrolíticas de importância industrial. Refere-se a uma família de enzimas (enzimas fibrolíticas) que agem em conjunto para hidrolisar a fibra da parede celular da planta em glicose, celobiose ou celoligossacarídeos (MURAD e AZZAZ, 2010).

As enzimas celulolíticas têm sido tradicionalmente divididas em três classes: endoglucanases, exoglucanases e  $\beta$ -glicosidases. Endoglucanases hidrolisam ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 de cadeias de celulose intramoleculares para produzir novas extremidades. As exoglucanases clivam processualmente cadeias de celulose nas extremidades para liberar celobiose solúvel ou glicose. E as  $\beta$ -glucosidases hidrolisam a celobiose em glicose (KNOWLES et al., 1987).

Dean et al. (2013) investigaram o efeito do método de aplicação de uma enzima fibrolítica no desempenho de vacas em lactação. Os animais foram distribuídos em cinco tratamentos: 1) controle (sem adição de enzima); 2) enzima aplicada na ensilagem de capim bermuda (EES), 3) enzima adicionada na mistura com o concentrado (EC), 4) enzima adicionada à ração total (ERT), e 5) enzima incluída na silagem de capim bermuda (ES). Os autores reportaram que o consumo, a digestibilidade e a produção de leite não foram afetados pela adição de enzima. No entanto, em comparação a dieta controle, as vacas alimentadas com ERT tiveram menor concentração de  $\beta$ -hidroxibutirato (BHB) no sangue, e tenderam a ter maiores concentrações de proteína e gordura no leite e menor concentração de N-ureico no sangue. O pH ruminal tendeu a ser menor em vacas alimentadas com EC (pH=5,5), e a concentração ruminal de nitrogênio amoniacal (N-NH<sub>3</sub>) foi menor em vacas alimentadas com a dieta ERT. A concentração total de ácidos graxos voláteis e a razão acetato: propionato foram menores nas vacas que receberam ERT.

Peters et al. (2015) avaliaram o efeito de enzimas fibrolíticas exógenas (EFE) sobre o desempenho e parâmetros sanguíneos no início e terço-médio da lactação de vacas Holandesas. Não foram encontradas diferenças na digestibilidade da matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), fibra insolúvel em detergente neutro (FDN) e fibra insolúvel em detergente ácido (FDA), entre o controle e a suplementação de EFE na ração total. Também não foram observadas alterações na ingestão de matéria seca (IMS), produção de leite, leite corrigido para gordura e a energia corrigida para produção de leite. Como não houve efeito da EFE sobre a IMS e o balanço energético, o tratamento não influenciou os parâmetros sanguíneos observados, BHB, proteína total, bilirrubina total e enzimas hepáticas (aspartato aminotransferase e gama-glutamil transferase).

Esta inconsistência na resposta em distintos estudos tem sido atribuída a diferenças específicas da atividade enzimática, taxa de aplicação e composição, estágio de lactação de vacas leiteiras, modo e tempo de liberação de EFE, atividade microbiana ruminal, estabilidade de EFE no rúmen, tipo de alimentação, e a porção da dieta à qual EFE são aplicadas (BEAUCHEMIN et al., 2003; ADESOGAN, 2005).

He et al. (2014) avaliaram o efeito da adição de uma enzima fibrolítica exógena (EFE) em bovinos confinados alimentados com uma dieta contendo grãos secos de destilaria com solúveis (DDGS) de trigo. Os animais alimentados com DDGS de trigo tiveram menor digestibilidade da MS total. O aumento da adição da EFE teve efeito

linear positivo sobre a digestibilidade do amido sem afetar a digestibilidade de outros nutrientes. Também reduziu a concentração de  $N-NH_3$ , mas não afetou a concentração de ácidos graxos voláteis (AGV), além de, aumentar linearmente o desaparecimento ruminal *in situ* da MS e da FDN após 48h de incubação. Os animais alimentados com DDGS apresentaram menor conversão alimentar e maior número de fígados com abscessos em relação ao grupo controle. O aumento da aplicação de EFE nas dietas DDGS de trigo não afetou o CMS, o peso vivo final ou o ganho médio diário (GMD), mas tendeu a melhorar linearmente a eficiência alimentar e diminuiu a incidência de fígados com abscesso.

López-Aguirre et al. (2016) avaliaram o efeito de três produtos de enzimas fibrolíticas (celulase, xilanase e mistura 1:1 entre ambas) com três níveis de dosagem (0, 1 e 3  $\mu L$ .  $0,5 \text{ gMS}^{-1}$ ) através de fermentação *in vitro* da dieta de ovinos em crescimento. A produção de gás apresentou efeito linear para o tipo de enzima e a dose utilizada. A interação entre os tratamentos foi significativa para a produção de gases de 72h e 96h de incubação, sugerindo potencial para alterar a digestibilidade da fibra insolúvel em detergente ácido (FDA) e da matéria seca (MS).

Yuangklang et al. (2017) analisaram o desempenho e a digestão de macronutrientes em caprinos alimentados com ração total misturada (RTM) a base de palha de arroz e suplementação com enzimas fibrolíticas. Os autores observaram que a adição de enzimas fibrolíticas a ração aumentou a digestibilidade aparente de FDN e FDA em 10,0 e 9,1%, respectivamente. A suplementação enzimática elevou as concentrações de AG totais no líquido ruminal, com um aumento associado na proporção de acetato e contagem de bactérias totais, sem afetar o pH do fluido ruminal. Também houve aumento na concentração de  $N-NH_3$  do fluido ruminal após a alimentação contendo enzimas, mas a diferença absoluta em relação ao controle foi pequena. A suplementação com EFE aumentou o GMD em 34,7% e a eficiência de utilização da ração em 28%.

#### **2.4.2. Enzimas amilolíticas**

O amido é um polissacarídeo de reserva das plantas e é constituído por amilose e amilopectina. A amilose é um polímero não-ramificado de glicose (com ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4), enquanto a amilopectina é altamente ramificada (contendo ligações  $\alpha$ -1,6). Esses polissacarídeos são hidrolisados por amilases bacterianas do tipo  $\alpha$  e  $\beta$  e por  $\alpha$ -glicosidases. As  $\alpha$ -amilases são endoglicosidases, tendo a maltose

como produto final. As  $\beta$ -amilases são exoglicosidases e liberam glicose. Já as  $\alpha$ -glicosidases hidrolisam ambas ligações ( $\alpha$ -1,4 e  $\alpha$ -1,6) de oligossacarídeos, como a maltose e maltotriose (KOZLOSKI, 2011).

Algumas espécies de bactérias podem fermentar dextrinas e maltose, bem como amido, mas não podem usar a maioria dos mono e dissacarídeos. Outras, incapazes de iniciar a fermentação do próprio amido, podem associar-se com os principais responsáveis e talvez contribuir indiretamente com a remoção de produtos finais solúveis de fermentação (ØRSKOV e RYLE, 1990).

Nozière et al. (2014) avaliaram o efeito da inclusão de amilase exógena na digestão de dietas de baixo (20% na MS) e alto (30% na MS) amido em vacas leiteiras. A digestibilidade ruminal do amido aumentou 6,5% com a amilase exógena (AE), porém, essa diferença foi compensada no intestino, e a digestibilidade total do amido não diferiu entre os tratamentos. A dieta com alto teor de amido teve efeito negativo na digestibilidade da FDN e FDA. A adição da amilase aumentou a digestibilidade ruminal verdadeira da MO, mas não afetou o fluxo de N-microbiano no duodeno. A AE reduziu a proporção de acetato e butirato e aumentou a de propionato, particularmente na dieta rica em amido, onde tendeu a aumentar a concentração de AGV totais no rúmen. O principal efeito observado nas fermentações fecais foi uma redução na concentração total de AGV em dietas de alto amido suplementadas com amilase, havendo efeito oposto com a dieta com baixo teor de amido.

Vargas-Rodriguez et al. (2014) investigaram os efeitos da amilase e sacarose na dieta sobre a produtividade de vacas leiteiras alimentadas com baixo teor de amido (21% na MS). A produção e a composição do leite não foram alteradas pela inclusão de sacarose ou amilase. Não houve diferença na produção de leite corrigida para sólidos e gordura, embora o efeito direto da amilase tenha se aproximado da significância para ambas as variáveis, sugerindo pequeno aumento na suplementação desta. A eficiência alimentar aumentou numericamente com o tratamento com amilase ( $1,57 \pm 0,12$ ) ou sacarose ( $1,60 \pm 0,12$ ), mas a combinação dos dois resultou em eficiência alimentar similar ao tratamento controle (ambos  $1,50 \pm 0,12$ ). A inclusão de amilase ou sacarose não afetou a IMS, a produtividade ou a eficiência alimentar.

Andreazzi et al. (2018) analisaram o efeito da amilase exógena na lactação de vacas alimentadas com dieta rica em amido (32% na MS). A amilase aumentou a produção de leite (32,3 vs. 33,0 kg/d<sup>-1</sup>) e reduziu a IMS (20,7 vs. 19,7 kg/d), aumentando a eficiência alimentar (1,52 vs. 1,63). Também aumentou a síntese de



lactose do leite (1,49 vs. 1,56 kg/d) e a concentração de glicose no plasma (59,3 vs. 68,6 mg/dL). As secreções de gordura e proteína do leite não diferiram. Embora, o N-ureico do leite não tenha diferido, a amilase reduziu a concentração de ureia no sangue sugerindo aumento na degradação ruminal do amido. No entanto, a digestibilidade aparente do amido no trato total (96,3%) e da FDN (44,4%), perfil de fermentação ruminal e rendimento microbiano estimado pela excreção urinária de alantoína não diferiram.

Lee-Rangél et al. (2006) avaliaram o efeito da adição de enzima exógena glucoamilase durante diferentes períodos de tempo (15 e 50 dias de experimentação) e o desempenho de ovinos alimentados com uma dieta a base de sorgo. Não houve diferença para o ganho de peso, IMS e conversão alimentar. A digestibilidade da MS e da MO tenderam a aumentar quando a enzima foi adicionada por 50 dias. A digestibilidade do amido não foi influenciada pela suplementação com glucoamilase, o que pode ser explicado devido as condições ruminais serem diferentes daquelas necessárias à ótima atividade do *Aspergillus niger* (pH=4,5 e T=50°C).

#### **2.4.3. Complexos enzimáticos**

Os complexos enzimáticos geralmente são utilizados visando uma maior ação sobre diferentes substratos, ou seja, um maior número de enzimas seria capaz de degradar conjuntamente diversos tipos de substratos, visto que as dietas dos ruminantes em sua grande maioria são compostas por diferentes tipos de alimentos.

Oliveira et al. (2015) avaliaram o desempenho de bovinos suplementados com um complexo enzimático amilolítico e um produto contendo complexo multienzimático, de leveduras e mananoligossacarídeos. Não foram observadas diferenças para GMD, IMS, digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIMS), conversão alimentar e rendimento de carcaça. A porcentagem de amido residual fecal não foi influenciada pela suplementação com enzimas amilolíticas exógenas dos tratamentos amilase e complexo enzimático. A suplementação com as enzimas não influenciou o desempenho dos animais.

Brito (2010) investigou o desempenho de cordeiros suplementados com níveis crescentes de complexo enzimático (0,3, 0,9 e 2,7 g/Kg de MS). Os níveis de enzimas não apresentaram efeito sobre a IMS, GMD e a CA. A digestibilidade da FDN apresentou tendência de aumento linear com melhora de 11% para o último nível de acréscimo de enzimas em relação ao controle. O complexo enzimático não afetou as

concentrações plasmáticas de fósforo e glicose. Em relação a carcaça, os animais suplementados com enzimas apresentaram menores valores para rendimento de carcaça quente e fria em relação ao grupo controle. Não houve influência para os valores de área de olho de lombo e espessura da gordura subcutânea das carcaças.

### 3. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A falta de resultados sobre o desempenho em ruminantes pode estar ligada ao tipo de enzima utilizada, qualidade do alimento, tempo de ação sobre o substrato, pH, temperatura e dosagem da enzima na dieta, esses fatores tornam-se imprescindíveis no planejamento e utilização de enzimas na dieta de ruminantes.

O conhecimento sobre o funcionamento das enzimas na alimentação de ruminantes ainda é insipiente, mostrando apenas que novas pesquisas devem ser realizadas a fim de elucidar os mecanismos que regem a funcionalidade real dessas moléculas.

### 4. REFERÊNCIAS

ADEOLA, O.; COWIESON, A.J. Board-invited review: Opportunities and challenges in using exogenous enzymes to improve nonruminant animal production. **Journal of Animal Science**, v.89, n. 10, p. 3189–3218, 2011.

ADESOGAN, A.T.; KRUEGER, N.A.; KIM, S.C. A novel, automated system for measuring fermentation gas production kinetics of feeds and its application to feed characterization. **Animal Feed Science and Technology**, v. 123-124, n. 1, p. 211-223, 2005.

ANDREAZZI, A.S.R.; PEREIRA, M.N.; REIS, R.B. et al. Effect of exogenous amylase on lactation performance of dairy cows fed a high-starch diet. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 8, p. 1-9, 2018.

BEAUCHEMIN, K.A.; COLOMBATTO, D.; MORGAVI, D.P.; YANG, W.Z. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. **Journal of Animal Science**, v.81, Suppl.2, p.37–E47, 2003.

BERNARDES, T.F.; REGO, A.C. Study on the practices of silage production and utilization on Brazilian dairy farms. **Journal of Dairy Science**, v.97, p. 1852-1861, 2014.

BEAUCHEMIN, K.A.; HOLTSHAUSEN, L. Development in enzyme usage in ruminants. In: BEDFORD AND G, M. R.; PARTRIDGE, G. (Eds.) **Enzymes in Farm Animal Nutrition**. Oxfordshire: CAB International, p. 206–230. 2010.

BHAT, M.K.; HAZLEWOOD, G.P. **Enzymology and other characteristics of cellulases and xylanases**. In: BEDFORD, M.; PARTRIDGE, G. (Eds.). *Enzymes in farm animal nutrition*. Oxford: CABI Publishing, 11–60p. 2001.

BRITO, F.O. **Níveis de complexo enzimático em dietas para ruminantes**. 2010. 84 p. Dissertação (mestrado) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Pirassununga, 2010.

CAMPESTRINI, E.; DA SILVA, V.T.M.; APPELT, M.D. Utilização de enzimas na alimentação animal. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.2, n. 6, p. 259-272, 2005.

CERVIERI, R.C.; CARVALHO, J.C.F.; MARTINS, C.L. Evolução do manejo nutricional nos confinamentos brasileiros: importância da utilização de subprodutos da agroindústria em dietas de maior inclusão de concentrado. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE NUTRIÇÃO DE RUMINANTES: RECENTES AVANÇOS NA NUTRIÇÃO DE BOVINOS CONFINADOS, 4, 2009, Botucatu, SP. **Anais...** Botucatu: FMVZ, 2009, p. 2-22.

CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A.; FERRIER, D.R. **Bioquímica Ilustrada**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, p. 528, 2009.

COURI, S.; DAMASO, M. T. Cellulases and enzymes correlated produced by wild *Aspergillus niger* 12 and mutant *Aspergillus niger* 3T5B8 from tropical environmental. In: **Simpósio**. Inovação e Criatividade Científica na Embrapa, 1., Brasília, DF. 2008.

DEAN, D.B.; STAPLES, C.R.; LITTELL, R.C. et al. Effect of method of adding a fibrolytic enzyme to dairy cow diets on feed intake digestibility, milk production, ruminal fermentation, and blood metabolites. **Animal Nutrition and Feed Technology**, v. 13, p. 287-302, 2013.

ELGHANDOUR, M. M. Y.; SALEM, A. Z. M.; GONZALEZ-RONQUILLOA, M.; BÓRQUEZA, J. L.; GADOB, H. M.; ODONGOC, N. E.; PENUELASA, C. G. Effects of exogenous enzymes on in vitro gas production kinetics and ruminal fermentation of four fibrous feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v.179, p.46-53, 2013.

EUN, J.S.; BEAUCHEMIN, K.A. Effects of a proteolytic feed enzyme on intake, digestion, ruminal fermentation and milk production. **Journal of Dairy Science**, v.88, p.2140-2153, 2005.

FLINT, H.J.; BAYER, E.A., RINCON, M.T. et al. Polysaccharide utilization by gut bacteria: Potential for new insights from genomic analysis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, p. 121–131, 2008.

HE, Z.X.; HE, M.L.; WALKER, N.D. 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 steers. **Journal of Animal Science**, v. 92, p. 3978-3987, 2014.

JUNG, H.G.; ALLEN, M.S. Characteristics of plant cell walls affecting intake and digestibility of forages by ruminants. **Journal of Animal Science**, v. 73, n.9, p. 2774-2790, 1995.

KNOWLES, J.; LEHTOVAARA, P.; TEERI, T. Cellulase families and their genes. **Trends in Biotechnology**, v. 5, p. 255- 261, 1987.

KOZLOSKI, G.V. **Bioquímica dos Ruminantes**. 3. ed. Santa Maria, RS: Universidade Federal de Santa Maria, 216p. 2011.

LEE-RANGÉL, A.; MENDOZA, G.D.; PINOS-RODRÍGUEZ, J.M. et al. Effect of an exogenous glucoamylase during different periods of time on performance of lambs fed sorghum based diets. **Journal of Applied Animal Research**, v. 29, n.2, p. 141-144, 2006.

LÓPEZ-AGUIRRE, D.; HERNÁNDEZ-MELÉNDEZ, J.; ROJO, R. et al. In vitro gas production kinetics and degradability of a diet for growing lambs: effect of fibrolytic enzyme products at different dose levels. **Italian Journal of Animal Science**, v. 15, n. 3, p. 453-460, 2016.

McALLISTER, T.A.; HRISTOV, A.N.; BEAUCHEMIN, K.A. et al. Enzymes in ruminant diets. In: BEDFORD, M. R.; PARTRIDGE, G. G. (Eds.). **Enzymes in farm animal nutrition**. Oxford: CABI Publishing, 273-298p. 2001.

McCARTHY, M.M.; ENGSTROM, M.A.; AZEM, E.; GRESSLEY, T.F. The effect of an exogenous amylase on performance and total-tract digestibility in lactating dairy cows fed a high-byproduct diet. **Journal of Dairy Science**, v.96, p.3075-3084, 2013.

MENEZES-BLACKBURN, D.; GREINER, R. Enzymes used in animal feed: leading technologies and forthcoming developments. IN: CIRILLO, G.; SPIZZIRRI GIANFRANCO, U.; LEMMA, F. (Eds.). **Functional polymers in food science**, Massachusetts: Scrivener Publishing LLC, p. 47–73. 2015.

MORGAVI, D.P.; KELLY, W.J.; JANSSEN P.H. et al. Rumen microbial (meta)genomics and its application to ruminant production. **Animal**, v. supl.1, p. 184–201, 2013.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. **Revista Processos Químicos**, v. 3, n. 5, p.9-23, 2009.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: Artmed, 2011. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 960p, 2014.

NOZIÈRE, P.; STEINBERG, W.; SILBERBERG, M. et al. Amylase addition increases starch ruminal digestion in first-lactation cows fed high and low starch diets. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p. 2319-228, 2014.

OLIVEIRA, L.G.; FERREIRA, R.N.; PADUA, J.T. Performance of beef cattle bulls in feed lots and fed on diets containing enzymatic complex. **Acta Scientiarum**, v. 37, n. 2, p. 181-186, 2015.

ØRSKOV, E.R.; RYLE, M. **Energy nutrition in ruminants**. Barking: Elsevier Science Publishers Ltd, 149p. 1990.

PAULINO, P.V.R.; OLIVEIRA, T.S.; GIONBELI, M.P.; GALLO, S.B. Dietas sem forragem para terminação de animais ruminantes. **Revista Científica de Produção Animal**, v.15, n.2, p.161-172, 2013.

PERŠOH, D. Plant-associated fungal communities in the light of meta'omics. **Fungal Diversity**, v. 75, n.1, p.1-25, 2015.

PETERS, A.; ULRICH, M.; DÄNICKE, S. Effect of exogenous fibrolytic enzymes on performance and blood profile in early and mid-lactation Holstein cows. **Animal Nutrition**, v.1, p. 229-238, 2015.

RAVINDRAN, V. Feed enzymes: the science, practice, and metabolic realities. **Poultry Science Association**, v. 22, p. 628-636, 2013.

REIS, R. A.; LARA, E. C.; RABELO, C. H. S. Enzimas na nutrição de ruminantes. In: CONGRESSO NORDESTINO DE PRODUÇÃO ANIMAL, 10, 2015, Teresina, PI. **Anais...** Teresina: SNPA, p. 55-76. 2015.

RIBEIRO, G.O.; GRUNINGER, R.J.; BADHAN, A. et al. Mining the rumen for fibrolytic feed enzymes. **Animal Frontiers**, v.6, n. 2, p. 20–26, 2016.

ROJO-RUBIO, R.; MENDOZA-MARTÍNEZ, G.D.; MONTAÑEZ-VALDEZ, O.D. et al. Enzimas amilolítica exógenas en la alimentación de ruminantes, **Universidad y Ciencia**, v. 23, n. 2, p. 173–181, 2007.

RYAN, A. **Improving feedstuffs: enzymes in farm animal nutrition**. 2019. Disponível em: < <https://www.enzymeinnovation.com/author/visiture/>>. Acesso em: 28/02/2019.

SADHU, S.; MAITI, T.K. Cellulase production by bacteria: a review. **British Microbiology Research Journal**, v. 3, n.3, p. 235-258, 2013.

SELINGER, L.B.; FORSBERG, C.W.; CHENG, K.J. The rumen: a unique source of enzymes for enhancing livestock production. **Anaerobe**, v. 2, p. 263-284, 1996.

SILVA DE OLIVEIRA, J.; ZANINE, A.M.; SANTOS, E.M. Uso de aditivos na nutrição de ruminantes. **Revista Electrónica de Veterinaria RDVET**, v.6, n.11, p.1-23, 2005.

SUBRAMANIAM, R.; VIMALA, R. Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study. **International Journal of Sciences and Nature**, v.3, n.3, p. 480-486, 2012.

SUJANI, S.; SERESINHE, R.T. Exogenous enzymes in ruminant nutrition: a review. **Asian Journal of Animal Sciences**, v.9, n.3, p. 85-99, 2015.

SUMNER, J.B. The isolation and crystallization of the enzyme urease: preliminary paper. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 69, p. 435-441, 1926.

TANG, S.X.; TAYO, G.O.; TAN, Z.L.; SUN, Z.H.; SHEN, L.X.; ZHOU, C.S.; XIAO, W.J.; REN, G.P.; HAN, X.F.; SHEN, S.B. Effects of yeast culture and fibrolytic enzyme supplementation on in vitro fermentation characteristics of low- quality cereal straws. **Journal of Animal Science**, v.86, p. 1164-1172, 2008.

TAKIYA, C.S. **Enzima amilolítica exógena na alimentação de vacas em lactação**. 2016. 83p. Dissertação (mestrado) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Pirassununga, 2016.

THAMMIAH, V.; SAMANTA, A.K.; SENANI, S. et al. Scope of exogenous enzymes in enhancing ruminant productivity. **Journal of Dairy, Veterinary & Animal Research**, v. 5, n. 2, 2017.

TRICARICO, J.M, JOHNSTON, J.D., DAWSON, K.A. Dietary supplementation of ruminant diets with an *Aspergillus oryzae*  $\alpha$ -amylase. **Animal Feed Science and Technology**, 145, 136-150. 2008.

VAN NEVEL, C.J.; DEMEYER, D.I. Influence of antibiotics and a deaminase inhibitor on volatile fatty acids and methane production from detergent washed hay and soluble starch by rumen microbes in vitro. **Animal Feed Science Technology**, v.37, p.21-31, 1992.

VARGAS-RODRIGUEZ C.F.; ENGSTROM, M.; AZEM, E. et al. Effects of dietary amylase and sucrose on productivity of cows fed low-starch diets. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p. 1-7, 2014.

VERA, J.M.; SMITH, A.H.; ZOBELL, D.R.; YOUNG, A.J.; EUN, J.S. Effects of an exogenous proteolytic enzyme on growth performance of beef steers and in vitro ruminal fermentation in continuous cultures. **The Professional Animal Scientist**, v.28, p.452-463, 2012.

WALLACE, R.J.; SNELLING, T.J.; MCCARTNEY, C.A. et al. Application of meta-omics techniques to understand greenhouse gas emissions originating from ruminal metabolism. **Genetic Selection Evolution**, v.49, p. 1-9, 2017.

YANG, W. Z.; SON, Y. S.; BEAUCHEMIN, K. A. Effects of Exogenous Enzymes on Ruminal Fermentation and Degradability of Alfalfa Hay and Rice Straw. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v.24, n.1, p.56-64, 2011.

YUANGKLANG, C.; SCHONEWILLE, J.Th.; ALHAIDARY, A. et al. Growth performance and macronutrient digestion in goats fed a rice straw based ration supplemented with fibrolytic enzymes. **Small Ruminant Research**, v.154, p. 20-31, 2017.

**CAPÍTULO 2 - CONSUMO, DIGESTIBILIDADE, BALANÇO DE NITROGÊNIO E ENERGIA, COMPORTAMENTO INGESTIVO E METABÓLITOS SANGUÍNEOS DE BORREGAS ALIMENTADAS COM NÍVEIS CRESCENTES DE ENZIMA AMIOLÍTICA EXÓGENA NA DIETA**

---

Trabalho formatado de acordo com as normas do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (PPGcat) Tropical da Universidade Federal do Tocantins



## **Consumo, digestibilidade, balanço de nitrogênio e energia, comportamento ingestivo e metabólitos sanguíneos de borregas alimentadas com níveis crescentes de enzima amilolítica exógena na dieta**

**Resumo** – Objetivou-se avaliar o consumo, a digestibilidade, o balanço de nitrogênio e energia, o comportamento ingestivo e os metabólitos sanguíneos de borregas alimentadas com níveis crescentes de enzima amilolítica exógena na dieta. O ensaio foi realizado em delineamento em quadrado latino (5x5), com cinco tratamentos e cinco repetições. Foram utilizadas cinco borregas mestiças Santa Inês x Dorper com peso vivo inicial médio de  $54,04 \pm 4,5$  kg e aproximadamente oito meses de idade. Para condução do experimento todos os animais utilizados foram alojados em gaiolas metabólicas individuais, durante sessenta dias. Os tratamentos consistiram em dieta controle e quatro níveis de inclusão de enzima amilolítica 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0%. A enzima foi administrada diariamente aos animais no momento de oferta da dieta. Não foram observadas diferenças para o consumo dos nutrientes em ( $\text{g.animal}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ ), peso vivo ( $\%PV^{-1}$ ) e peso metabólico ( $PV^{-0,75}$ ). Houve diferença significativa para o coeficiente de digestibilidade aparente da matéria seca, matéria orgânica, carboidratos totais, carboidratos não fibrosos, nutrientes digestíveis totais e digestibilidade da energia bruta com inclusão de enzima exógena. A digestibilidade de energia bruta apresentou efeito quadrático com ponto de máxima em 0,82% de inclusão da enzima, mesmo comportamento observado para a digestibilidade da matéria seca. Não houve efeito significativo para o balanço de nitrogênio. A densidade da urina teve efeito linear crescente e acréscimo de 0,001 kg/L para cada 0,5% de inclusão de enzima. O peso das fezes na matéria natural e escore fecal respondeu de forma quadrática aos níveis de inclusão de enzimas na dieta. O comportamento e seleção de partículas pelos animais não foi afetado. Os metabólitos sanguíneos avaliados, assim como a glicemia não foram alterados com a inclusão da enzima amilolítica na dieta. A inclusão da enzima amilolítica exógena na dose de 1% da matéria seca da dieta melhora a digestibilidade aparente da matéria seca, carboidratos totais, carboidratos não fibrosos, nutrientes digestíveis totais e digestibilidade da energia bruta e não compromete o consumo de nutrientes, o balanço de nitrogênio, a glicemia e o comportamento ingestivo de borregas.

**Palavras-chave:** alfa-amilase, amido, nutrição, ovinos, seleção

## **Feed intake, digestibility, nitrogen and energy balance, feeding behavior and blood metabolites of ewe lambs fed diets with increasing levels of exogenous amylolytic enzyme**

**Abstract** – The objective of this study was to evaluate the feed intake, digestibility, nitrogen and energy balance, feeding behavior, and blood metabolites of ewe lambs fed diets with increasing levels of exogenous amylolytic enzyme. The experiment was conducted using a Latin square design (5x5), with five treatments and five replicates. Five Santa Inês x Dorper crossbred ewe lambs with a mean initial body weight of  $54.04 \pm 4.5$  kg and aged eight months were used. All animals were housed in individual metabolic cages for sixty days. The treatments consisted of a control diet and four inclusion levels of an amylolytic enzyme (0.5; 1.0; 1.5 and 2.0%). The enzyme was administered daily during feed supply. There was no significant difference for nutrient intake in  $\text{g}\cdot\text{animal}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ , as a percent of body weight ( $\%BW^{-1}$ ) and metabolic weight ( $BW^{0.75}$ ). There was a significant difference for apparent digestibility coefficient of dry matter, organic matter, total carbohydrates, non-fibrous carbohydrates, total digestible nutrients, and gross energy digestibility with enzyme inclusion. Enzyme level had a quadratic effect on gross energy digestibility, reaching its peak at 0.82% of enzyme inclusion. The same trend was observed for dry matter digestibility. There was no significant effect of enzyme inclusion on the nitrogen balance. The urine density increased linearly by 0.001 kg/L with each 0.5% of the enzyme. Enzyme inclusion had a quadratic effect on fecal output weight (organic matter basis) and fecal score. The feeding behavior and feed selectivity were not affected. The blood metabolites evaluated, as well as the blood glucose level, were not altered by the dietary inclusion of the amylolytic enzyme. The inclusion of the exogenous amylolytic enzyme at 1% of dietary dry matter improves the apparent digestibility of dry matter, total carbohydrates, non-fibrous carbohydrates, total digestible nutrients, and gross energy digestibility. Moreover, it does not compromise the nutrient intake, nitrogen balance, blood glucose level and feeding behavior of ewe lambs.

**Keywords:** alpha-amylase, feed selectivity, nutrition, sheep, starch.

## 1. INTRODUÇÃO

Os ruminantes são caracterizados pela especificidade em converter alimentos de baixa qualidade (forrageiras) em produtos altamente nutritivos para os seres humanos (KOZLOSKI, 2011). Devido a isso, as dietas são formuladas com elevada inclusão de volumoso, com intuito de aproveitar a eficiência microbiana na degradação da fibra e reduzir os custos com a alimentação. Contudo, a atual competição no mercado para atender à crescente demanda por produtos de origem animal, associado ao aumento da produção nacional de grãos e ao custo elevado de forragens conservadas, tem induzido a produção de ruminantes em sistemas de confinamento com alta proporção de concentrado na dieta (CERVIERI et al., 2009).

Todavia, é necessário ponderar que o ambiente ruminal possui limitações para o uso de dietas com alto percentual de concentrado, por provocar alterações no pH, perfil enzimático e produção de metabólitos, que podem ser prejudiciais aos animais hospedeiros. As amilases são enzimas que hidrolizam as moléculas de amido em polímeros compostos por unidades de glicose (REDDY et al., 2003), e estão associadas com o aumento na disponibilidade dos nutrientes e, assim, maior eficiência alimentar com reflexo no desempenho animal.

Porém, o entendimento sobre a atuação das enzimas exógenas no metabolismo dos ruminantes ainda não está totalmente esclarecido (REIS et al., 2015). Poucos trabalhos a respeito da utilização de enzimas amilolíticas na nutrição de ruminantes estão disponíveis na literatura, e além disso, as respostas encontradas para o desempenho animal não são conclusivas. A divergência entre os resultados tem sido associada a quantidade de enzimas ofertada, a porcentagem de amido na dieta, ao aporte energético dos animais e as características específicas necessárias para o ótimo funcionamento das enzimas que não coincidem com as condições do rúmen.

Diante do exposto, o trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar o consumo, a digestibilidade, o balanço de nitrogênio e energia, o comportamento ingestivo e os metabólitos sanguíneos de borregas alimentadas com níveis crescentes de enzima amilolítica exógena na dieta.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Local**

O experimento foi conduzido no setor de ovinos e caprinos situado nas dependências da Fazenda Capim Branco pertencente a Universidade Federal de Uberlândia - UFU, Uberlândia, Minas Gerais. O experimento foi realizado durante os meses de fevereiro a maio de 2017. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da UFU, registrado pelo protocolo de nº 017/16.

### **2.2 Animais**

Foram utilizadas cinco borregas mestiças Santa Inês x Dorper com peso inicial médio de  $54,04 \pm 4,5$  kg, escore da condição corporal médio de 4,5, e aproximadamente, oito meses de idade. No período de adaptação, todos os animais foram vermifugados, identificados, pesados e distribuídos aleatoriamente em gaiolas metabólicas, as quais eram providas de comedouro, bebedouro, cocho com sal mineral e dispositivo apropriado para coleta de fezes e urina. O experimento teve duração de sessenta dias, divididos em cinco períodos de 12 dias: cinco dias de adaptação dos animais as dietas experimentais e as gaiolas metabólicas; cinco dias de coleta sanguínea, e das excretas (fezes e urina); um dia para análise do comportamento ingestivo; e o último dia para avaliação da curva glicêmica dos animais, totalizando sete dias de coleta de dados.

Os animais foram pesados em balança própria para a espécie no primeiro dia do experimento e no último dia de cada período de coleta, obtendo-se, assim, o peso dos animais ao início e término de cada período experimental. O peso foi utilizado para cálculo do consumo em gramas por quilo de peso vivo ( $\%PV^{-1}$ ) e peso metabólico ( $PV^{-0,75}$ ) ajustando-se a quantidade de sobras a partir deste.

### **2.3 Alimentação**

Aa dietas foram calculadas para atender às exigências nutricionais de borregas de porte médio, com ganho médio de  $200 \text{ g.animal.dia}^{-1}$  (NRC, 2007). A ração era fornecida duas vezes ao dia, às 08h:00 e às 16h:00, na forma de ração total misturada (RTM), e o consumo era ajustado de acordo com as sobras do dia anterior, sendo admitido sobras de 5 a 10% do total fornecido.

Os animais receberam água e sal mineral *ad libitum*. As dietas eram compostas por silagem de milho e concentrado em uma proporção percentual 20V:80C. O concentrado era composto por milho moído, farelo de soja, sal mineral e ureia (Tabela 1).

**Tabela 1** – Proporção dos ingredientes na composição do concentrado experimental e composição bromatológica da silagem e do concentrado.

Ingredientes	g.Kg <sup>-1</sup>					
Milho Moído	605,0					
Farelo de Soja	360,0					
Ureia	10,0					
Sal Mineral	25,0					
Alimentos	MS	PB	FDN	FDA	NDT	EE
Concentrado	897,0	245,0	248,0	73,0	818,8	314,0
Silagem	340,0	65,0	566,0	336,0	631,7	24,0

Matéria Seca = MS; Proteína Bruta = PB; Fibra em Detergente Neutro = FDN; Fibra em Detergente Ácido = FDA; Nutrientes Digestíveis Totais = NDT; Extrato Etéreo = EE; Mínimo = mín.; Máximo = máx.

## 2.4 Enzima

A enzima utilizada é um produto comercial (AMAIZE™) composto por alfa-amilase com 600 u\*/g do produto (Tabela 2). Os níveis de enzimas foram calculados de acordo com as recomendações do fabricante, sendo cada porcentagem de enzima ajustada em função do consumo de matéria seca por animal por dia (kg.animal<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>). Para composição dos tratamentos, foram utilizados dois níveis acima e um nível abaixo da recomendação comercial do fabricante (0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0%) e o controle, sendo o nível recomendado 1,0%. A quantidade mínima de unidades de atividade enzimática alfa-amilase para cada tratamento foi 712; 1425; 2138; e 2851, respectivamente para os tratamentos 0,5; 1,0; 1,5; e 2,0%. A enzima foi misturada a ração no momento do fornecimento para os animais.

**Tabela 2** – Descrição do produto AMAIZE™ pelo fabricante.

Produto Amaize	Fonte
Enzima alfa-amilase	Produto seco de fermentação
Mín. 600 u*/g	de <i>Aspergillus oryzae</i>

\*Uma unidade de atividade enzimática alfa-amilase equivale a quantidade de enzima que dextriniza 1 grama de amido solúvel por minuto, a pH 4,8 e 30°C.

Aspecto: AMAIZE™ é um pó de coloração marrom.

## 2.5 Coleta de Dados

Nos baldes coletores de urina foram adicionados 100 mL de ácido clorídrico (HCl 2N) na véspera de cada coleta, evitando-se, assim, possíveis processos fermentativos que gerassem perda de nitrogênio por volatilização. O volume total de

urina foi medido com proveta graduada. Para cada animal foi retirada uma alíquota de 20% do volume total colhido diariamente e a amostra foi acondicionada em frasco plástico (uma amostra composta por animal por período experimental) e imediatamente congelada para posteriores análises. Também foi realizada a mensuração da densidade da urina através de refratômetro portátil.

As fezes passaram por um processo de avaliação de escore o qual foi realizado visualmente por um único avaliador, obedecendo à seguinte escala conforme Gomes (2008): 1 – fezes ressecadas e sem brilho; 2 – fezes normais; 3 – fezes ligeiramente amolecidas; 4 – fezes amolecidas perdendo o formato e coladas umas às outras (cacho de uva); 5 – fezes amolecidas e sem formato normal (fezes de suínos); e 6 – fezes diarreicas. Esse procedimento foi realizado durante os cinco dias de coleta.

A coleta total de fezes foi realizada diariamente. O peso da produção total era registrado, sendo reservada alíquota de 20%. Ao final de cada fase do experimento, foram preparadas amostras compostas, por animal, que foram embaladas em sacos plásticos individuais e armazenadas a  $-10^{\circ}\text{C}$ . No final do ensaio, as amostras compostas, foram descongeladas a temperatura ambiente por 12 horas, colocadas em bandejas de alumínio e levadas a estufa de ventilação forçada ( $55^{\circ}\text{C}$ ) até atingirem peso constante para determinar a matéria pré-seca. Posteriormente, as amostras foram moídas em moinho de facas com peneira de 1 mm e acondicionadas em recipientes plásticos para futuras análises.

As amostras de silagem, concentrado e sobras de alimento foram retiradas e pesadas diariamente e ao final dos cinco dias de coleta, foram misturadas e homogeneizadas para obtenção da amostra composta para cada animal por período experimental. Após isso, as amostras foram secas em estufa de ventilação forçada à  $55^{\circ}\text{C}$ , sendo, posteriormente, moídas em moinho de facas com peneira de 1 mm e acondicionadas para futuras análises laboratoriais.

Durante as fases de coleta foram disponibilizados 6 L de água animal<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup> em bebedouros individuais, sendo acrescentadas e registradas quantias adicionais de acordo com a ingestão dos animais. As sobras de água foram mensuradas diariamente através de proveta graduada, sendo os valores registrados para calcular o volume de água consumida. Dentro do galpão foi colocado um recipiente de mesmo volume dos bebedouros (6 L) para se mensurar a evaporação que, posteriormente, foi descontada do volume diário consumido para cada animal.

## 2.6 Análises Bromatológica

As análises laboratoriais foram realizadas nas dependências do Laboratório de Nutrição Animal da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia de UFT. Para as determinações de matéria seca, cinzas, extrato etéreo e proteína bruta do material analisado seguiu-se a metodologia proposta por AOAC (1995). Já para a quantificação da fibra em detergente neutro, fibra em detergente ácido, celulose, hemiceluloses e ligninas utilizou-se a metodologia proposta por Van Soest et al. (1991). Para estimativa dos carboidratos totais (CHT) usou-se a equação proposta por Sniffen et al. (1992), segundo a qual,  $CHT = 100 - (\%PB + \%EE + \%MM)$  e, para a estimativa dos carboidratos não fibrosos (CNF) da silagem foi usada a equação preconizada por Hall et al. (1999), qual seja,  $CNF = \%CHT - \%FDN_{cp}$ , sendo  $FDN_{cp}$  a porção de FDN corrigida para cinzas e proteína e em razão da presença de uréia nas dietas, os carboidratos não-fibrosos (CNF) dos concentrados foram estimados como proposto por Hall et al. (2000), em que  $\%CNF = 100 - [(\%PB - \%PB \text{ derivada da uréia} + \% \text{ de uréia} + \%EE + \%FDN + \%cinzas)]$ .

Para o cálculo dos nutrientes digestíveis totais (NDT) no ensaio de digestibilidade utilizou-se a equação sugerida por Weiss (1999):

$$NDT = [PBD + CNFD + FDN_{cpD} + (EED * 2,25)]$$

Onde, PBD; CNFD;  $FDN_{cpD}$  e EED significam, respectivamente, consumo de PB, CNF, FDN e EE digestíveis, com a FDN corrigida para cinzas e proteína.

Após a pré-secagem das amostras de sobras e fezes, em estufa a 105°C por 24 horas, foi possível calcular a matéria seca definitiva e o teor dos nutrientes, e posteriormente, a digestibilidade aparente destes.

Primeiramente, foi calculado o consumo de nutrientes a partir da fórmula proposta por Maynard et al. (1984):

$$CNut = (Cons \times \%Cons) - (Sob \times \%Sob)$$

Onde:

CNut = consumo do nutriente (kg);

Cons = quantidade de alimento consumido (kg);

%Cons = teor do nutriente no alimento fornecido (%);

Sob = quantidade de sobra retirada (kg);

%Sob = teor do nutriente nas sobras (%).

Os coeficientes de digestibilidade de matéria seca, matéria orgânica, proteína bruta, extrato etéreo, fibra em detergente neutro, fibra em detergente ácido, celulose, hemiceluloses e energia bruta foram feitos a partir da seguinte fórmula, de acordo com Silva e Leão (1979).

$$CDap = \frac{(Ingerido - Excretado)}{Ingerido} \times 100$$

Onde:

CDap = coeficiente de digestibilidade aparente (%);

Ingerido = média da quantidade de nutrientes do alimento ingerido (ofertado – sobras) (kg/dia);

Excretado = média da quantidade de nutriente nas fezes (kg/dia).

O teor de nitrogênio (N) na urina foi determinado pelo método Kjeldahl (SILVA e QUEIROZ, 2002), com as seguintes adaptações:

- Em um mL de amostra de urina, foram adicionados 5 mL de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e mistura catalítica em um tubo de ensaio;
- Iniciou-se a digestão das amostras em 50°C e aumentou-se a temperatura gradualmente (a cada 50 °C) até ocorrer a mudança de cor da amostra;
- Posteriormente, fez-se a destilação das amostras, adicionando um pouco de água destilada a amostra digerida. No aparelho de destilação adicionou-se 25 mL de hidróxido de sódio 50% (NaOH) e 20 mL de ácido bórico (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>) em erlenmeyer. O volume de amostra destilada coletada foi de 100 mL;
- Após a destilação, a amostra foi titulada utilizando ácido clorídrico (HCl) a 0,1N, adicionando o ácido até observar mudança na cor;
- A quantidade de ácido gasto na titulação foi utilizada para calcular o teor de N da amostra, através da fórmula:



$$\%N = \frac{V \times FC \times N \times 0,014}{P} \times 100$$

Onde:

V = volume de HCl 0,1N gasto na titulação;

FC = fator de correção do HCl 0,1N;

N = normalidade do ácido utilizado na titulação; 0,014 = miliequivalente-grama do nitrogênio;

P = peso da amostra em gramas.

Posteriormente, foi calculado o consumo de N (CN) através da fórmula:

$$CN = [(N \text{ fornecido } (g) - N \text{ das Sobras}(g))$$

O balanço de nitrogênio (BN), ou nitrogênio retido, foi obtido utilizando-se a fórmula proposta por Zeoula et al. (2006), considerando-se as quantidades de nitrogênio consumido (NC); nitrogênio excretado nas fezes (NF) e nitrogênio excretado na urina (NU).

$$BN = [(N \text{ fornecido } g - N \text{ das sobras } g) - (N \text{ nas fezes } g + N \text{ na urina } g)]$$

A partir destes valores, foi realizado o cálculo para nitrogênio de excreção total (NET) e nitrogênio endógeno basal (NEB) de acordo com o AFRC (1993), que considera o N endógeno tecidual e as perdas dérmicas de N como 0,35 e 0,018 do peso metabólico, respectivamente.

Assim, os valores foram expressos como:

$$NET(g.d)^{-1} = (NF + NU)$$

$$NEB(g.d)^{-1} = (0,35 + 0,018) \times PV^{0,75}$$

A energia bruta (EB) foi obtida em calorímetro adiabático modelo PARR 6200. Os valores da energia digestível (ED) foram calculados utilizando-se a técnica direta

de determinação de energia com bomba calorimétrica. Para isso, foi medida a energia contida nas fezes, no alimento ofertado e nas sobras do alimento.

A energia metabolizável foi obtida através da fórmula de Blaxter e Clapperton (1965), na qual a ED é igual a EB ingerida menos a EB excretada nas fezes. Já a EM é igual à ED menos a EB da urina mais a energia dos gases (EG).

A produção de metano foi estimada pela seguinte equação:

$$Cm = 0,67 + 0,062 \times D$$

Onde:

Cm = produção de metano em kcal/ 100 kcal de energia consumida; e

D = digestibilidade aparente da energia bruta do alimento.

A estimativa da energia bruta da urina foi realizada segundo a equação proposta por Street et al. (1964):

$$EU, kcal. gm = 0.027 + 0.119 \times (\%NU)$$

## 2.7 Avaliação Comportamental

Para a avaliação do comportamento ingestivo, os animais foram submetidos a observação visual por 24 horas no penúltimo dia de cada período de coleta de dados, perfazendo um total de cinco avaliações comportamentais durante o experimento. Durante o período noturno, o ambiente recebeu iluminação artificial, e por isso, os animais foram pré-adaptados durante um período de cinco dias. Foram observadas, a cada cinco minutos, as variáveis de ingestão de alimento e de água, ruminação e ócio, de acordo com a metodologia proposta por Fischer et al. (1998). As observações comportamentais foram realizadas por observadores treinados, em sistema de revezamento, que se posicionavam de forma estratégica, de modo a não influenciar o comportamento natural dos animais. As observações foram iniciadas às 8h:00 da manhã com término no mesmo horário do dia seguinte. Os cálculos das atividades foram feitos em minutos por dia, admitindo-se que nos cinco minutos subsequentes a cada observação o animal permaneceu na mesma atividade. Já o tempo total de mastigação foi determinado somando-se os tempos de ingestão e ruminação.

A eficiência alimentar em função do consumo de MS, FDN e FDA foi calculada dividindo-se o consumo destas variáveis pelo tempo gasto em horas de ingestão, ruminação e mastigação.

$$EIng = (CMS/CFDN/CFDA)g \div Ingest\tilde{a}o (h)$$

$$ERum = (CMS/CFDN/CFDA)g \div Rumina\tilde{c}\tilde{a}o (h)$$

$$EMast = (CMS/CFDN/CFDA)g \div Mastiga\tilde{c}\tilde{a}o (h)$$

Onde:

EIng = eficiência de ingestão em grama por hora;

ERum = eficiência de ruminação em grama por hora;

EMast = eficiência de mastigação em grama por hora.

## 2.8 Tamanho de Partícula

Para avaliação do tamanho de partícula da ração total misturada (RTM) e das sobras utilizou-se o separador de partícula modelo Penn State Particle Size (PSPS), que continha quatro peneiras, nas quais ficavam retidos diferentes tamanhos de partículas, sendo eles: >19 mm, entre 19 mm e 8 mm, entre 8 mm e 1,18 mm e partículas <1,18 mm. O uso do PSPS seguiu a metodologia descrita por Kononoff et al. (2003). Eram realizados cinco movimentos de vai e vem em um dos lados da peneira, e então o conjunto era girado em 90°, isso se repetiu por oito vezes, totalizando quarenta movimentos, o conteúdo retido em cada peneira era então pesado.

Para essa avaliação, 2 kg de amostra das RTM's e das sobras foram, individualmente, homogeneizadas e quarteadas ao final de cada período experimental de forma a se obter quatro amostras de 500 g, as quais foram processadas no PSPS para se obter a média do tamanho de partícula para cada peneira, por tratamento em cada fase. Na Tabela 3 está apresentado o perfil de distribuição de partículas das RTM's da dieta oferecida da silagem e do concentrado.

**Tabela 3** – Perfil de distribuição descritiva das partículas da RTM do ofertado, da silagem e do concentrado (%) em função dos tamanhos de partículas.

Itens	> 19 mm (%)	19 mm<8 mm (%)	8 mm<1,18 mm (%)	<1,18 mm (%)
RTM	2,8	14,3	46,6	36,3
Silagem	17,2	53,2	26,6	3,0
Concentrado	0,04	0,08	44,0	54,8

RTM = Ração Total Misturada; Milímetros = mm.

## 2.9 Análises Sanguíneas

As coletas de sangue foram realizadas sempre antes da primeira refeição do dia, sendo três coletas por período experimental de digestibilidade, para realização de média dos parâmetros sanguíneos avaliados. As coletas foram feitas por venopunção jugular com auxílio de *vacuntainer*<sup>®</sup> e tubo de ensaio com capacidade de 10 mL sem anticoagulante. Posteriormente, as amostras de sangue foram centrifugadas por 10 minutos a 4.000 rpm e os plasmas obtidos eram armazenados em flaconetes, devidamente identificados, sendo mantidos sob refrigeração a -8 °C. Os indicadores bioquímicos determinados no sangue foram: creatinina, ureia, ácido úrico, proteínas totais, albumina, colesterol, triglicerídeos, aspartatoaminotransferase (AST), gama-glutamilttransferase (GGT) e fosfatase alcalina (FA). As análises bioquímicas no plasma foram feitas utilizando-se kits comerciais da Labtest<sup>®</sup>, em espectrofotômetro da marca Bioplus<sup>®</sup> 2000.

Para mensuração da glicemia referente a cada fase experimental, as coletas de sangue foram realizadas por venopunção jugular em tubos siliconizados com anticoagulante (Fluoreto de Sódio com EDTA 10%). O sangue foi centrifugado e o plasma armazenado em flaconetes para posteriores análises de glicose. Os tempos de coleta pré-estabelecidos foram 0 h (antes do fornecimento da ração), 3h, 6h, 9h e 12h pós-prandial. As análises das amostras sanguíneas obtidas durante o período experimental foram procedidas no Laboratório de Análise de Alimentos pertencente ao curso de Zootecnia da UFU, Campus Umuarama.

## 2.10 Delineamento e Análise Estatística

O ensaio foi realizado em um delineamento em quadrado latino (5x5) para os parâmetros de fluxo descontínuo e em um delineamento em quadrado latino (5x5) com medidas repetidas no tempo para os parâmetros de fluxo contínuo (análises sanguíneas), sendo os tratamentos os níveis de inclusão das enzimas nas dietas e as

medidas repetidas no tempo, os tempos de coleta (0, 3, 6, 9 e 12h) com cinco repetições, segundo os seguintes modelos estatísticos:

$$Y_{ijl} = \mu + D_j + A_j + PI + e_{ijl}$$

Onde:

$Y_{ijl}$  = valor referente a observação da repetição  $i$  no tratamento, na linha  $j$  e na coluna  $l$

$\mu$  = média geral

$D_i$  = efeito dos tratamentos (dietas)  $i$  ( $i = 0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0\%$ )

$A_j$  = efeito das linhas (animais)  $j$  ( $j = 1; 2; 3; 4; 5$ )

$PI$  = efeito das colunas (períodos)  $l$  ( $l = 1; 2; 3; 4; 5$ )

$e_{ijk}$  = erro aleatório associado a observação.

$$Y_{ijkl} = \mu + D_j + A_j + PI + T_k + FT_{jk} + e_{ijkl}$$

Onde:

$Y_{ijkl}$  = valor referente a observação da repetição  $i$  no tratamento, na linha  $j$ , na coluna  $l$  e no tempo de coleta  $k$

$\mu$  = média geral

$D_i$  = efeito dos tratamentos (dietas)  $i$  ( $i = 0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0\%$ )

$A_j$  = efeito das linhas (animais)  $j$  ( $j = 1; 2; 3; 4; 5$ )

$PI$  = efeito das colunas (períodos)  $l$  ( $l = 1; 2; 3; 4; 5$ )

$T_k$  = efeito do tempo de coleta  $k$  ( $k = 3; 6, 9$  e  $12h$ )

$DT_{jk}$  = interação dos efeitos do tratamento  $j$  com o tempo de coleta  $k$

$e_{ijkl}$  = erro aleatório associado a observação.

Os dados foram submetidos aos testes de Shapiro e Wilk (1965) e Bartlett (1937) para testar os pressupostos de normalidade e homocedasticidade, respectivamente. Após aceitas as pressuposições citadas acima, os resultados foram submetidos a análise de regressão para associar os níveis de enzimas na dieta aos resultados e os tempos de coleta aos resultados. Observou-se como nível de significância 0,05 de probabilidade de erro tipo I, para tomada de decisão quanto ao modelo que melhor explique os resultados.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O consumo de matéria seca (CMS), matéria orgânica (CMO), proteína bruta (CPB), extrato etéreo (CEE), fibra em detergente neutro (CFDN), fibra em detergente ácido (CFDA), carboidrato total (CCHT), carboidrato não fibroso (CCNF), hemicelulose (CHem), celulose (CCel) e nutrientes digestíveis totais (CNDT) em ( $\text{g.animal}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ ,  $\%PV^{-1}$  e  $\text{g.kg.PV}^{-0,75}$ ), não foram influenciados ( $P>0,05$ ) pela inclusão da enzima na dieta (Tabela 4). O CMS  $\text{g.animal}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  médio encontrado no presente estudo foi de 1084,0  $\text{g.animal}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  sendo inferior ao obtido por Lee-Rangél et al. (2006) que avaliaram a adição de enzima glicoamilase e observaram média de 1283,2  $\text{g.animal}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  para cordeiros mestiços Suffolk. Mota et al. (2011) trabalhando com cordeiros mestiços Suffolk alimentados com dietas de alto grão e enzima glicoamilase também não observaram melhoria na ingestão de MS.

Um dos fatores que pode explicar este CMS abaixo do recomendado é que, à medida que os animais foram se desenvolvendo ao longo do período experimental houve uma queda linear para essas variáveis, ou seja, conforme se aumentou o peso, as borregas reduziram a ingestão de MS em relação ao PV. Como a ingestão de alimento de boa qualidade é controlada essencialmente pela exigência de manutenção e produção, este resultado fisiológico era esperado, uma vez que, com o desenvolvimento dos animais, há uma diminuição da energia necessária para produção, com conseqüente queda no consumo de alimento em relação ao peso corporal.

Enzimas exógenas podem promover melhorias nos parâmetros da cinética de fermentação ruminal (ELGHANDOUR et al., 2013), assim sendo, esperava-se com a inclusão da enzima amilolítica, aumentar a ingestão de matéria seca e conseqüentemente a ingestão dos nutrientes da dieta, uma vez que as enzimas têm função de degradação aumentando a velocidade de quebra e digestão dos nutrientes, o que por sua vez, retroalimenta a ingestão de matéria seca por permitir uma maior taxa de passagem de nutrientes digeridos.

Contudo, diversos fatores regem a variabilidade de resposta na utilização de enzimas, isso ocorre devido a mecanismos que ainda precisam ser melhor compreendidos (YANG et al., 2011) como diferenças na atividade enzimática, taxa e composição da aplicação, modo e tempo de contato enzimático, ambiente ruminal, estabilidade enzimática neste ambiente, e especificidade enzimática (ADESOGAN, 2014).

**Tabela 4** - Consumo de nutrientes em grama animal dia (g.animal<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>), em função do peso vivo (%PV<sup>-1</sup>) e em função do peso metabólico (PV<sup>-0,75</sup>) de borregas alimentadas com diferentes níveis de enzima amilolítica exógena na dieta.

Variáveis	Tratamentos							Valor de P			CV (%)
	0%	0,5%	1,0%	1,5%	2,0%	L	Q	DL			
CMS (g.animal <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	1128,2	1096,5	1073,3	1099,1	1067,5	0,559	0,831	0,910	12,87		
CMS (%PV <sup>-1</sup> )	1,85	1,80	1,76	1,77	1,73	0,425	0,847	0,967	13,10		
CMS (g.kg.PV <sup>-0,75</sup> )	51,79	50,41	49,19	49,76	48,58	0,456	0,844	0,957	13,00		
CMO (g.animal <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	942,00	910,00	889,00	910,00	883,00	0,536	0,815	0,920	14,44		
CMO (%PV <sup>-1</sup> )	1,55	1,50	1,45	1,47	1,43	0,408	0,823	0,970	14,70		
CMO (g.kg.PV <sup>-0,75</sup> )	43,28	41,89	40,75	41,21	40,19	0,438	0,822	0,961	14,60		
CPB (g.animal <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	257,00	259,00	244,00	259,00	244,00	0,623	0,926	0,709	14,15		
CPBP (%PV <sup>-1</sup> )	0,42	0,43	0,40	0,42	0,40	0,502	0,906	0,752	14,24		
CPB (g.kg.PV <sup>-0,75</sup> )	11,78	11,94	11,20	11,77	11,12	0,531	0,910	0,743	14,17		
CEE (g.animal <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	45,10	43,15	42,44	43,75	43,31	0,699	0,581	0,901	12,20		
CEE (%PV <sup>-1</sup> )	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,548	0,609	0,969	12,56		
CEE (g.kg.PV <sup>-0,75</sup> )	2,06	1,98	1,94	1,98	1,97	0,584	0,602	0,958	12,42		
CFDN (g.animal <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	210,70	199,80	196,33	192,18	189,99	0,228	0,721	0,985	13,80		
CFDN (%PV <sup>-1</sup> )	0,35	0,33	0,32	0,31	0,31	0,154	0,794	0,984	14,23		
CFDN (g.kg.PV <sup>-0,75</sup> )	9,65	9,20	9,00	8,68	8,60	0,170	0,776	0,987	14,08		
CFDA (g.animal <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	72,00	67,00	66,00	62,00	61,00	0,208	0,768	0,962	18,84		
CFDA (%PV <sup>-1</sup> )	0,12	0,11	0,11	0,10	0,10	0,144	0,830	0,949	19,43		
CFDA (g.kg.PV <sup>-0,75</sup> )	33,00	30,00	30,00	28,00	28,00	0,157	0,814	0,953	19,25		

CHEM (g.animal <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	138,00	132,00	129,00	129,00	127,00	0,256	0,688	0,978	11,51
CHEM (%PV <sup>-1</sup> )	0,23	0,22	0,21	0,21	0,21	0,173	0,769	0,998	11,89
CHEM (g.kg.PV <sup>-0,75</sup> )	6,34	6,10	5,95	5,84	5,77	0,190	0,749	0,998	11,75
CCel (g.animal <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	66,00	61,00	60,00	57,00	57,00	0,196	0,756	0,959	19,51
CCel (%PV <sup>-1</sup> )	0,11	0,10	0,10	0,09	0,09	0,136	0,820	0,950	20,15
CCel (g.kg.PV <sup>-0,75</sup> )	3,05	2,84	2,79	2,59	2,57	0,148	0,804	0,953	19,96
CCHT (g.animal <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	640,00	607,00	601,00	607,00	595,00	0,501	0,735	0,945	14,95
CCHT (%PV <sup>-1</sup> )	1,06	1,00	0,99	0,98	0,97	0,375	0,738	0,981	15,28
CCHT (g.kg.PV <sup>-0,75</sup> )	29,42	27,95	27,59	27,45	27,08	0,403	0,738	0,975	15,16
CCNF (g.animal <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	583,00	611,00	563,00	619,00	572,00	0,909	0,739	0,465	13,78
CCNF (%PV <sup>-1</sup> )	0,96	1,01	0,92	1,00	0,93	0,808	0,734	0,494	14,00
CCNF (g.kg.PV <sup>-0,75</sup> )	26,67	28,08	25,78	28,10	26,10	0,834	0,733	0,487	13,90
CNDT (g.animal <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	935,47	910,77	891,03	916,55	889,29	0,607	0,840	0,894	12,77
CNDT (%PV <sup>-1</sup> )	1,53	1,50	1,46	1,48	1,44	0,469	0,852	0,956	12,99
CNDT (g.kg.PV <sup>-0,75</sup> )	42,92	41,87	40,84	41,50	40,47	0,501	0,850	0,945	12,90

Consumo de matéria seca – CMS; Consumo de matéria orgânica – CMO; Consumo de proteína bruta – CPB; Consumo de extrato etéreo – CEE; Consumo de fibra em detergente neutro – CFDN; Consumo de fibra em detergente ácido – CFDA; Consumo de carboidrato total – CCHT; Consumo de carboidrato não fibroso – CCNF; Consumo de hemicelulose – CHem; Consumo de celulose – C Cel; Consumo de nutrientes digestíveis totais – CNDT, em grama animal dia (g.animal<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>); porcentagem do peso vivo – (%PV<sup>-1</sup>) e grama por quilograma de peso metabólico – (g.PV<sup>-0,75</sup>); Probabilidade do efeito do tratamento; Efeito: L: Linear e Q: Quadrático. Desvio da linearidade (DL); Coeficiente de variação em % (CV).



Na Tabela 5 pode-se observar que houve influência ( $P < 0,05$ ) dos tratamentos sobre a digestibilidade aparente da matéria seca (DMS), matéria orgânica (DMO), carboidrato total (DCHT), carboidrato não fibroso (DCNF) e nutrientes digestíveis totais (NDT). No presente trabalho a DMS foi de 77,67% para o controle e média de 81% com a adição de enzima, sendo que os maiores valores foram observados com a inclusão de enzima nos níveis de 1,0 e 1,5%, apresentando DMS de 83,24 e 82,57%, respectivamente. Cabe ressaltar que, a DMS apresentou comportamento quadrático e que o ponto de máxima estimado para DMS foi de 0,82% de inclusão de enzima.

**Tabela 5** - Digestibilidade aparente dos nutrientes em borregas alimentadas com diferentes níveis de enzima amilolítica exógena na dieta.

Variáveis	Tratamentos					Valor de P			CV
	0%	0,5%	1,0%	1,5%	2,0%	L	Q	DL	
DMS (%)	77,67	80,80	83,24	82,57	80,64	0,048	0,008 <sup>1</sup>	0,889	3,06
DMO (%)	84,35	87,21	88,90	88,36	87,26	0,043	0,016 <sup>2</sup>	0,927	2,490
DPB (%)	86,13	87,77	89,44	89,28	88,08	0,141	0,088	0,911	2,780
DEE (%)	90,17	91,88	92,8	92,37	91,93	0,111	0,064	0,904	1,800
DFDN (%)	65,12	71,06	75,02	73,02	71,20	0,093	0,037	0,853	7,690
DFDA (%)	59,34	65,44	70,34	68,31	65,78	0,103	0,041	0,875	9,600
DHem (%)	68,29	74,16	77,60	75,61	74,18	0,089	0,035	0,822	6,830
DCel (%)	57,26	63,67	68,89	66,73	64,04	0,104	0,041	0,871	10,400
DCHT (%)	83,30	86,69	88,44	87,75	86,64	0,042	0,015 <sup>3</sup>	0,892	2,770
DCNF (%)	92,00	94,19	94,57	94,75	93,89	0,029	0,010 <sup>4</sup>	0,792	1,320
DNDT (%)	85,00	88,00	89,00	89,00	88,00	0,037	0,018 <sup>5</sup>	0,946	2,220

$$^1Y = 77,557441 + 9,09588X - 3,774032X^2 \quad (R^2=98,43\%);$$

$$^2Y = 84,379395 + 7,184492X - 2,896767 X^2 \quad (R^2=98,83\%);$$

$$^3Y = 83,390802 + 8,077888X - 3,266243 X^2 \quad (R^2=98,30\%);$$

$$^4Y = 92,113007 + 4,477272X - 1,803309X^2 \quad (R^2=97,00\%);$$

$$^5Y = 85,824501 + 6,429068X - 2,563797X^2 \quad (R^2=99,14\%).$$

Digestibilidade da matéria seca – DMS; Digestibilidade da matéria orgânica – DMO; Digestibilidade da proteína bruta – DPB; Digestibilidade do extrato etéreo – DEE; Digestibilidade da fibra em detergente neutro – DFDN; Digestibilidade de carboidrato total – DCHT; Digestibilidade de carboidrato não fibroso – DCNF; Digestibilidade de hemicelulose – DHem; Digestibilidade de celulose – DCel; Digestibilidade de nutrientes digestíveis totais – DNDT; Probabilidade do efeito do tratamento – P; Efeito: L: Linear e Q: Quadrático. Desvio da linearidade (DL); Coeficiente de variação em % (CV).

O efeito quadrático para a DMS no presente trabalho pode ser explicado pela dosagem da enzima na dieta em cada tratamento, uma vez que, sub-dosagens podem não apresentar efeito significativo sobre a degradação de um nutriente no ambiente

ruminal, e super-dosagens podem exceder o limite máximo de enzimas e ocasionar competição por sítios de adesão e degradação enzimática com os microrganismos ruminais, diminuindo dessa forma, a eficiência ruminal e afetando a digestão total no trato gastrointestinal (ROJO et al., 2007).

Crosby et al. (2006) trabalhando com ovelhas Criola x Suffolk recebendo níveis crescentes (0,0; 0,6; 1,2; 1,8; 2,4 e 3,0g) de enzima amilolítica na dieta observaram melhoria na digestibilidade aparente da matéria seca de 72,8% com o tratamento controle para 81,7% com a adição de enzima.

Os pontos de máxima calculados para DMO e DNDT foram respectivamente 0,88 e 0,89% de inclusão da enzima, estando bem próximo do ponto de máxima calculado para DMS que foi 0,82%. Houve efeito ( $P < 0,05$ ) quadrático para a DCHT e DCNF apresentando pontos de máxima calculados em 0,88 e 0,94% de inclusão da enzima, respectivamente. Com a utilização de enzima amilolítica na dieta esperava-se que houvesse um aumento na digestibilidade do amido afetando dessa forma a DCNF linearmente, contudo isso não ocorreu, mostrando que existe um limite máximo de utilização e aproveitamento da enzima no ambiente ruminal.

As enzimas exógenas podem agir diretamente nos alimentos ou estimular indiretamente a digestão por potencializar as atividades das enzimas microbianas (McALLISTER et al., 2001), demonstrando a possibilidade de haver sinergismo entre enzimas exógenas e microbianas (MORGAVI et al., 2000). No presente trabalho, observou-se aumento na digestibilidade de alguns componentes da dieta, evidenciando a efetividade da enzima em aumentar a digestibilidade. O nível de enzima que obteve melhor resultado sobre a digestibilidade foi próximo a 1% de inclusão, ou seja, níveis abaixo desse ponto podem não conter enzimas suficientes para alterar a digestibilidade e níveis acima podem gerar competição entre enzimas microbianas e exógenas por sítios de ligação (BEAUCHEMIN et al., 2004).

O balanço de nitrogênio em porcentagem para cada tratamento foi de 53,15; 59,83; 57,42; 58,77 e 52,51% respectivamente para 0; 0,5; 1,0; 1,5; e 2,0% de inclusão da enzima (Tabela 6). Observou-se que não houve influência ( $P > 0,05$ ) dos tratamentos sobre as variáveis nitrogênio consumido (NC), nitrogênio nas fezes (NF), nitrogênio excretado na urina (NU), nitrogênio absorvido (NA), balanço de nitrogênio (BN), nitrogênio de excreção total (NET) e nitrogênio endógeno basal (NEB) (Tabela 6). Alguns trabalhos relatam que pode haver aumento na digestibilidade da PB com a

adição de enzimas amilolíticas na dieta (SALEM, 2015), isso pode estar relacionado a maior degradação do amido do grão aumentando assim a exposição da matriz proteica ao ataque dos microrganismos. Este fato se baseia na hipótese de que a melhoria da digestibilidade de um componente da dieta pode fornecer substratos para bactérias que degradam outros componentes, aumentando dessa forma a degradabilidade de outros nutrientes no ambiente ruminal.

**Tabela 6** - Balanço de nitrogênio em borregas alimentadas com diferentes níveis de enzima amilolítica exógena na dieta.

Variáveis	Tratamentos					Valor de P			CV
	0%	0,5%	1,0%	1,5%	2,0%	L	Q	DL	
NC (g. animal <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	41,15	41,55	39,15	41,55	39,10	0,623	0,926	0,709	14,150
NF (g.animal <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	8,33	7,30	6,31	6,60	7,24	0,180	0,076	0,910	19,900
NU (g.animal <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	10,93	9,38	10,36	10,51	11,32	0,593	0,362	0,758	23,430
NA (g.animal <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	32,81	34,25	32,84	34,94	31,86	0,870	0,532	0,708	15,440
BN (g.animal <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	21,87	24,86	22,48	24,42	20,53	0,668	0,285	0,587	22,050
NET (g.animal <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	19,27	16,68	16,67	17,12	18,57	0,827	0,118	0,910	17,130
NEB (g.animal <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	8,11	8,05	8,03	8,10	8,11	0,752	0,148	0,642	1,120

Nitrogênio consumido – NC; Nitrogênio excretado nas fezes – NF; Nitrogênio excretado na urina – NU; Balanço de nitrogênio – BN; Nitrogênio de excreção total – NET; Nitrogênio endógeno basal – NEB; Probabilidade do efeito do tratamento – P; Efeito: L: Linear e Q: Quadrático. Coeficiente de variação em % (CV).

As médias do balanço de energia se encontram na Tabela 7. Não houve diferença ( $P > 0,05$ ) para as variáveis consumo de energia bruta (CEB), consumo de energia digestível (CED), consumo de energia metabolizável (CEM) e balanço energético (BENERG), sendo as respectivas médias para essas variáveis 4237,56; 3422,64; 3135,83; e 2326,59 kcal.animal<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>. Houve efeito quadrático ( $P < 0,05$ ) do tratamento sobre a digestibilidade da energia bruta (DEB), tendo ponto de máxima calculado em 0,82% de inclusão da enzima. Este efeito era esperado, visto que o mesmo comportamento quadrático foi observado na DMS, que reflete diretamente a quantidade de energia digerida. O valor de  $R^2$  para a variável EBU foi inferior a 50%, não permitindo aceitar a confiabilidade do modelo para essa variável.

**Tabela 7** - Balanço de energia em borregas alimentadas com diferentes níveis de enzima amilolítica exógena na dieta.

Variáveis	Tratamentos					Valor de P			CV
	0,0%	0,5%	1,0%	1,5%	2,0%	L	Q	DL	
CEB	4388,0	4278,2	4148,5	4274,4	4098,4	0,478	0,898	0,870	13,27
DEB%	77,63	80,79	83,24	82,71	80,49	0,043	0,009 <sup>1</sup>	0,907	3,26
CED	3392,6	3462,3	3448,7	3526,4	3283,0	0,831	0,537	0,902	14,70
EM	3124,9	3220,6	3143,5	3204,6	2985,5	0,668	0,547	0,908	15,12
EBU	262,19	236,0	299,4	316,02	291,86	0,045 <sup>2</sup>	0,572	0,119	15,68
BENERG	2134,9	2410,3	2449,6	2462,3	2175,7	0,837	0,153	0,955	19,35

<sup>1</sup>Y = 77,484641+9,390004X-3,930678X<sup>2</sup> (R<sup>2</sup>=98,60%);

<sup>2</sup>Y = 253,2592+27,8568X (R<sup>2</sup>=47,82 %).

Consumos de energia bruta – CEB; Digestibilidade aparente da energia bruta – DEB%; Consumos de energia digestível – CED; Consumos de energia metabolizável – CEM; Energia da urina – EBU; Balanço energético – BENERG. Probabilidade do efeito do tratamento – P; Efeito: L: Linear e Q: Quadrático. Coeficiente de variação em % (CV).

O consumo de água, consumo de água em função do consumo de matéria seca e volume da urina não foram influenciados (P>0,05) pelos tratamentos (Tabela 8). CA médio foi de 5,661 L, considerado normal para animais em clima quente, segundo Nunes (1998).

Pode-se observar que a densidade da urina sofreu influência (P<0,05) dos tratamentos. Foi observado um comportamento linear crescente de 0,001 kg.L para cada 0,5% de inclusão da enzima. A densidade específica da urina está diretamente relacionada com a capacidade dos rins do animal em concentrá-la. A média de 1,015 kg.L para a densidade urinária dos animais desse experimento estiveram dentro do recomendado para pequenos ruminantes que varia de 1,015 a 1,045 kg.L (CARVALHO, 2008).

Houve efeito (P<0,05) dos tratamentos para o peso das fezes na matéria natural e escore fecal apresentando comportamento quadrático com a inclusão da enzima amilolítica na dieta. Os pontos mínimos estimados para o peso das fezes e escore fecal com 0,74 e 0,70% de inclusão enzima respectivamente. Em valores absolutos, o menor CA.animal<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup> foi para o tratamento 1% de enzima que juntamente com o escore fecal evidencia uma maior reabsorção de água via intestino grosso, observado pela aparência das fezes, onde esse tratamento obteve escore fecal 2, valor considerado

**Tabela 8** - Consumo de água (L.dia<sup>-1</sup>), consumo de água em função do consumo de matéria seca ingerida (L.kg.MS), consumo de água em função do peso vivo (%PV<sup>-1</sup>), consumo de água em função do peso metabólico (PV<sup>-0,75</sup>), volume e densidade da urina, peso das fezes e escore fecal de borregos alimentadas com diferentes níveis de enzima amilolítica na dieta.

Variáveis	Tratamentos						Valor de P			CV (%)
	0%	0,5%	1,0%	1,5%	2,0%	L	Q	DL		
CA.(L.dia <sup>-1</sup> )	6,384	6,012	4,394	5,258	6,255	0,468	0,007	0,182	16,86	
(L.kg.MS)	5,948	5,399	4,200	4,825	6,245	0,990	0,016	0,545	23,03	
%PV <sup>-1</sup>	10,31	9,90	7,31	8,37	9,93	0,270	0,007	0,134	15,30	
mL.PV <sup>-0,75</sup> )	289,03	276,44	203,55	235,50	279,63	0,314	0,007	0,145	15,66	
Volume da Urina (L)	3,045	2,910	2,933	2,524	3,084	0,762	0,431	0,555	24,26	
Densidade da Urina (kg.L)	1,013	1,013	1,015	1,018	1,015	0,044 <sup>1</sup>	0,407	0,285	0,33	
Peso das fezes (g)	0,743	0,601	0,516	0,514	0,559	0,006	0,016 <sup>2</sup>	0,983	16,57	
<sup>7</sup> Escore fecal	2,5	2,2	2,0	1,9	2,1	0,005	0,022 <sup>3</sup>	0,758	9,77	

<sup>1</sup>Y = 1,013120+0,002160X (R<sup>2</sup>=58,90%);

<sup>2</sup>Y = 0,743808-0,352903X+0,130771X<sup>2</sup> (R<sup>2</sup>=99,82%);

<sup>3</sup>Y = 2,524286-0,741143X+0,268571X<sup>2</sup> (R<sup>2</sup>=97,00%).

Efeito Linear (L); Efeito Quadrático (Q); Desvio da linearidade (DL); Coeficiente de variação em % (CV).

normal segundo Gomes (2008). Associando-se digestibilidade com escore fecal pode-se inferir que uma menor quantidade de nutrientes chegando ao lúmen do intestino grosso, pode interferir na quantidade de água a ser absorvida, aumentando a reabsorção de água e diminuindo a umidade nas fezes.

Na Tabela 9 são apresentados os valores relativos ao comportamento ingestivo e a eficiência de alimentação. Não houve diferença ( $P>0,05$ ) entre os tratamentos para ingestão, ruminação e mastigação dos animais, sendo observadas médias em porcentagem de 24 horas de 10,29%, 19,00% e 29,16%, respectivamente. A ausência de diferença sobre as variáveis comportamentais com a adição da enzima pode estar relacionada a semelhança das dietas experimentais.

O tempo despendido em ingestão e ruminação está diretamente relacionado com a qualidade da dieta, nesse contexto animais consumindo alimentos com elevado teor de concentrado passam menos tempo exercendo tais atividades. Conseqüentemente, a qualidade da dieta tem influência direta sobre os tempos de mastigação, já que esta é resultante da soma de ingestão e ruminação.

Não houve diferença ( $P>0,05$ ) para a variável ócio. Pode-se observar que o tempo despendido em ócio foi em média 1018,2 minutos, correspondendo a 70,7% do tempo diário. Considerando-se que as dietas possuíam 80% de concentrado, era esperado que os animais aumentassem o tempo em ócio, contudo, essa porcentagem está abaixo do encontrado por outros autores que avaliaram o comportamento de ovinos recebendo altas quantidades de concentrado na dieta e verificaram 79% e 80% de ócio.dia<sup>-1</sup> (MENDES et al., 2010; FORBES, 1983).

Não houve diferença ( $P>0,05$ ) para a eficiência de ingestão, ruminação e mastigação da MS (Tabela 9). Cirne et al. (2014) trabalhando com cordeiros alimentados com dietas exclusivas de concentrado encontraram média para eficiência de ingestão de matéria seca de 415,2 g.h<sup>-1</sup> valor abaixo da média encontrada no presente trabalho de 463,3 g.h<sup>-1</sup>, ressalta-se que nesse experimento 30% da dieta era composto por silagem de milho.

**Tabela 9** - Comportamento ingestivo e eficiência de alimentação de borregas alimentadas com níveis crescentes de enzima amilolítica exógena na dieta.

Variáveis	Tratamentos						Valor de P				CV (%)
	0,0%	0,5%	1,0%	1,5%	2,0%	L	Q	DL	DL		
Ingestão (hora)	2,62	2,50	2,53	2,23	2,47	0,266	0,536	0,447	0,447	13,91	
Ruminação (hora)	4,25	4,45	4,67	4,47	4,97	0,244	0,898	0,754	0,754	18,37	
Mastigação (hora)	6,87	6,95	7,20	6,70	7,43	0,479	0,707	0,472	0,472	12,16	
Ócio (hora)	17,13	17,05	16,80	17,30	16,57	0,479	0,707	0,472	0,472	5,04	
CMS.Ing (g.h <sup>-1</sup> )	451,0	444,0	422,0	529,0	471,0	0,375	0,870	0,299	0,299	20,66	
CMS.Rum (g/h <sup>-1</sup> )	280,0	262,0	238,0	250,0	224,0	0,099	0,810	0,742	0,742	19,58	
CMS.Mast (g/h <sup>-1</sup> )	163,0	163,0	151,0	163,0	148,0	0,310	0,886	0,452	0,452	13,14	
Ing.FDN (hora)	84,01	86,37	92,98	77,46	77,71	0,416	0,400	0,589	0,589	21,57	
Rum.FDN (hora)	52,92	44,86	46,2	42,78	47,85	0,498	0,320	0,841	0,841	26,39	
Mast.FDN (hora)	30,74	28,76	29,52	27,34	29,37	0,618	0,606	0,825	0,825	19,69	
Ing.FDA (hora)	28,74	29,12	31,59	25,55	25,78	0,335	0,446	0,559	0,559	23,78	
Rum.FDA (hora)	18,10	15,05	15,56	14,14	16,08	0,459	0,314	0,823	0,823	29,01	
Mast.FDA (hora)	10,51	9,67	9,98	9,03	9,82	0,534	0,600	0,798	0,798	22,76	

Consumo de matéria seca em função da ingestão (CMS.Ing); ruminação (CMS.Rum); mastigação (CMS.Mast); consumo de fibra em detergente neutro em função da ingestão (CFDN.Ing); ruminação (CFDN.Rum); mastigação (CFDN.Mast); consumo de fibra em detergente ácido em função da ingestão (CFDA.Ing); ruminação (CFDA.Rum); mastigação (CFDA.Mast); Efeito Linear (L); Efeito Quadrático (Q); Desvio da linearidade (DL); Coeficiente de variação em % (CV).

Não houve diferença ( $P>0,05$ ) dos tratamentos sobre a eficiência de ingestão, ruminação e mastigação da FDN e FDA (Tabela 9). As dietas no presente trabalho eram semelhantes diferindo apenas nas quantidades de enzima fornecida o que justifica os resultados.

Na Tabela 10 é apresentado o perfil de distribuição de partículas, teores PB e FDN das sobras. Pode-se observar que houve maior porcentagem de partículas na peneira de 1,18 mm, e no fundo (partículas menores que 1,18 mm), podendo estar relacionado a composição da ração.

As rações eram compostas por 80% de concentrado que possuíam mais de 50% de partículas menores que 1,18 mm, isso pode explicar a maior concentração de partículas abaixo desse tamanho nas sobras. Partículas menores que 1,18 mm podem passar diretamente pelo retículo-rúmen (POPPI et al., 1980), sem que seja necessário nenhum dos mecanismos de redução de partícula, como a mastigação durante o processo de prensão dos alimentos; a mastigação posterior, durante a ruminação; a digestão microbiana; e a ruptura devido à fricção provocada pelas paredes do rúmen, sendo os dois primeiros os principais responsáveis pela diminuição do tamanho de partícula (FAICHNEY, 1986). Não houve efeito dos tratamentos sobre os teores de PB e FDN das sobras, mostrando que a inclusão da enzima amilolítica exógena não interferiu na seletividade dos animais.

**Tabela 10** - Perfil de distribuição das partículas, teores (%) de PB e FDN das sobras de alimento de borregas em função dos tratamentos com inclusão de enzima amilolítica exógena na dieta.

Variáveis	Tratamentos					Valor de P			CV
	0%	0,5%	1,0%	1,5%	2,0%	L	Q	DL	
> 19mm (%)	0,76	0,64	1,20	1,22	1,12	0,246	0,700	0,634	75,24
19<8mm (%)	8,15	8,13	9,77	8,67	10,94	0,263	0,769	0,716	40,37
8<1,18mm (%)	34,61	34,65	38,74	39,00	33,89	0,552	0,027	0,165	9,27
<1,18mm (%)	56,46	56,63	50,28	51,10	54,04	0,134	0,122	0,263	8,50
PBSobras	23,69	21,44	23,92	21,23	23,32	0,809	0,275	0,035	7,220
FDNSobras	12,92	14,36	14,51	15,89	14,88	0,078	0,297	0,67	13,770

Efeito Linear (L); Efeito Quadrático (Q); Desvio da linearidade (DL); Coeficiente de variação em % (CV); Milímetros (mm).



Não houve diferença ( $P>0,05$ ) para creatinina, ureia e ácido úrico, sendo os valores médios respectivos para esses metabólitos de 1,053; 56,45; 0,043 mg/dL situados dentro dos valores recomendados por González e Silva (2006).

Não houve efeito ( $P>0,05$ ) para a variável proteínas totais (PT). O valor médio para PT foi de 4,48 g/dL estando abaixo do recomendado para a espécie ovina que é de 6 – 7,9 g/dL (GONZÁLEZ e SILVA, 2006). Contudo, apesar dos valores de PB estarem abaixo do que é recomendado a albumina sérica é considerada o indicador mais sensível para determinar o status nutricional proteico (PEIXOTO et al., 2010). No presente estudo, não houve diferença significativa para albumina, estando o valor médio dentro do esperado para espécie 2,4 – 3,0 g/dL (GONZÁLEZ e SILVA, 2006).

A atividade enzimática representada pela aspartatoaminotransferase (AST) manteve-se no limite considerado normal para a espécie ovina de 60 – 280 UI/L de acordo com González e Silva (2006), mostrando que nenhum dos tratamentos comprometeu o funcionamento hepático. De acordo com Herdt (1988) a AST é uma das enzimas preferenciais para avaliação hepática mostrando-se bem sensível, mas com pouca especificidade. Já González et al. (2000) afirmaram que a AST em níveis elevados pode indicar transtornos hepáticos.

Pode-se observar na Tabela 11 para a gama-glutamilttransferase (GGT) que em todos os tratamentos os valores estiveram acima do recomendado por Kaneko et al. (2008) para a espécie ovina, situada na faixa de 20 – 52 UI/L. A média encontrada para a GGT no presente trabalho foi de 74,40 UI/L e a ausência de diferença significativa pode ser explicada pelo fornecimento de dieta única, além do manejo e ambiente semelhantes aos quais as borregas foram submetidas durante todo o período experimental.

Não houve diferença ( $P>0,05$ ) para a fosfatase alcalina (FA). O valor médio para FA (104,86 UI/L) encontrado está de acordo com o recomendado por Kaneko et al. (2008), entre 68 – 387 UI/L. É importante ressaltar que os valores de referência para todos os metabólitos sanguíneos supracitados não podem ser considerados como normais para todas as categorias, visto que esses dados foram obtidos através de avaliações pontuais de animais mantidos em ambiente controlado (MENDONÇA et al, 2008).

**Tabela 11** – Metabólitos sanguíneos de borregas alimentadas com níveis crescentes de enzima amilolítica exógena na dieta.

Variáveis	Tratamentos						Valor de P			CV (%)
	0,0%	0,5%	1,0%	1,5%	2,0%	L	Q	DL		
Creatinina (mg/dL)	1,05	1,06	1,08	1,04	1,02	0,552	0,490	0,921	10,52	
Ureia (mg/dL)	58,86	47,60	58,73	58,86	58,20	0,497	0,554	0,176	17,75	
Ácido Úrico (mg/dL)	0,02	0,03	0,08	0,03	0,04	0,362	0,104	0,113	86,39	
Proteínas Totais (g/L)	5,29	4,49	4,58	5,00	5,07	0,888	0,003	0,068	6,81	
Albumina (g/L)	3,08	2,94	2,90	3,20	3,08	0,359	0,265	0,091	6,29	
Triglicérides (mg/dL)	20,00	23,93	22,20	23,20	23,13	0,075	0,142	0,113	8,91	
Colesterol (mg/dL)	50,00	43,00	45,00	47,66	48,06	0,940	0,238	0,568	15,91	
FA (UI/L)	96,33	101,33	115,13	114,86	96,66	0,554	0,049	0,514	15,72	
AST (UI/L)	135,60	122,93	167,40	133,60	137,80	0,735	0,404	0,125	22,05	
GGT (UI/L)	76,60	73,53	79,06	67,66	75,13	0,462	0,767	0,133	10,99	

Aspartatoaminotransferase (AST); Gama-glutamilttransferase (GGT); Fosfatase Alcalina (FA); Efeito Linear (L); Efeito Quadrático (Q); Desvio da linearidade (DL); Coeficiente de variação (CV).

Na Tabela 12 é apresentado o perfil glicêmico de borregas alimentadas com níveis crescentes de enzima amilolítica na dieta. Pode-se observar que não houve diferença significativa ( $P>0,05$ ) para a glicemia, isso pode estar relacionado a semelhança das dietas nos diversos tratamentos e aos mecanismos que regem a manutenção da glicemia em ruminantes (KOZLOSKI, 2011).

Os ruminantes possuem uma versatilidade bioquímica diferente dos não-ruminantes pois dispõem de várias rotas metabólicas gliconeogênicas hepáticas para a manutenção dos níveis glicêmicos na circulação no período pós-prandial e jejum (KOZLOSKI, 2011). Conforme destaca Cunningham (2008), o controle deste metabólito é realizado pela insulina e pelo glucagon, sob influência do cortisol, mantendo as médias dentro do intervalo da normalidade.

**Tabela 12** – Glicemia de borregas (mg/dL) alimentadas com níveis crescentes de enzima amilolítica exógena na dieta.

Tratamentos	Tempo (h)					Valor de P			CV(%)
	0	3	6	9	12	L	Q	DL	
0,0%	64,20	62,20	60,20	70,40	61,20	0,900	0,916	0,350	
0,5%	62,20	63,40	59,80	47,20	64,60	0,516	0,262	0,097	
1,0%	61,40	69,20	64,00	70,40	57,60	0,715	0,157	0,462	
1,5%	69,20	73,20	60,00	72,00	60,80	0,307	0,802	0,145	19,47
2,0%	60,00	56,00	66,00	71,20	58,80	0,466	0,300	0,201	
L	0,941	0,891	0,536	0,174	0,651				
Q	0,797	0,096	0,838	0,308	0,979				
DL	0,512	0,392	0,792	0,017	0,743				

Efeito Linear (L); Efeito Quadrático (Q); Desvio da linearidade (DL); Coeficiente de variação (CV).

Os níveis de glicose plasmática estiveram dentro do recomendado por Kaneko et al. (2008), 50 – 80 mg/dL (Tabela 12). São poucos os trabalhos referentes ao uso de enzima amilolítica na nutrição de ovinos e pouco se sabe sobre os mecanismos de ação desses aditivos, dessa forma, faz-se necessário novas pesquisas que busquem compreender e elucidar o funcionamento das enzimas no metabolismo de ruminantes.

#### 4. CONCLUSÃO

A inclusão da enzima amilolítica exógena na dose de 1% da matéria seca da dieta melhora a digestibilidade aparente da matéria seca, carboidratos totais, carboidratos não fibrosos, nutrientes digestíveis totais e digestibilidade da energia

bruta e não compromete o consumo de nutrientes, o balanço de nitrogênio, a glicemia e o comportamento ingestivo de borregas.

## 5. REFERÊNCIAS

ADESOGAN, A.T.; MA, Z.X.; ROMERO, J.J.; ARRIOLA, K.G. Ruminant nutrition symposium: Improving cell wall digestion and animal performance with fibrolytic enzymes. **Journal of Animal Science**, v.92, p.1317-1330, 2014.

AFRC - Agricultural and Food Research Council. Energy and protein requirements of ruminants. Wallingford: CAB International, 175p.1993.

AOAC - Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis** (red.). Washington, DC: AOAC, 1015p. 1995.

BARTLETT, M.S. Properties of sufficiency and statistical tests. **Proceedings of the Royal Society**, v.160, Series A, p.268-282, 1937.

BEAUCHEMIN, K.A.; COLOMBATTO, D.; MORGAVI, D.P.; YANG, W.Z. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. **Journal of Animal Science**, v.81, Suppl.2, p.37–E47, 2004.

BLAXTER, K. L., CLAPPERTON, J. L. Prediction of the amount of methane produced by ruminants. **British Journal of Nutrition**, v.19, n.1-2, p.511-522, 1965.

CARVALHO, M.B. Semiologia do sistema urinário. In: FEITOSA, F.L. **Semiologia Veterinária: a arte do diagnóstico**. São Paulo: Roca. Cap. 9, p.389-409, 2008.

CERVIERI, R.C.; CARVALHO, J.C.F.; MARTINS, C.L. Evolução do manejo nutricional nos confinamentos brasileiros: importância da utilização de subprodutos da agroindústria em dietas de maior inclusão de concentrado. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE NUTRIÇÃO DE RUMINANTES: RECENTES AVANÇOS NA NUTRIÇÃO DE BOVINOS CONFINADOS, 4, 2009, Botucatu, SP. **Anais...** Botucatu: FMVZ, 2009, p. 2-22.

CIRNE, L.G.A.; OLIVEIRA, G.J.C.; JAEGER, S.M.P.L.; BAGALDO, A.R.; LEITE, M.C.P.; ROCHA, N.B.; MACEDO JUNIOR, C.M.; OLIVEIRA, P.A. Comportamento ingestivo de cordeiros em confinamento, alimentados com dieta exclusiva de concentrado com diferentes porcentagens de proteína. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.66, n.1, p.229–234, 2014.

CROSBY, M.M.; MENDOZA, G.D.; MELGOZA, L.M.; PLATA, B.F.X; ARANDA, E.M. Effects of *Bacillus licheniformis* amylase on starch digestibility and sheep performance, **Journal of Applied Animal Research**, v.30, n.2, p. 133–136, 2006.

CUNNINGHAM, J. G. **Tratado de fisiologia veterinária** / 4.ed. Rio de Janeiro Guanabara Koogan, 710 p. 2008.

ELGHANDOUR, M.M.Y.; SALEM, A.Z.M.; GONZALEZ-RONQUILLOA, M.; BÓRQUEZA, J.L.; GADOB, H.M.; ODONGOC, N.E.; PENUELASA, C.G. Effects of exogenous enzymes on in vitro gas production kinetics and ruminal fermentation of four fibrous feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v.179, p.46-53, 2013.

FAICHNEY, G.J. The kinetics of particulate matter in the rumen. In: MILLIGAN, L.P.; GROVUM, W.L; DOBSON, A. (Eds.) Control of digestion and metabolism in ruminants. INTERNACIONAL SYMPOSIUM ON RUMINANT PHYSIOLOGY, 6, 1986, Canada. **Proceedings...** Englewood Cliffs: Prentice-Hall, p.173-195. 1986.

FISCHER, V.; DESWYSEN, A.G.; AMOUCHE, E.H. DUTTILLEUL, P.; LOBATO, J.F.P. Efeitos da pressão de pastejo sobre o padrão neotemeral do comportamento ingestivo de ovinos em pastagem. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.27, p.164-170, 1998.

FORBES, J.M. Physiology of regulation of food intake. In: ROOK, J.A.F.; THOMAS, P.C. (Eds.) **Nutritional physiology of farms animals**. London: Longman, p.177-202, 1983.

GOMES, S.P. **Tamanho de partícula do volumoso e frequência de alimentação sobre aspectos nutricionais e do metabolismo energético em ovinos**. 2008. 83p. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte, 2008.

GONZÁLEZ, F.H.D.; SILVA, S.C. **Introdução à bioquímica clínica veterinária**. 2.ed. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.

GONZÁLEZ, F.H.D. Uso de perfil metabólico para determinar o status nutricional em gado de corte. In: GONZÁLEZ, F.H.D.; BARCELLOS, J.O; OSPINA, H.; RIBEIRO, L.A.O. (Eds.) **Perfil Metabólico em ruminantes: seu uso em nutrição e doenças nutricionais**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000.

HALL, M.B. Calculation of non-structural carbohydrate content of feeds that contain non-protein nitrogen. University of Florida. p.A-25 (Bulletin 339). 2000.

HALL, M.B. Neutral detergent-soluble carbohydrates: nutritional relevance and analysis. Florida: University of Florida, (Bulletin 339). 1999.

HERDT, T.H. Fatty liver in dairy cows. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.4, n.2, p.213-231, 1988.

KANEKO J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. Clinical biochemistry of domestic animals. 6 ed. San Diego: **Academic Press**, 916p., 2008.

KONONOFF, P.J.; HEINRICH, A.J.; BUCKMASTER, D.R. Modification of the Penn State forage and total mixed ration particle separator and the effects of moisture content on its measurements. **Journal of Dairy Science**, v.86, p.1858-1863, 2003.

KOZLOSKI, G. V. **Bioquímica dos ruminantes**. 3ª ed. Revista e ampliada. Santa Maria: Editora da UFSM, 2011.

LEE-RANGÉL, H.A; MENDONZA, G.D; PINOS-RODRÍGUES, J.M; BÁRCENA, R; PLANTA, F; RICALDE, R. Effect of an exogenous glucoamylase during different periods of time on performance of lambs fed sorghum based diets, **Journal of Applied Animal Research**, p.141-144, 2006.

MAYNARD, L.A; LOOSLI, J.K; HINTZ, H.F; WARNER, R.G. **Nutrição animal**. 3ed. Rio de Janeiro: Freitas Bastos S.A., 726p., 1984.

McALLISTER, T. A.; HRISTOV, A. N.; BEAUCHEMIN, K. A. et al. Enzymes in ruminant diets. In: BEDFORD, M. R.; PARTRIDGE, G. G. (Eds.). **Enzymes in farm animal nutrition**. Oxon: CABI Publishing, p.273-298. 2001.

MENDES, C.Q.; TURINO, V.F.; SUSIN, I. PIRES, A.V.; MORAIS, J.B.; SHINKAI, G. Comportamento ingestivo de cordeiros e digestibilidade dos nutrientes de dietas contendo alta proporção de concentrado e diferentes fontes de fibra em detergente neutro. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.3, p.594-600, 2010.

MENDONÇA, F.S.; CAMARGO, L.M.; FREITAS, S.H.; DÓRIA, R.G.S.; BARATELLA-EVÊNCIO, L. Aspectos clínicos e patológicos de um surto de fotossensibilização hepatógena em ovinos pela ingestão de *Brachiaria decumbens*. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 4, p. 1034–1041, 2008.

MORGAVI, D.P.; NEWBOLD, C.J.; BEEVER, D.E.; WALLACE, R.J. Stability and stabilization of potential feed additive enzymes in rumen fluid. **Enzyme and Microbial Technology**, v.26, n.2-4, p.171-177, 2000.

MOTA, N.; MENDOZA, G. D.; PLATA, F. X.; MARTÍNEZ, J.A.; LEE, H. ROJO, R.; CROSBY, M.M. Effect of exogenous glucoamylase enzymes and reduction of grain level on lamb performance. **Journal of Applied Animal Research**, v.39, n.2, p.129–131, 2011.

NUNES, I. J. **Nutrição animal básica**. 2 ed. Belo Horizonte: UFMG, 388 p. 1998.

POPPI, D.P.; NORTON, B.W.; MINSON, D.J.; HENDRICKSEN, R.E. The validity of the critical size theory for particles leaving the rumen. **Journal of Agriculture Science**, v.94, n.2, p.275-280, 1980.

PEIXOTO, L.A.O.; OSÓRIO, M.T.M.; OSÓRIO, J.C.S. Metabólitos sanguíneos de ovelhas Ile de France sob suplementação com sal orgânico ou sal comum durante a estação de monta. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.1, p.191-197, 2010.

REDDY, N.S.; NIMMAGADDA, A.; RAO, K.R.S.S. An overview of the microbial  $\alpha$ -amylase family. **African Journal of Biotechnology**, v.2, n.12, p.645-648, 2003.

REIS, R. A.; LARA, E. C.; RABELO, C. H. S. Enzimas na nutrição de ruminantes. In: CONGRESSO NORDESTINO DE PRODUÇÃO ANIMAL, 10, 2015, Teresina, PI. **Anais...** Teresina: SNPA, 2015. p. 55-76.

ROJO, R.; MENDOZA, G. D.; PLATA, F.X. Comparison of method of application on the effect of amylolytic enzymes on *in vitro* ruminal starch digestion. **Journal of Applied Animal Research**, v.32, n.1, p. 81–84, 2007.

SALEM, A.Z.M.; BUENDIA-RODRIGUEZ, G.; ELGHANDOUR, M.M.Y.; MARIEZCURRENA BERASAIN, M.A.; PENA JIMENEZ, F.J.; PLIEGO, A.B.; CHAGOYAN, J.C.V.; CERRILLO, M.A.; RODRIGUEZ, M.A. Effects of cellulase and xylanase enzymes mixed with increasing doses of Salix Babylonica extract on in vitro rumen gas production kinetics of a mixture of corn silage with concentrate. **Journal of Integrative Agriculture**, v.14, p.31–139, 2015.

SHAPIRO, S.S.; WILK, M.B. An analysis of variance test for normality. **Biometrika**, v.52, n.3/4, p. 591-609, 1965.

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. *Análise de Alimentos (métodos químicos e biológicos)* 2 ed. Viçosa: UFV. Imp. Univ. 165 p. 2002.

SILVA, J.F.C.; LEÃO, M.I. **Fundamentos de nutrição de ruminantes**. Piracicaba: Livrocere, 380 p. 1979.

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

STREET, J.C.; BUTCHER, J.E.; HARRIS L.E. Estimating urine energy from urine nitrogen. **Journal of Animal Science**, v.23, n.4, p.1039-1041, 1964.

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

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

WEISS, W.P. Energy prediction equations for ruminant feeds. In: CORNELL NUTRITION CONFERENCE FOR FEED MANUFACTURERS, 61, 1999, **Proceedings...** Ithaca: Cornell University, p.176-185,1999.

YANG, W.Z.; SON, Y.S.; BEAUCHEMIN, K.A. Effects of exogenous enzymes on ruminal fermentation and degradability of alfalfa hay and rice straw. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v.24, n.1, p.56-64, 2011.

ZEOULA, L.M.; FERELI, F.; PRADO, I.N.; GERON, L.J.V.; NETO, S.F.C.; PRADO, O.P.P.P.; MAEDA, E.M. Digestibilidade e balanço de nitrogênio de rações com diferentes teores de proteína degradável no rúmen e milho moído como fonte de amido em ovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.5, p.2179-2186, 2006.



**CAPÍTULO 3 - CONSUMO, DIGESTIBILIDADE, BALANÇO DE NITROGÊNIO E  
ENERGIA, COMPORTAMENTO INGESTIVO E METABÓLITOS SANGUÍNEOS DE  
BORREGAS ALIMENTADAS COM NÍVEIS CRESCENTES DE ENZIMA  
FIBROLÍTICA EXÓGENA NA DIETA**

---

Trabalho formatado de acordo com as normas do Programa de Pós-Graduação em  
Ciência Animal (PPGcat) Tropical da Universidade Federal do Tocantins

**Consumo, digestibilidade, balanço de nitrogênio e energia, comportamento  
ingestivo e metabólitos sanguíneos de borregas alimentadas com níveis  
crescentes de enzima fibrolítica exógena na dieta**

**Resumo** - O objetivo do presente trabalho foi avaliar o consumo, a digestibilidade, o comportamento ingestivo e os metabólitos sanguíneos de borregas alimentadas com níveis crescentes de enzima fibrolítica exógena na dieta. O ensaio foi realizado em delineamento em quadrado latino (5x5), com cinco tratamentos e cinco repetições. Foram utilizadas cinco borregas mestiças Santa Inês x Dorper com peso inicial médio de  $46,48 \pm 5,60$  kg e aproximadamente sete meses de idade. Para condução do experimento todos os animais utilizados foram alojados em gaiolas metabólicas individuais, durante sessenta dias. Os tratamentos consistiram em dieta controle e quatro níveis de inclusão de enzima fibrolítica 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0%. A enzima foi administrada diariamente aos animais no momento de oferta da dieta. Não foi observada diferença significativa para os consumos de nutrientes em ( $\text{g.animal}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ ), peso vivo ( $\%PV^{-1}$ ) e peso metabólico ( $PV^{-0,75}$ ). Não houve diferença significativa para o coeficiente de digestibilidade aparente da matéria seca, peso das fezes e escore fecal. O consumo de água, volume e densidade da urina não foram alterados. O comportamento ingestivo e a eficiência de alimentação, ruminação e mastigação não foram influenciados pelos tratamentos. Os perfis de distribuição de partículas das sobras de alimento apresentaram efeito quadrático com a inclusão da enzima fibrolítica. Houve diferença significativa para o metabólito sanguíneo creatinina. A inclusão da enzima fibrolítica exógena não afetou a glicemia dos animais. A inclusão de enzima fibrolítica não influencia o consumo, o comportamento ingestivo, a eficiência alimentar e a glicemia de ovinos mas altera o perfil de distribuição de partículas das sobras, a densidade da urina e a creatinina plasmática.

**Palavras-chave:** fibra, ingestão, nutrição, ovinos, xilanase

## **Feed intake, digestibility, nitrogen and energy balance, feeding behavior and blood metabolites of ewe lambs fed diets with increasing levels of exogenous fibrolytic enzyme**

**Abstract** - The objective of this study was to evaluate the feed intake, digestibility, feeding behavior, and blood metabolites of ewe lambs fed diets with increasing levels of exogenous fibrolytic enzyme. The experiment was conducted using a Latin square design (5x5), with five treatments and five replicates. Five Santa Inês x Dorper crossbred ewe lambs with a mean initial body weight of  $46.48 \pm 5.60$  kg and aged seven months were used. All animals were housed in individual metabolic cages for sixty days. The treatments consisted of a control diet and four inclusion levels of a fibrolytic enzyme (0.5; 1.0; 1.5 and 2.0%). The enzyme was administered daily during feed supply. There was no significant difference for nutrient intake in  $\text{g}\cdot\text{animal}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ , as a percent of body weight ( $\%BW^{-1}$ ) and metabolic weight ( $BW^{0.75}$ ). There was no significant difference for apparent digestibility coefficient of dry matter, fecal output weight, and fecal score. Water intake, urine volume and density were not altered by addition of the fibrolytic enzyme. The feeding behavior and feeding efficiency, rumination efficiency, and chewing efficiency were not influenced by the treatments. Enzyme level had a quadratic effect on the particle size distribution of orts. There was a significant difference in creatinine concentration. The dietary inclusion of the exogenous fibrolytic enzyme did not affect the blood glucose level of ewe lambs. The dietary inclusion of a fibrolytic enzyme does not influence the feed intake, feeding behavior and efficiency, and blood glucose level in ewe lambs. However, it alters the particle size distribution of orts, urine density, and plasma creatinine concentration.

**Keywords:** dietary fiber, ingestion, nutrition, sheep, xylanase

## 1. INTRODUÇÃO

A capacidade dos ruminantes em converter a biomassa vegetal inadequada em carne e leite para consumo humano é de grande importância social e agrícola. No entanto, a eficiência deste processo depende em grande parte da digestibilidade das paredes celulares dos vegetais (MEALE et al., 2014).

O uso de aditivos no momento da ensilagem é uma técnica que tem se mostrado promissora para a melhoria dos processos fermentativos da silagem (LYNCH et al., 2015). No entanto, mesmo diante do avanço tecnológico nesta área a digestibilidade da fibra ainda limita o consumo de energia disponível nas forragens pelos ruminantes, contribuindo para uma maior excreção de nutrientes no ambiente (BEAUCHEMIN et al., 2003).

Nesse sentido, o uso de aditivos enzimáticos que otimizem a degradação ruminal da fibra surge como proposta para melhorar o desempenho animal. O uso das enzimas fibrolíticas tem por intuito disponibilizar carboidratos solúveis provenientes da hidrólise da parede celular (LYNCH et al., 2015), os quais podem ser utilizados como fonte de energia para os ruminantes e, portanto, aumentar a eficiência da utilização dos alimentos.

A utilização de enzimas fibrolíticas em dietas com alto concentrado se justifica, pelo fato de que as enzimas fibrolíticas encontradas hoje no mercado, tem sua funcionalidade em pH mais baixo, requisito esse encontrado no ambiente ruminal de animais que consomem altas quantidades de concentrado e, alguns trabalhos indicam também que há um aumento da digestibilidade amido com a adição de enzimas fibrolíticas nas rações.

As enzimas fibrolíticas são as mais estudadas pela comunidade científica, (ADESOGAN et al., 2014). Contudo, pouco se sabe sobre a real utilização de enzimas na nutrição de ruminantes, visto que o ambiente ruminal, por si só, é um universo complexo e dinâmico. Compreender a complexidade do ecossistema do rúmen e a natureza das suas interações com as paredes celulares da planta é a chave para otimizar a alimentação dos ruminantes através do uso de enzimas exógenas (MEALE et al., 2014).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o consumo, a digestibilidade, o balanço de energia e nitrogênio, o comportamento ingestivo e os metabólitos sanguíneos de borregas alimentadas com níveis crescentes de enzima fibrolítica exógena na dieta.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Local**

O experimento foi conduzido no setor de ovinos e caprinos situado nas dependências da Fazenda Capim Branco pertencente a Universidade Federal de Uberlândia - UFU, Uberlândia, Minas Gerais. O experimento foi realizado durante os meses de fevereiro a maio de 2017. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da UFU, registrado pelo protocolo de nº 017/16.

### **2.2 Animais**

Foram utilizadas cinco borregas mestiças Santa Inês x Dorper com peso inicial médio de  $46,48 \pm 5,60$  kg e escore da condição corporal médio de 3,8 e, aproximadamente, sete meses de idade. No período de adaptação, todos os animais foram vermifugados, identificados, pesados e distribuídos aleatoriamente em gaiolas metabólicas, as quais eram providas de comedouro, bebedouro, cocho com sal mineral e dispositivo apropriado para coleta (fezes e urina). O experimento teve duração de sessenta dias, divididos em cinco períodos de 12 dias: cinco dias de adaptação dos animais as dietas experimentais e as gaiolas metabólicas; cinco dias de coleta sanguínea, e das excretas de fezes e urina; um dia para análise do comportamento ingestivo; e o último dia para avaliação da curva glicêmica dos animais, totalizando sete dias de coleta de dados.

Os animais foram pesados em balança própria para a espécie no primeiro dia do experimento e no último dia de cada período de coleta, obtendo-se, assim, o peso dos animais ao início e término de cada período experimental. O peso foi utilizado para cálculo do consumo em gramas por quilo de peso vivo ( $\text{g. PV}^{-1}$ ) e peso metabólico ( $\text{g. PV}^{-0,75}$ ) ajustando-se a quantidade de sobras a partir deste.

### **2.3 Alimentação**

Aa dietas foram calculadas para atender às exigências nutricionais de borregas de porte médio, com ganho médio de  $200 \text{ g.animal.dia}^{-1}$  (NRC, 2007). A ração era fornecida duas vezes ao dia, às 08h:00 e às 16h:00, na forma de ração total misturada (RTM), e o consumo era ajustado de acordo com as sobras do dia anterior, sendo admitido sobras de 5 a 10% do total fornecido.

Os animais receberam água e sal mineral *ad libitum*. As dietas eram compostas por silagem de milho e concentrado em uma proporção percentual 20V:80C. O concentrado era composto por milho moído, farelo de soja, sal mineral e ureia (Tabela 1).

**Tabela 1** – Proporção dos ingredientes na composição do concentrado experimental e composição bromatológica da silagem e do concentrado.

Ingredientes	g.Kg <sup>-1</sup>					
Milho Moído	605,0					
Farelo de Soja	360,0					
Ureia	10,0					
Sal Mineral	25,0					
Alimentos	MS	PB	FDN	FDA	NDT	EE
Concentrado	897,0	245,0	248,0	73,0	818,8	314,0
Silagem	340,0	65,0	566,0	336,0	631,7	24,0

Matéria Seca = MS; Proteína Bruta = PB; Fibra em Detergente Neutro = FDN; Fibra em Detergente Ácido = FDA; Nutrientes Digestíveis Totais = NDT; Extrato Etéreo = EE; Mínimo = mín.; Máximo = máx.

## 2.4 Enzima

A enzima utilizada é um produto comercial (FIBROZYME®) composto por xilanase com 100 u\*/g do produto (Tabela 2). Os níveis de enzimas foram calculados de acordo com as recomendações do fabricante, sendo cada porcentagem de enzima calculada em função do consumo de matéria seca animal por animal por dia (kg.animal<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>). Para composição dos tratamentos, foram utilizados dois níveis acima e um nível abaixo da recomendação comercial do fabricante (0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0%) e o controle, sendo o nível recomendado 1% para cada kg/MS ingerido. A quantidade mínima de unidades de atividade enzimática xilanase para cada tratamento foi 101,2; 202,4; 303,6; e 404,8, respectivamente para os tratamentos 0,5; 1,0; 1,5; e 2,0%. A enzima foi misturada a ração no momento do fornecimento para os animais.

**Tabela 2** – Descrição do produto FIBROZYME® pelo fabricante.

Produto Fibrozyme	Fonte
Enzima Xilanase Mín. 100 u*/g	Levedura inativada, Extrato de <i>Yucca</i> , Levedura seca de cervejaria, Produto seco de fermentação de <i>Trichoderma longibrachiatum</i>

\*Uma unidade de atividade enzimática xilanase equivale à quantidade de enzima que libera 1 micromol de xilose por minuto a partir de xilano a pH 5,3 e 50°C.

Aspecto: FIBROZYME® é um pó de coloração marrom. Densidade: 620 Kg/m<sup>3</sup>.

## 2.5 Coleta de Dados

Nos baldes coletores de urina foram adicionados 100 mL de ácido clorídrico (HCl 2N) na véspera de cada coleta, evitando-se, assim, possíveis processos fermentativos que gerassem perda de nitrogênio por volatilização. O volume total de urina foi medido com proveta graduada. Para cada animal foi retirada uma alíquota de 20% do volume total colhido diariamente e a amostra foi acondicionada em frasco plástico (uma amostra composta por animal por período experimental) e imediatamente congelada para posteriores análises. Também foi realizada a mensuração da densidade da urina através de refratômetro portátil.

As fezes passaram por um processo de avaliação de escore o qual foi realizado visualmente por um único avaliador, obedecendo à seguinte escala conforme Gomes (2008): 1 – fezes ressecadas e sem brilho; 2 – fezes normais; 3 – fezes ligeiramente amolecidas; 4 – fezes amolecidas perdendo o formato e coladas umas às outras (cacho de uva); 5 – fezes amolecidas e sem formato normal (fezes de suínos); e 6 – fezes diarreicas. Esse procedimento foi realizado durante os cinco dias de coleta.

A coleta total de fezes foi realizada diariamente. O peso da produção total era registrado, sendo reservada alíquota de 20%. Ao final de cada fase do experimento, foram preparadas amostras compostas, por animal, que foram embaladas em sacos plásticos individuais e armazenadas a -10°C. No final do ensaio, as amostras compostas, foram descongeladas a temperatura ambiente por 12 horas, colocadas em bandejas de alumínio e levadas a estufa de ventilação forçada (55°C) até atingirem peso constante para determinar a matéria pré-seca. Posteriormente, as amostras foram moídas em moinho de facas com peneira de 1 mm e acondicionadas em recipientes plásticos para futuras análises.

As amostras de silagem, concentrado e sobras de alimento foram retiradas e pesadas diariamente e ao final dos cinco dias de coleta, foram misturadas e homogeneizadas para obtenção da amostra composta para cada animal por período experimental. Após isso, as amostras foram secas em estufa de ventilação forçada à 55°C, sendo, posteriormente, moídas em moinho de facas com peneira de 1 mm e acondicionadas para futuras análises laboratoriais.

Durante as fases de coleta foram disponibilizados 6 L de água animal<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup> em bebedouros individuais, sendo acrescentadas e registradas quantias adicionais de acordo com a ingestão dos animais. As sobras de água foram mensuradas diariamente através de proveta graduada, sendo os valores registrados para calcular

o volume de água consumida. Dentro do galpão foi colocado um recipiente de mesmo volume dos bebedouros (6 L) para se mensurar a evaporação que, posteriormente, foi descontada do volume diário consumido para cada animal.

## 2.6 Análises Bromatológica

As análises laboratoriais foram realizadas nas dependências do Laboratório de Nutrição Animal da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia de UFT. Para as determinações de matéria seca, cinzas, extrato etéreo e proteína bruta do material analisado seguiu-se a metodologia proposta por AOAC (1995). Já para a quantificação da fibra em detergente neutro, fibra em detergente ácido, celulose, hemiceluloses e ligninas utilizou-se a metodologia proposta por Van Soest et al. (1991). Para estimativa dos carboidratos totais (CHT) usou-se a equação proposta por Sniffen et al. (1992), segundo a qual,  $CHT = 100 - (\%PB + \%EE + \%MM)$  e, para a estimativa dos carboidratos não fibrosos (CNF) da silagem foi usada a equação preconizada por Hall et al. (1999), qual seja,  $CNF = \%CHT - \%FDN_{cp}$ , sendo  $FDN_{cp}$  a porção de FDN corrigida para cinzas e proteína e em razão da presença de uréia nas dietas, os carboidratos não-fibrosos (CNF) dos concentrados foram estimados como proposto por Hall (2000), em que  $\%CNF = 100 - [(\%PB - \%PB \text{ derivada da uréia} + \% \text{ de uréia}) + \%EE + \%FDN + \%cinzas]$ .

Para o cálculo dos nutrientes digestíveis totais (NDT) no ensaio de digestibilidade utilizou-se a equação sugerida por Weiss (1999):

$$NDT = [PBD + CNFD + FDN_{cp}D + (EED * 2,25)]$$

Onde, PBD; CNFD;  $FDN_{cp}D$  e EED significam, respectivamente, consumo de PB, CNF, FDN e EE digestíveis, com a FDN corrigida para cinzas e proteína.

Após a pré-secagem das amostras de sobras e fezes, em estufa a 105°C por 24 horas, foi possível calcular a matéria seca definitiva e o teor dos nutrientes, e posteriormente, a digestibilidade aparente destes.

Primeiramente, foi calculado o consumo de nutrientes a partir da fórmula proposta por Maynard et al. (1984):



$$CNut = (Cons \times \%Cons) - (Sob \times \%Sob)$$

Onde:

CNut = consumo do nutriente (kg);

Cons = quantidade de alimento consumido (kg);

%Cons = teor do nutriente no alimento fornecido (%);

Sob = quantidade de sobra retirada (kg);

%Sob = teor do nutriente nas sobras (%).

Os coeficientes de digestibilidade de matéria seca, matéria orgânica, proteína bruta, extrato etéreo, fibra em detergente neutro, fibra em detergente ácido, celulose, hemiceluloses e energia bruta foram feitos a partir da seguinte fórmula, de acordo com Silva e Leão (1979).

$$CDap = \frac{(Ingerido - Excretado)}{Ingerido} \times 100$$

Onde:

CDap = coeficiente de digestibilidade aparente (%);

Ingerido = média da quantidade de nutrientes do alimento ingerido (ofertado – sobras) (kg/dia);

Excretado = média da quantidade de nutriente nas fezes (kg/dia).

O teor de nitrogênio (N) na urina foi determinado pelo método Kjeldahl (SILVA e QUEIROZ, 2002), com as seguintes adaptações:

- Em um mL de amostra de urina, foram adicionados 5 mL de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e mistura catalítica em um tubo de ensaio;
- Iniciou-se a digestão das amostras em 50°C e aumentou-se a temperatura gradualmente (a cada 50 °C) até ocorrer a mudança de cor da amostra;
- Posteriormente, fez-se a destilação das amostras, adicionando um pouco de água destilada a amostra digerida. No aparelho de destilação adicionou-se 25 mL de hidróxido de sódio 50% (NaOH) e 20 mL de ácido bórico (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>) em erlenmeyer. O volume de amostra destilada coletada foi de 100 mL;

- Após a destilação, a amostra foi titulada utilizando ácido clorídrico (HCl) a 0,1N, adicionando o ácido até observar mudança na cor;
- A quantidade de ácido gasto na titulação foi utilizada para calcular o teor de N da amostra, através da fórmula:

$$\%N = \frac{V \times FC \times N \times 0,014}{P} \times 100$$

Onde:

V = volume de HCl 0,1N gasto na titulação;

FC = fator de correção do HCl 0,1N;

N = normalidade do ácido utilizado na titulação; 0,014 = miliequivalente-grama do nitrogênio;

P = peso da amostra em gramas.

Posteriormente, foi calculado o consumo de N (CN) através da fórmula:

$$CN = [(N \text{ fornecido } (g) - N \text{ das Sobras}(g))$$

O balanço de nitrogênio (BN), ou nitrogênio retido, foi obtido utilizando-se a fórmula proposta por Zeoula et al. (2006), considerando-se as quantidades de nitrogênio consumido (NC); nitrogênio excretado nas fezes (NF) e nitrogênio excretado na urina (NU).

$$BN = [(N \text{ fornecido } g - N \text{ das sobras } g) - (N \text{ nas fezes } g + N \text{ na urina } g)]$$

A partir destes valores, foi realizado o cálculo para nitrogênio de excreção total (NET) e nitrogênio endógeno basal (NEB) de acordo com o AFRC (1993), que considera o N endógeno tecidual e as perdas dérmicas de N como 0,35 e 0,018 do peso metabólico, respectivamente.

Assim, os valores foram expressos como:

$$NET(g.d)^{-1} = (NF + NU)$$

$$NEB(g.d)^{-1} = (0,35 + 0,018) \times PV^{0,75}$$

A energia bruta (EB) foi obtida em calorímetro adiabático modelo PARR 6200. Os valores da energia digestível (ED) foram calculados utilizando-se a técnica direta de determinação de energia com bomba calorimétrica. Para isso, foi medida a energia contida nas fezes, no alimento ofertado e nas sobras do alimento.

A energia metabolizável foi obtida através da fórmula de Blaxter e Clapperton (1965), na qual a ED é igual a EB ingerida menos a EB excretada nas fezes. Já a EM é igual à ED menos a EB da urina mais a energia dos gases (EG).

A produção de metano foi estimada pela seguinte equação:

$$Cm = 0,67 + 0,062 \times D$$

Onde:

Cm = produção de metano em kcal/ 100 kcal de energia consumida; e

D = digestibilidade aparente da energia bruta do alimento.

A estimativa da energia bruta da urina foi realizada segundo a equação proposta por Street et al. (1964):

$$EU.kcal.gm = 0.027 + 0.119 \times (\%NU)$$

## 2.7 Avaliação Comportamental

Para a avaliação do comportamento ingestivo, os animais foram submetidos a observação visual por 24 horas no penúltimo dia de cada período de coleta de dados, perfazendo um total de cinco avaliações comportamentais durante o experimento. Durante o período noturno, o ambiente recebeu iluminação artificial, e por isso, os animais foram pré-adaptados durante um período de cinco dias. Foram observadas, a cada cinco minutos, as variáveis de ingestão de alimento e de água, ruminação e ócio, de acordo com a metodologia proposta por Fischer et al. (1998). As observações comportamentais foram realizadas por observadores treinados, em sistema de revezamento, que se posicionavam de forma estratégica, de modo a não influenciar o comportamento natural dos animais. As observações foram iniciadas às 8h:00 da

manhã com término no mesmo horário do dia seguinte. Os cálculos das atividades foram feitos em minutos por dia, admitindo-se que nos cinco minutos subsequentes a cada observação o animal permaneceu na mesma atividade. Já o tempo total de mastigação foi determinado somando-se os tempos de ingestão e ruminação.

A eficiência alimentar em função do consumo de MS, FDN e FDA foi calculada dividindo-se o consumo destas variáveis pelo tempo gasto em horas de ingestão, ruminação e mastigação.

$$EIng = (CMS/CFDN/CFDA)g \div Ingestão (h)$$

$$ERum = (CMS/CFDN/CFDA)g \div Ruminação (h)$$

$$EMast = (CMS/CFDN/CFDA)g \div Mastigação (h)$$

Onde:

EIng = eficiência de ingestão em grama por hora;

ERum = eficiência de ruminação em grama por hora;

EMast = eficiência de mastigação em grama por hora.

## 2.8 Tamanho de Partícula

Para avaliação do tamanho de partícula da ração total misturada (RTM) e das sobras utilizou-se o separador de partícula modelo Penn State Particle Size (PSPS), que continha quatro peneiras, nas quais ficavam retidos diferentes tamanhos de partículas, sendo eles: >19 mm, entre 19 mm e 8 mm, entre 8 mm e 1,18 mm e partículas <1,18 mm. O uso do PSPS seguiu a metodologia descrita por Kononoff et al. (2003). Eram realizados cinco movimentos de vai e vem em um dos lados da peneira, e então o conjunto era girado em 90°, isso se repetiu por oito vezes, totalizando quarenta movimentos, o conteúdo retido em cada peneira era então pesado.

Para essa avaliação, 2 kg de amostra das RTM's e das sobras foram, individualmente, homogeneizadas e quarteadas ao final de cada período experimental de forma a se obter quatro amostras de 500 g, as quais foram processadas no PSPS para se obter a média do tamanho de partícula para cada peneira, por tratamento em

cada fase. Na Tabela 3 está apresentado o perfil de distribuição de partículas das RTM's da dieta oferecida da silagem e do concentrado.

**Tabela 3** – Perfil de distribuição descritiva das partículas da RTM do ofertado, da silagem e do concentrado (%) em função dos tamanhos de partículas.

Itens	> 19 mm (%)	19 mm<8 mm (%)	8 mm<1,18 mm (%)	<1,18 mm (%)
RTM	2,8	14,3	46,6	36,3
Silagem	17,2	53,2	26,6	3,0
Concentrado	0,04	0,08	44,0	54,8

RTM = Ração Total Misturada; Milímetros = mm.

## 2.9 Análises Sanguíneas

As coletas de sangue foram realizadas sempre antes da primeira refeição do dia, sendo três coletas por período experimental de digestibilidade, para realização de média dos parâmetros sanguíneos avaliados. As coletas foram feitas por venopunção jugular com auxílio de *vacuntainer*<sup>®</sup> e tubo de ensaio com capacidade de 10 mL sem anticoagulante. Posteriormente, as amostras de sangue foram centrifugadas por 10 minutos a 4.000 rpm e os plasmas obtidos eram armazenados em flaconetes, devidamente identificados, sendo mantidos sob refrigeração a -8 °C. Os indicadores bioquímicos determinados no sangue foram: creatinina, ureia, ácido úrico, proteínas totais, albumina, colesterol, triglicerídeos, aspartatoaminotransferase (AST), gama-glutamilttransferase (GGT) e fosfatase alcalina (FA). As análises bioquímicas no plasma foram feitas utilizando-se kits comerciais da Labtest<sup>®</sup>, em espectrofotômetro da marca Bioplus<sup>®</sup> 2000.

Para mensuração da glicemia referente a cada fase experimental, as coletas de sangue foram realizadas por venopunção jugular em tubos siliconizados com anticoagulante (Fluoreto de Sódio com EDTA 10%). O sangue foi centrifugado e o plasma armazenado em flaconetes para posteriores análises de glicose. Os tempos de coleta pré-estabelecidos foram 0 h (antes do fornecimento da ração), 3h, 6h, 9h e 12h pós-prandial. As análises das amostras sanguíneas obtidas durante o período experimental foram procedidas no Laboratório de Análise de Alimentos pertencente ao curso de Zootecnia da UFU, Campus Umuarama.

## 2.10 Delineamento e Análise Estatística

O ensaio foi realizado em um delineamento em quadrado latino (5x5) para os parâmetros de fluxo descontínuo e em um delineamento em quadrado latino (5x5) com medidas repetidas no tempo para os parâmetros de fluxo contínuo (análises sanguíneas), sendo os tratamentos os níveis de inclusão das enzimas nas dietas e as medidas repetidas no tempo, os tempos de coleta (0, 3, 6, 9 e 12h) com cinco repetições, segundo os seguintes modelos estatísticos:

$$Y_{ijl} = \mu + D_j + A_j + PI + e_{ijl}$$

Onde:

$Y_{ijl}$  = valor referente a observação da repetição  $i$  no tratamento, na linha  $j$  e na coluna  $l$

$\mu$  = média geral

$D_i$  = efeito dos tratamentos (dietas)  $i$  ( $i = 0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0\%$ )

$A_j$  = efeito das linhas (animais)  $j$  ( $j = 1; 2; 3; 4; 5$ )

$PI$  = efeito das colunas (períodos)  $l$  ( $l = 1; 2; 3; 4; 5$ )

$e_{ijk}$  = erro aleatório associado a observação.

$$Y_{ijkl} = \mu + D_j + A_j + PI + T_k + FT_{jk} + e_{ijkl}$$

Onde:

$Y_{ijkl}$  = valor referente a observação da repetição  $i$  no tratamento, na linha  $j$ , na coluna  $l$  e no tempo de coleta  $k$

$\mu$  = média geral

$D_i$  = efeito dos tratamentos (dietas)  $i$  ( $i = 0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0\%$ )

$A_j$  = efeito das linhas (animais)  $j$  ( $j = 1; 2; 3; 4; 5$ )

$PI$  = efeito das colunas (períodos)  $l$  ( $l = 1; 2; 3; 4; 5$ )

$T_k$  = efeito do tempo de coleta  $k$  ( $k = 3; 6, 9$  e  $12h$ )

$DT_{jk}$  = interação dos efeitos do tratamento  $j$  com o tempo de coleta  $k$

$e_{ijkl}$  = erro aleatório associado a observação.

Os dados foram submetidos aos testes de Shapiro e Wilk (1965) e Bartlett (1937) para testar os pressupostos de normalidade e homocedasticidade, respectivamente. Após aceitas as pressuposições citadas acima, os resultados foram submetidos a análise de regressão para associar os níveis de enzimas na dieta aos resultados e os tempos de coleta aos resultados. Observou-se como nível de significância 0,05 de probabilidade de erro tipo I, para tomada de decisão quanto ao modelo que melhor explique os resultados.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos consumos de nutrientes são apresentados na Tabela 4. O fornecimento de níveis crescentes de enzima fibrolítica na dieta de borregas não afetou ( $P > 0,05$ ) o consumo de matéria seca (CMS), matéria orgânica (CMO), proteína bruta (CPB), extrato etéreo (CEE), fibra em detergente neutro (CFDN), fibra em detergente ácido (CFDA), carboidrato total (CCHT), carboidrato não fibroso (CCNF), hemicelulose (CHem), celulose (CCel), e nutrientes digestíveis totais (CNDT) em ( $\text{g.animal}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ ,  $\%PV^{-1}$ ,  $\text{g.kg.PV}^{-0,75}$ ).

Um dos fatores que podem explicar esse menor consumo de nutrientes foi a idade fisiológica associada a escore condição corporal (ECC) dos animais, pois esses apresentavam ECC médio de 4,5 em uma escala de 5. Este fato pode ter contribuído para o menor consumo, levando-se em consideração a densidade energética da dieta e que os mesmos estavam em idade fisiológica elevada e com as exigências de produção em declínio.

A média para o CMS no presente trabalho foi de  $874,0 \text{ g.dia}^{-1}$ . A não significância para o consumo dos nutrientes pode estar ligada a diversos fatores, como, quantidade de enzimas fornecidas, estabilidade da enzima no ambiente ruminal, tempo necessário para que as enzimas ajam sobre o substrato, pH e temperatura ótima no ambiente ruminal e competição por sítios de ligação com enzimas microbianas (BEAUCHEMIN et al., 2004).

O consumo de matéria seca em função do peso vivo ( $\%PV$ ) e peso metabólico ( $\text{g.kg}^{-1}\text{PV}^{-0,75}$ ) apresentaram médias respectivas de 1,74% e  $49,39 \text{ g.kg}^{-1}\text{PV}^{-0,75}$ . Esses valores estão abaixo do que se espera para o consumo de animais dessa categoria. Cabe ressaltar que os animais do presente trabalho estavam com escore da condição corporal médio de 3,8 indicando que os mesmos já estavam em processo lipogênico

**Tabela 4 - Consumo de nutrientes por borregas alimentadas com diferentes níveis de enzima fibrolítica exógena na dieta.**

Variáveis	Tratamentos						Valor de P			CV (%)
	0%	0,5%	1,0%	1,5%	2,0%	L	Q	DL		
CMS (g.animal <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	942,01	902,32	889,57	7750,25	859,15	0,160	0,539	0,503	15,84	
CMS (%PV <sup>-1</sup> )	1,908	1,795	1,764	1,562	1,706	0,102	0,439	0,568	14,56	
CMS (g.kg.PV <sup>-0,75</sup> )	50,5	47,72	46,95	41,41	45,39	0,114	0,460	0,546	14,77	
CMO (g.animal <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	783,2	743,2	729,9	627,1	704,1	0,166	0,524	0,542	18,34	
CMO (%PV <sup>-1</sup> )	1,59	1,48	1,45	1,26	1,39	0,108	0,441	0,614	17,09	
CMO (g.kg.PV <sup>-0,75</sup> )	42,01	39,25	38,5	33,5	37,08	0,120	0,459	0,591	17,29	
CPB (g.animal <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	216,8	202,1	201,6	169,6	195,5	0,180	0,442	0,466	18,89	
CPBP (%PV <sup>-1</sup> )	0,44	0,41	0,43	0,34	0,39	0,123	0,366	0,524	17,85	
CPB (g.kg.PV <sup>-0,75</sup> )	11,66	10,73	10,66	9,08	10,34	0,135	0,381	0,505	18,13	
CEE (g.animal <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	22,27	14,8	14,08	14,08	17,93	0,392	0,087	0,914	44,98	
CEE (%PV <sup>-1</sup> )	0,05	0,03	0,03	0,03	0,04	0,339	0,094	0,914	46,03	
CEE (g.kg.PV <sup>-0,75</sup> )	1,19	0,79	0,74	0,75	0,94	0,351	0,091	0,913	45,71	
CFDN (g.animal <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	143,07	128,53	140,24	113,79	127,59	0,178	0,250	0,985	17,37	
CFDN (%PV <sup>-1</sup> )	0,29	0,25	0,27	0,23	0,25	0,090	0,443	0,261	15,11	
CFDN (g.kg.PV <sup>-0,75</sup> )	7,67	6,74	7,31	6,07	6,69	0,108	0,488	0,257	15,56	
CFDA (g.animal <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	56,3	48,4	52,1	44,8	50,4	0,228	0,336	0,335	18,95	
CFDA (%PV <sup>-1</sup> )	0,12	0,09	0,17	0,09	0,13	0,140	0,223	0,317	17,23	
CFDA (g.kg.PV <sup>-0,75</sup> )	3,05	2,51	2,76	2,36	2,63	0,159	0,247	0,319	17,56	



CHEM (g.animal <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	86,1	80,3	87,2	69,5	77,3	0,172	0,916	0,236	17,31
CHEM (%PV <sup>-1</sup> )	0,17	0,16	0,17	0,14	0,15	0,082	0,713	0,249	14,89
CHEM (g.kg.PV <sup>-0,75</sup> )	4,62	4,22	4,54	3,71	4,05	0,113	0,766	0,242	15,47
CCel (g.animal <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	52,3	42,89	48,38	40,24	45,93	0,261	0,304	0,304	20,09
CCel (%PV <sup>-1</sup> )	0,11	0,84	0,09	0,08	0,09	0,171	0,203	0,278	18,51
CCel (g.kg.PV <sup>-0,75</sup> )	2,81	2,23	2,53	2,14	2,44	0,191	0,224	0,283	18,81
CCHT (g.animal <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	544,8	526,5	513,9	442,6	490,1	0,157	0,639	0,541	17,97
CCHT (%PV <sup>-1</sup> )	1,12	1,04	1,02	0,89	0,97	0,148	0,558	0,618	16,58
CCHT (g.kg.PV <sup>-0,75</sup> )	29,18	27,73	27,08	23,62	25,78	0,111	0,569	0,594	16,82
CCNF (g.animal <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	463,3	429,7	423,1	370,7	415,8	0,214	0,438	0,666	19,77
CCNF (%PV <sup>-1</sup> )	0,94	0,86	0,84	0,75	0,83	0,162	0,373	0,758	19,78
CCNF (g.kg.PV <sup>-0,75</sup> )	24,94	22,82	22,3	19,76	21,96	0,173	0,385	0,727	19,68
CNDT (g.animal <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	783,6	755,4	740,4	646,6	715,9	0,167	0,559	0,506	15,84
CNDT (%PV <sup>-1</sup> )	1,59	1,52	1,47	1,34	1,42	0,105	0,463	0,573	14,63
CNDT (g.kg.PV <sup>-0,75</sup> )	41,98	39,95	39,08	34,54	37,82	0,116	0,483	0,557	14,82

Consumo de matéria seca – CMS; Consumo de matéria orgânica – CMO; Consumo de proteína bruta – CPB; Consumo de extrato etéreo – CEE; Consumo de fibra em detergente neutro – CFDN; Consumo de fibra em detergente ácido – CFDA; Consumo de carboidrato total – CCHT; Consumo de carboidrato não fibroso – CCNF; Consumo de hemicelulose – CHem; Consumo de celulose – CCEl; Consumo de nutrientes digestíveis totais – CNDT, em grama animal dia (g.animal<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>); porcentagem do peso vivo – (%PV<sup>-1</sup>) e grama por quilograma de peso metabólico – (g.PV<sup>-0,75</sup>); Probabilidade do efeito do tratamento; Efeito: L: Linear e Q: Quadrático. Desvio da linearidade (DL); Coeficiente de variação (CV).

de acúmulo de reservas de gordura. Sabe-se ainda que o tecido adiposo exerce papel fundamental no controle da saciedade via aumento da produção de hormônio leptina que induz neurônios anorexigênicos a mandar informações para o cérebro inibindo o apetite (NELSON e COX, 2014).

A digestibilidade dos nutrientes é apresentada na Tabela 5. Não houve influência ( $P>0,05$ ) dos tratamentos sobre a digestibilidade da matéria seca (DMS), matéria orgânica (DMO), proteína bruta (DPB), extrato etéreo (DEE), fibra em detergente neutro (DFDN), fibra em detergente ácido (DFDA), hemicelulose (DHem), celulose (DCel), carboidrato total (DCHT), carboidrato não fibroso (DCNF) e nutrientes digestíveis totais (DNDT), sendo médias 87,81; 91,06; 90,60; 71,07; 68,04; 75,22; 66,22; 87,41; 81,57; e 89,54%, respectivamente.

Adesogan et al. (2014) observaram em meta-análise, que 18 tipos de enzimas fibrolíticas comerciais apresentaram atividade ótima de 78 a 83% em temperaturas de 50 a 77°C, e 61% tiveram atividades ótimas em pH de 4 a 5. Cabe ressaltar que a temperatura ruminal situasse entre 39 a 42 °C e o pH pode variar de 5 a 7, de acordo com o tipo de alimento ingerido, tempo de amostragem e frequência de fornecimento de alimentos ao hospedeiro (BERCHIELLI et al., 2011).

A enzima utilizada no presente trabalho é uma xilanase. As xilanases são uma classe de enzimas que degradam o polissacarídeo linear beta-1,4-xilano em xilose, decompondo assim a hemicelulose, um dos principais componentes das paredes celulares das plantas (SUBRAMANIYAN e PREMA, 2002). Dessa forma, esperava-se um aumento na digestibilidade da hemicelulose e conseqüentemente da FDN, com a inclusão da enzima fibrolítica exógena (EFE) na dieta, o que não foi observado. A enzima xilanase testada no presente trabalho tem sua máxima atividade em pH 5,3 e temperatura 50°C, este fato pode ter influenciado a ausência de efeito da enzima sobre o substrato desejado. Nesse contexto, pode-se inferir que a falta de efeito do tratamento poderia estar ligada a baixa eficiência das enzimas fibrolíticas no ambiente ruminal. Contudo, diversos os resultados são encontrados na literatura apresentando uma grande inconsistência de dados sobre o desempenho animal com o uso de (EFE).

Hernández et al. (2011) também não observaram melhoria na digestibilidade em cordeiros alimentados com dietas com 60% de concentrado com o uso de enzima fibrolítica. Da mesma forma, Lynch et al. (2015) não encontraram efeitos positivos no uso de EFE sobre a digestibilidade da silagem e feno de alfafa.

**Tabela 5** - Digestibilidade aparente dos nutrientes por borregas alimentadas com diferentes níveis de enzima fibrolítica exógena na dieta.

Variáveis	Tratamentos					Valor de P			CV
	0,0%	0,5%	1,0%	1,5%	2,0%	L	Q	DL	
DMS (%)	81,73	75,02	82,09	80,70	81,50	0,587	0,565	0,234	8,26
DMO (%)	87,28	84,38	89,00	89,03	89,38	0,258	0,808	0,364	5,25
DPB (%)	89,64	89,91	92,21	91,75	91,77	0,136	0,484	0,679	2,96
DEE (%)	89,91	90,00	90,93	90,99	91,19	0,355	0,883	0,946	2,89
DFDN (%)	70,30	66,84	72,32	72,29	73,60	0,355	0,790	0,684	12,46
DFDA (%)	65,67	69,87	66,78	68,26	69,60	0,469	0,908	0,541	8,68
DHem (%)	73,30	75,82	75,91	74,90	76,19	0,569	0,722	0,846	7,76
DCel (%)	63,70	68,32	64,83	66,45	67,81	0,489	0,895	0,515	9,49
DCHT (%)	86,48	86,67	87,81	87,71	88,38	0,193	0,948	0,901	2,84
DCNF (%)	93,31	93,35	93,45	93,67	94,08	0,432	0,754	0,999	1,73
DNDT (%)	88,44	88,63	90,09	90,11	90,42	0,121	0,757	0,839	2,57

Digestibilidade da matéria seca – DMS; Digestibilidade da matéria orgânica – DMO; Digestibilidade da proteína bruta – DPB; Digestibilidade do extrato etéreo – DEE; Digestibilidade da fibra em detergente neutro – DFDN; Digestibilidade de carboidrato total – DCHT; Digestibilidade de carboidrato não fibroso – DCNF; Digestibilidade de hemicelulose – DHem; Digestibilidade de celulose – DCel; Digestibilidade de nutrientes digestíveis totais – DNDT; Probabilidade do efeito do tratamento – P; Efeito: L: Linear e Q: Quadrático. Desvio da linearidade (DL); Coeficiente de variação EM % (CV).

O balanço de nitrogênio é apresentado na Tabela 6. Não houve influência ( $P>0,05$ ) dos tratamentos sobre as variáveis, nitrogênio consumido (NC), nitrogênio excretado na urina (NU), nitrogênio absorvido (NA), balanço de nitrogênio (BN), nitrogênio de excreção total (NET) e nitrogênio endógeno basal (NEB). Observa-se que o comportamento do BN foi similar ao CPB, não havendo efeito da adição da enzima fibrolítica.

Alguns trabalhos relatam que pode ocorrer aumento na digestibilidade da PB com a adição de enzimas fibrolítica na dieta (SALEM et al., 2015), este fato se baseia na hipótese de que a melhoria da digestibilidade de um componente da dieta pode fornecer substratos para bactérias que degradam outros componentes aumentado, dessa forma, a degradabilidade de outros nutrientes no ambiente ruminal. O balanço de nitrogênio em porcentagem para cada tratamento foi 54,14; 49,15; 59,05; 46,35; e 51,28% respectivamente para 0; 0,5; 1,0; 1,5; e 2,0% de inclusão da enzima.

Houve efeito ( $P < 0,05$ ) quadrático para o nitrogênio nas fezes (NF) com a inclusão da enzima na dieta. O ponto de mínima calculado para essa variável foi de 0,53% de inclusão da enzima. Pode-se inferir que neste ponto houve maior aproveitamento do nitrogênio ingerido. A utilização de enzimas exógenas pode aumentar a quantidade de PB disponível para o metabolismo microbiano (SALEM et al., 2015), reduzindo a excreção de nitrogênio nas fezes. Todavia, essa diferença não causou efeito sobre o balanço de nitrogênio.

**Tabela 6** - Balanço de nitrogênio em borregas alimentadas com diferentes níveis de enzima fibrolítica exógena na dieta.

Variáveis	Tratamentos					Valor de P			CV
	0,0%	0,5%	1,0%	1,5%	2,0%	L	Q	DL	
NC (g.animal <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	34,69	32,33	32,26	27,14	31,28	0,180	0,442	0,466	18,89
NF (g.animal <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	7,12	6,29	4,79	5,62	5,82	0,032	0,017 <sup>1</sup>	0,280	16,01
NU (g.animal <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	8,78	10,15	8,41	8,93	9,40	0,990	0,860	0,204	17,06
NA (g.animal <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	27,56	26,04	27,47	21,51	25,45	0,345	0,743	0,399	24,58
BN (g.animal <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	18,78	15,89	19,05	12,58	16,04	0,381	0,793	0,385	41,42
NET (g.animal <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	15,90	16,44	13,21	14,56	15,23	0,238	0,140	0,109	12,19
NEB (g.animal <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	6,88	6,89	6,92	6,91	6,86	0,982	0,276	0,857	1,22

$$^1Y = 7,213814 - 3,161568X + 1,255231X^2 \quad (R^2 = 82,66\%)$$

Nitrogênio consumido – NC; Nitrogênio excretado nas fezes – NF; Nitrogênio excretado na urina – NU; Nitrogênio excretado no leite – NL; Balanço de nitrogênio – BN; Nitrogênio de excreção total – NET; Nitrogênio endógeno basal – NEB; Probabilidade do efeito do tratamento – P; Efeito: L: Linear e Q: Quadrático.

As médias do balanço de energia se encontram na Tabela 7. Não houve efeito ( $P > 0,05$ ) para as variáveis consumo de energia bruta (CEB), consumo de energia digestível (CED), consumo de energia metabolizável (CEM), energia bruta da urina (EBU), balanço energético (BENERG) e digestibilidade da energia bruta (DEB), sendo as respectivas médias para essas variáveis 3384,52; 2789,71; 2502,854; 281,11; 1913,79 g.animal<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>, e 81,89%.

No presente trabalho, a DEB médio foi de 80,21% valor considerado alto para ruminantes. A ausência de efeito significativo da EFE sobre a digestibilidade pode ser explicada a medida que, uma sub-dosagem pode não ter efeito sobre a degradação de um nutriente no ambiente ruminal e uma super-dosagem pode exceder o limite

máximo de enzima e, assim ocasionar competição por sítios de adesão e degradação enzimática com os microrganismos ruminais reduzindo a eficiência ruminal e afetando a digestão total no trato gastrointestinal (ROJO, et al. 2007).

**Tabela 7** - Balanço de nitrogênio em borregas alimentadas com diferentes níveis de enzima fibrolítica exógena na dieta.

Variáveis	Tratamentos					Valor de P			CV
	0%	0,5%	1,0%	1,5%	2,0%	L	Q	DL	
CEB	3640,14	3497,23	3435,97	3011,49	3337,81	0,176	0,534	0,520	15,86
DEB%	82,30	80,62	82,98	81,17	82,36	0,879	0,763	0,420	3,73
CED	2988,66	2864,09	2856,85	2456,58	2782,39	0,241	0,531	0,453	16,86
CEM	2720,70	2622,36	2551,61	2134,85	2484,75	0,184	0,507	0,421	19,21
EBU	262,19	236,06	299,43	316,02	291,86	0,125	0,572	0,119	15,68
BENERG	2075,00	1994,89	1978,31	1585,65	1935,10	0,284	0,516	0,373	22,68

Consumos de energia bruta – CEB; Digestibilidade aparente da energia bruta – DEB%; Consumos de energia digestível – CEDg; Consumos de energia metabolizável – CEMg; Energia da urina – EBU; Balanço energético – BENERG. Probabilidade do efeito do tratamento – P; Efeito: L: Linear e Q: Quadrático.

Não houve efeito do tratamento sobre nenhum dos parâmetros avaliados relacionados ao consumo de água e balanço hídrico (Tabela 8) O CA médio foi de 3,796 L.animal<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup> estando abaixo do valor considerado normal para animais de clima quente, que é de 5 a 6 L.animal.<sup>-1</sup>dia<sup>-1</sup> (NUNES, 1998).

Não houve alteração (P>0,05) do peso das fezes na matéria natural e escore fecal. Esses resultados eram esperados já que não houve diferença para o CMS. É importante ressaltar que o escore fecal médio (1,9) é próximo do recomendado para fezes saudáveis, sendo o escore 2 considerado o ideal (GOMES, 2008).

**Tabela 8** - Consumo de água (CA.animal<sup>1</sup>.dia<sup>-1</sup>), consumo de água em função do consumo de matéria seca ingerida (CA.CMS L.kgMS), consumo de água em função do peso vivo (CA.%PV), consumo de água em função do peso metabólico (CA.PV<sup>-0,75</sup>), volume e densidade da urina de borregas alimentadas com diferentes níveis de enzima fibrolítica exógena na dieta

Variáveis	Tratamentos					Valor de P				CV (%)
	0,0%	0,5%	1,0%	1,5%	2,0%	L	Q	DL		
CA (L/dia <sup>-1</sup> )	4,068	3,678	3,651	3,600	3,984	0,734	0,095	0,900	13,22	
CA.CMS (L/kgMS)	4,46	4,26	4,04	4,74	5,31	0,214	0,238	0,899	25,82	
CA.%PV <sup>-1</sup>	8,146	7,464	7,153	7,148	8,075	0,764	0,068	0,917	13,81	
CA (mL.PV <sup>-0,75</sup> )	216,12	197,33	190,92	190,09	213,72	0,762	0,072	0,924	13,60	
Volume da Urina (L)	1,799	1,699	1,519	1,689	1,585	0,447	0,615	0,735	23,71	
Densidade da Urina	1,018	1,017	1,016	1,017	1,021	0,257	0,052	0,700	0,30	
Peso das fezes (g)	0,461	0,517	0,374	0,338	0,377	0,125	0,779	0,390	36,02	
Escore fecal	2,4	1,8	1,8	1,8	1,9	0,143	0,131	0,726	24,39	

Efeito Linear (L); Efeito Quadrático (Q); Desvio da linearidade (DL); Coeficiente de variação (CV).

Na Tabela 9 são apresentados os dados relativos ao comportamento ingestivo e eficiência alimentar de borregas alimentadas com diferentes inclusões de enzima fibrolítica exógena na dieta. Não houve diferença significativa ( $P>0,05$ ) para ingestão, ruminação e mastigação, sendo observadas médias em porcentagem de 24 h de 10,7%, 17,4% e 28,2%, respectivamente. Era esperado que os tempos de ruminação fossem afetados pela adição de enzima fibrolítica, visto que essa teoricamente aumentaria a digestibilidade da fibra, principal fator de estímulo para ruminação.

Bowman et al. (2002) avaliaram vacas alimentadas com enzima fibrolítica e não observaram diferença significativa para ingestão e ruminação. Uma hipótese para a falta de efeito da adição de enzimas exógenas sobre o comportamento de ruminantes é a sua degradação e utilização pelas bactérias ruminais como fonte de N, uma vez que as enzimas são proteínas (REIS et al., 2015).

A variável ócio não foi alterada pelos tratamentos, os animais permaneceram em média 71,79% do dia em ócio, deferentemente ao que foi observado por Mendes et al. (2010) com média de 79% do tempo em ócio para ovinos alimentados com dieta composta por 100% de concentrado. O menor tempo em ócio para os animais do presente trabalho pode estar relacionado com a porcentagem de inclusão de concentrado na dieta (80%).

Não foi observada diferença ( $P>0,05$ ) para a eficiência alimentar de ingestão, ruminação e mastigação da matéria seca de borregas alimentadas com níveis crescentes de enzima fibrolítica exógena na dieta. Cirne et al. (2014) trabalhando com cordeiros alimentados com dietas exclusivas de concentrado encontraram média para eficiência de IMS de  $0,415 \text{ g.h}^{-1}$  valor superior à média encontrada no presente trabalho de  $0,345 \text{ g.h}^{-1}$ . Ressalta-se que no presente experimento, 30% da dieta era composto por silagem de milho.

**Tabela 9** – Comportamento ingestivo e eficiência alimentar de borregas alimentadas com doses crescentes de enzima fibrolítica exógena na dieta.

Variáveis	Tratamentos							Valor de P			CV (%)
	0,0%	0,5%	1,0%	1,5%	2,0%	L	Q	DL			
Ingestão (hora)	2,62	2,72	2,60	2,33	2,63	0,696	0,565	0,230	4,11		
Ruminação (hora)	4,15	4,50	3,80	4,25	4,25	0,584	0,740	0,443	17,04		
Mastigação (hora)	6,77	7,22	6,40	6,58	6,88	0,947	0,612	0,146	12,33		
Ócio (hora)	17,23	16,78	17,60	17,42	17,12	0,696	0,565	0,230	10,45		
CMS.Ing (g/h <sup>-1</sup> )	369,0	337,0	356,0	337,0	324,0	0,226	0,972	0,643	14,35		
CMS.Rum (g/h <sup>-1</sup> )	240,0	203,0	242,0	198,0	208,0	0,354	0,901	0,319	23,38		
CMS.Mast (g/h <sup>-1</sup> )	142,0	125,0	142,7	121,0	125,0	0,234	0,969	0,296	16,62		
Ing.FDN (hora)	50,08	41,01	37,69	46,70	52,26	0,490	0,028	0,684	21,88		
Rum.FDN (hora)	23,28	22,06	22,57	24,26	30,33	0,097	0,167	0,947	26,17		
Mast.FDN (hora)	16,95	14,28	14,10	15,89	18,75	0,393	0,086	0,971	26,02		
Ing.FDA (hora)	20,05	16,33	15,11	18,04	21,00	0,526	0,020	0,838	21,56		
Rum.FDA (hora)	9,31	8,79	9,03	9,33	12,17	0,112	0,143	0,845	26,55		
Mast.FDA (hora)	6,79	5,69	5,64	6,12	7,53	0,447	0,079	0,988	27,09		

Consumo de matéria seca em função da ingestão (CMS.Ing); Consumo de matéria seca em função da ruminação (CMS.Rum); Consumo de matéria seca em função da mastigação (CMS.Mast); Efeito Linear (L); Efeito Quadrático (Q); Desvio da linearidade (DL); Coeficiente de variação (CV).



Na Tabela 10 é apresentado o perfil de distribuição das partículas (%) das sobras de alimento. Houve diferença ( $P < 0,05$ ) dos tratamentos para o tamanho de partícula  $19 < 8$  mm, que apresentou comportamento quadrático e ponto de máxima estimado de 0,94% de inclusão da enzima. O seu perfil de distribuição das partículas apresentou maior valor (11,28%) para o tratamento 1% e menor valor (4,92%) para o controle. Tal fato pode estar relacionado com o aumento na taxa de degradação do alimento no rúmen e melhora na colonização dos alimentos pelos microrganismos ruminais em função do tratamento enzimático (COLOMBATTO et al., 2003).

**Tabela 10** – Perfil de distribuição de partículas das sobras de alimento em função dos tratamentos com inclusão de enzima fibrolítica exógena na dieta.

Peneiras	Tratamentos					Valor de P			CV
	0,0%	0,5%	1,0%	1,5%	2,0%	L	Q	DL	
> 19 mm (%)	1,00	0,79	0,78	0,74	0,72	0,505	0,755	0,973	76,73
19 < 8 mm (%)	4,92	7,30	11,28	7,49	8,26	0,004	0,039	0,070	42,15
8 < 1,18 mm (%)	38,63	40,82	40,53	41,29	38,24	0,931	0,053	0,660	6,58
< 1,18 mm (%)	55,43	51,06	47,39	50,46	52,76	0,372	0,021	0,713	8,79
PB Sobras	22,61	23,93	23,57	24,30	22,83	0,787	0,220	0,730	8,82
FDN Sobras	12,66	14,84	12,84	14,38	13,51	0,641	0,415	0,147	13,27

$$^1Y = 4,914629 + 7,647886X - 3,137143X^2 \quad (R^2 = 63,70\%);$$

Efeito Linear (L); Efeito Quadrático (Q); Desvio da linearidade (DL); Coeficiente de variação (CV); Milímetros (mm).

Na Tabela 11 é apresentado o perfil bioquímico sanguíneo dos animais. Houve diferença ( $P < 0,05$ ) apenas para a creatinina, que apresentou comportamento linear decrescente de 0,22 mg/dL para cada 0,5% de inclusão da enzima fibrolítica. Cabe ressaltar que os valores encontrados no presente trabalho (1,02 mg/dL) são inferiores a faixa considerada normal para a espécie 1,2 a 1,9 mg/d, conforme González e Silva (2006). Apesar de menor, o nível de creatinina plasmática se aproximou do valor mínimo recomendado, o que pode indicar um bom funcionamento dos rins, visto que alterações na concentração plasmática de creatinina são ocasionadas inteiramente por variações na excreção de creatinina, isto é, elas refletem a função renal (MEYER e HARVEY, 2004).

**Tabela 11** – Bioquímica sanguínea de borregas alimentadas com níveis crescentes de enzima fibrolítica na dieta.

Variáveis	Tratamentos						Valor de P			CV (%)
	0,0%	0,5%	1,0%	1,5%	2,0%	L	Q	DL		
Creatinina (mg/dL)	1,04	1,01	1,01	0,98	0,94	0,036 <sup>1</sup>	0,687	0,912	6,66	
Ureia (mg/dL)	56,60	53,26	56,26	52,46	54,06	0,227	0,584	0,155	5,97	
Ácido Úrico (mg/dL)	0,77	0,68	0,72	0,82	0,68	0,824	0,851	0,231	20,17	
Proteínas Totais (g/L) <sup>1</sup>	6,28	6,07	6,30	6,57	6,44	0,136	0,730	0,281	5,60	
Albumina (g/L)	3,84	3,83	3,67	3,81	3,78	0,720	0,590	0,710	7,51	
Triglicerídeos (mg/dL)	56,80	55,93	55,66	57,20	55,80	0,935	0,945	0,895	11,08	
Colesterol (mg/dL)	35,46	38,46	38,20	38,93	37,66	0,558	0,446	0,933	15,15	
FA (UI/L)	203,53	204,46	182,66	182,06	184,66	0,358	0,747	0,859	23,24	
AST (UI/L)	260,80	192,06	178,60	188,19	230,46	0,444	0,026	0,945	27,48	
GGT (UI/L)	51,06	43,80	50,73	48,06	49,80	0,771	0,247	0,036	8,46	

<sup>1</sup>Y = 1,042800-0,044400X (R<sup>2</sup>=94,00%);

Aspartatoaminotransferase (AST); Gamaglutamiltransferase (GGT); Fosfatase Alcalina (FA); Efeito Linear (L); Efeito Quadrático (Q); Desvio da linearidade (DL); Coeficiente de variação (CV).

Na tabela 12 é apresentado o perfil glicêmico de borregas alimentadas com níveis crescentes de enzima fibrolítica. Pode-se observar que não houve diferença significativa ( $P>0,05$ ) na glicemia. Isso pode estar relacionado a semelhança das dietas nos diversos tratamentos e aos mecanismos que regem a manutenção da glicemia em ruminantes (KOZLOSKI, 2011).

Os ruminantes apresentam uma versatilidade bioquímica com diversas rotas metabólicas gliconeogênicas hepáticas para a manutenção dos níveis glicêmicos na circulação no período pós-prandial e jejum (KOZLOSKI, 2011). O controle deste metabólito é realizado pela insulina e pelo glucagon, sob influência do cortisol, mantendo as médias dentro do intervalo da normalidade (CUNNINGHAM, 2008). No presente trabalho, os níveis de glicose plasmática estiveram próximo do padrão de normalidade 50 – 80 mg/dL sugerido por Kaneko et al. (2008).

São poucos os trabalhos na literatura referentes ao uso de enzimas fibrolíticas exógenas na nutrição de ovinos e pouco se sabe sobre os mecanismos de ação desses aditivos em ruminantes, dessa forma faz-se necessário novas pesquisas que busquem compreender e elucidar o funcionamento desses aditivos na nutrição de ruminantes.

**Tabela 12** – Glicemia de borregas (mg/dL) alimentadas com níveis crescentes de enzima fibrolítica na dieta.

Variáveis	Tempo (H)					Valor De P			CV %
	0	3	6	9	12	L	Q	DL	
0,0%	78,20	85,60	77,60	76,00	72,20	0,395	0,594	0,787	19,76
0,5%	66,00	77,00	73,80	80,60	68,20	0,752	0,223	0,714	
1,0%	78,60	81,60	88,20	81,40	77,60	0,931	0,369	0,882	
1,5%	65,40	79,40	78,20	69,40	69,40	0,937	0,238	0,633	
2,0%	82,80	90,20	65,00	84,20	82,80	0,813	0,373	0,102	
L	0,662	0,556	0,295	0,791	0,260				
Q	0,159	0,176	0,072	0,744	0,461				
DL	0,130	0,744	0,271	0,205	0,375				

Efeito Linear (L); Efeito Quadrático (Q); Desvio da linearidade (DL); Coeficiente de variação (CV).

#### 4. CONCLUSÃO

A inclusão de enzima fibrolítica não influencia o consumo, o comportamento ingestivo, a eficiência alimentar e a glicemia de ovinos mas altera o perfil de distribuição de partículas das sobras, a densidade da urina e a creatinina plasmática.

#### 5. REFERÊNCIAS

ADESOGAN, A.T.; MA, Z.X.; ROMERO, J.J.; ARRIOLA, K.G. Ruminant Nutrition Symposium: Improving cell wall digestion and animal performance with fibrolytic enzymes. **Journal of Animal Science**, v.92, n.4, p.1317–1330, 2014.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis** (red.). Washington DC: AOAC, 1015p. 1995.

BARTLETT, M.S. Properties of sufficiency and statistical tests. **Proceedings of the Royal Society**, v.160, Series A, p.268-282, 1937.

BEAUCHEMIN, K.A.; COLOMBATTO, D.; MORGAVI, D.P.; YANG, W.Z. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. **Journal of Animal Science**, v.81, Suppl.2, p.37–E47, 2003.

BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. **Nutrição de Ruminantes**. Jaboticabal: Funep, 2011.

BOWMAN, G.R.; BEAUCHEMIN, K.A.; SHELFORD, J.A. The proportion of the diet to which fibrolytic enzyme are added affects nutrient digestion by lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.85, n.12, p.3420-3429.

CIRNE, L.G.A.; OLIVEIRA, G.J.C.; JAEGER, S.M.P.L.; BAGALDO, A.R.; LEITE, M.C.P.; ROCHA, N.B.; MACEDO JUNIOR, C.M.; OLIVEIRA, P.A. Comportamento ingestivo de cordeiros em confinamento, alimentados com dieta exclusiva de concentrado com diferentes porcentagens de proteína. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.66, n.1, p.229–234, 2014.

COLOMBATTO, D.; MORGAVI, D.P.; FURTADO, A.F. et al. Screening of exogenous enzymes for ruminant diets: relationship between biochemical characteristics and *in vitro* ruminal degradation. **Journal of Animal Science**, v.81, n.10, p.2628- 2638, 2003. cows. **Journal of dairy Science**. v.85, p.3420-3429, 2003.

CUNNINGHAM, J.G. **Tratado de fisiologia veterinária**. 4.ed. Rio de Janeiro: FISCHER, V.; DESWYSEN, A.G.; AMOUCHE, E.H. DUTTILLEUL, P.; LOBATO, J.F.P. Efeitos da pressão de pastejo sobre o padrão neotemeral do comportamento ingestivo de ovinos em pastagem. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.27, p.164-170, 1998.

GOMES, S.P. **Tamanho de partícula do volumoso e frequência de alimentação sobre aspectos nutricionais e do metabolismo energético em ovinos**. 2008. 83p. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte, 2008.

GONZÁLEZ, F.H.D.; SILVA, S.C. **Introdução à bioquímica clínica veterinária**. 2ed. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006. Guanabara Koogan, 710 p. 2008.

HERNÁNDEZ, P.A.; MENDOZA, G.D.; BÁRCENA, J.R. et al. Effect of exogenous fibrolytic enzyme and slow release urea in finishing rations for lambs. **Journal of Applied Animal Research**, v.39, n.2, p.104–107, 2011.

KANEKO J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. Clinical biochemistry of domestic animals. 6 ed. San Diego: **Academic Press**, 916p., 2008.

KONONOFF, P.J.; HEINRICH, A.J.; BUCKMASTER, D.R. Modification of the Penn State forage and total mixed ration particle separator and the effects of moisture content on its measurements. **Journal of Dairy Science**, v.86, p.1858-1863, 2003.

KOZLOSKI, G. V. **Bioquímica dos ruminantes**. 3ª ed. Revista e ampliada. Santa Maria: Editora da UFSM, 2011.

LYNCH, J.P.; JIN, L.; CHURCH, J.S.; BAAH, J.; BEAUCHEMIN, K.A. Fibrolytic enzymes and a ferulic acid esterase-producing bacterial additive applied to alfalfa hay at baling: Effects on fibre digestibility, chemical composition and conservation characteristics, **Grass and Forage Science**, v.70, n.1, p.85–93, 2015.

MEALE, S.J.; BEAUCHEMIN, K.A.; CHRISTOV, A.N.A.V.; CHAVES, T.A.M. Opportunities and challenges in using exogenous to improve nonruminant animal production, **Journal of Animal Science**, p.427–442, 2014.

MENDES, C.Q.; TURINO, V.F.; SUSIN, I. PIRES, A.V.; MORAIS, J.B.; SHINKAI, G. Comportamento ingestivo de cordeiros e digestibilidade dos nutrientes de dietas

contendo alta proporção de concentrado e diferentes fontes de fibra em detergente neutro. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.3, p.594-600, 2010.

MEYER, D.J.; HARVEY, J.W. Veterinary laboratory medicine: interpretation & diagnosis. 2.ed. Philadelphia: Saunders, 351p. 2004.

NUNES, I. J. **Nutrição animal básica**. 2 ed. Belo Horizonte: UFMG, 388 p. 1998.

REIS, R. A.; LARA, E. C.; RABELO, C. H. S. Enzimas na nutrição de ruminantes. In: CONGRESSO NORDESTINO DE PRODUÇÃO ANIMAL, 10, 2015, Teresina, PI. **Anais...** Teresina: SNPA, 2015. p. 55-76.

ROJO, R.; MENDOZA, G. D.; PLATA, F.X. Comparison of method of application on the effect of amylolytic enzymes on *in vitro* ruminal starch digestion. **Journal of Applied Animal Research**, v.32, n.1, p. 81–84, 2007.

SALEM, A.Z.M.; BUENDIA-RODRIGUEZ, G.; ELGHANDOUR, M.M.Y.; MARIEZCURRENA BERASAIN, M.A.; PENA JIMENEZ, F.J.; PLIEGO, A.B.; CHAGOYAN, J.C.V.; CERRILLO, M.A.; RODRIGUEZ, M.A. Effects of cellulase and xylanase enzymes mixed with increasing doses of Salix Babylonica extract on in vitro rumen gas production kinetics of a mixture of corn silage with concentrate. **Journal of Integrative Agriculture**, v.14, p.31–139, 2015.

SHAPIRO, S.S.; WILK, M.B. An analysis of variance test for normality. **Biometrika**, v.52, n.3/4, p. 591-609, 1965.

SILVA, J.F.C.; LEÃO, M.I. **Fundamentos de nutrição de ruminantes**. Piracicaba: Livrocere, 380 p. 1979.

SUBRAMANIYAN, S.; PREMA, P. Biotechnology of microbial xylanases: Enzymology, molecular biology, and application. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.22, n.1, p.33-64, 2002.

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

**CAPÍTULO 4 - CONSUMO, DIGESTIBILIDADE, BALANÇO DE NITROGÊNIO E  
ENERGIA, COMPORTAMENTO E METABÓLITOS SANGUÍNEOS DE  
BORREGAS ALIMENTADAS COM NÍVEIS CRESCENTES DE UM COMPLEXO  
ENZIMÁTICO EXÓGENO**

---

Trabalho formatado de acordo com as normas do Programa de Pós-Graduação em  
Ciência Animal (PPGcat) Tropical da Universidade Federal do Tocantins

## **Consumo, digestibilidade, balanço de nitrogênio e energia, comportamento e metabólitos sanguíneos de borregas alimentadas com níveis crescentes de um complexo enzimático exógeno**

**Resumo** – Objetivou-se com o presente estudo avaliar o consumo, a digestibilidade, balanço de nitrogênio e energia, o comportamento e os metabólitos sanguíneos de borregas alimentadas com níveis crescentes de um complexo enzimático exógeno na dieta. O ensaio foi realizado em um delineamento em quadrado latino (5x5), com cinco tratamentos e cinco repetições. Foram utilizadas cinco borregas mestiças Santa Inês x Dorper com peso inicial médio de  $61,16 \pm 5,80$  kg e aproximadamente oito meses de idade. Para condução do experimento todos os animais utilizados foram alojados em gaiolas metabólicas individuais, durante sessenta dias. Os tratamentos consistiram em dieta controle e quatro níveis de inclusão 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0% de um complexo enzimático composto por pectinase, protease, fitase, betaglucanase, xilanase, celulase e amilase adicionado na dieta. O complexo enzimático foi administrado diariamente aos animais no momento de oferta da dieta. Não foi observada diferença significativa para o consumo de nutrientes ( $\text{g.animal}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ ), consumo de matéria seca em função do peso vivo ( $\%\text{PV}^{-1}$ ) e peso metabólico ( $\text{PV}^{0,75}$ ). O coeficiente de digestibilidade aparente da matéria seca, peso das fezes e escore fecal não foram afetados pelos tratamentos. Não houve alterações no consumo de água, volume e densidade de urina. A eficiência de ruminação e mastigação, assim como, o comportamento dos animais não foi afetado com a inclusão do complexo enzimático. A distribuição de partículas das sobras de alimento não apresentou efeito com a inclusão do complexo enzimático. Houve diferença significativa para os metabólitos sanguíneos albumina e aspartatoaminotransferase apresentando comportamento linear decrescente. A inclusão do complexo enzimático exógeno não influencia o consumo de matéria seca, o consumo de água, e o perfil de distribuição de partícula de sobras das dietas. No entanto, a glicemia e a concentração sérica de albumina e aspartatoaminotransferase foram afetadas.

**Palavras-chave:** amilase, ingestão, nutrição, ovinos, pectinase, proteases



## **Feed intake, digestibility, nitrogen and energy balance, feeding behavior and blood metabolites of ewe lambs fed diets with increasing levels of an exogenous enzyme complex**

**Abstract** – The objective of this study was to evaluate the feed intake, digestibility, nitrogen and energy balance, feeding behavior, and blood metabolites of ewe lambs fed diets with increasing levels of an exogenous enzyme complex. The experiment was conducted using a Latin square design (5x5), with five treatments and five replicates. Five Santa Inês x Dorper crossbred ewe lambs with a mean initial body weight of  $61.16 \pm 5.80$  kg and aged eight months were used. All animals were housed in individual metabolic cages for sixty days. The treatments consisted of a control diet and four inclusion levels of an enzyme complex composed of pectinase, protease, phytase, beta-glucanase, xylanase, cellulase, and amylase. The enzyme complex was administered daily during feed supply. There was no significant difference for nutrient intake in  $\text{g}\cdot\text{animal}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ , as a percent of body weight ( $\% \text{BW}^{-1}$ ) and metabolic weight ( $\text{BW}^{0.75}$ ). The apparent digestibility coefficient of dry matter, fecal output weight, and fecal score, as well as the water intake, urine volume and density, were not affected by dietary treatments. The feeding efficiency, rumination efficiency, and feeding behavior were not influenced by the inclusion of the enzyme complex. Enzyme inclusion did not affect the particle size distribution of orts. There was a significant difference for the blood metabolites albumin and aspartate aminotransferase, with a negative linear response. The dietary inclusion of the exogenous enzyme complex did not affect the feed intake, water intake, and the particle size distribution of orts. On the other hand, the blood glucose level and the serum concentration of albumin and aspartate aminotransferase were altered by the dietary inclusion of the enzyme complex.

**Keywords:** amylase, ingestion, nutrition, sheep, pectinase, proteases

## 1. INTRODUÇÃO

A utilização de enzimas exógenas na nutrição de ruminantes vem sendo cada vez mais estudadas, devido ao grande potencial que estas podem fornecer a nutrição e, conseqüentemente, a produção animal por aumentar a disponibilidade ruminal dos nutrientes e diminuir o desperdício (REIS et al., 2015).

Para atingir máximo benefício com o uso de enzimas na nutrição de ruminantes, um grande número de enzimas diferentes, ou uma enzima com ação sobre diversos substratos poderia ser usado na dieta, visto que as rações de ruminantes são compostas por uma enorme variedade de alimentos incluindo volumosos, concentrados, sub e coprodutos (TAKIYA, 2016).

As amilases são enzimas que hidrolizam as moléculas de amido em polímeros compostos por unidades de glicose (REDDY et al., 2003). As exopeptidases atuam na quebra das ligações peptídicas próximas aos grupos amino ou carboxílico terminal da proteína, enquanto as endopeptidases promovem a lise de ligações distantes dos grupos amino ou carboxílicos terminais (NELSON e COX, 2014). As pectinases são utilizadas em conjunto com outras enzimas para reduzir a viscosidade da ração animal, a fim de aumentar a absorção e a liberação de nutrientes através da hidrólise das fibras (JAYME et al., 2011). Xilanases catalisam a hidrólise de ligações 1,4-beta-D-xilossídicas em xilanos que são constituintes da hemicelulose, um componente estrutural das paredes celulares da planta (KAMBLE e JADHAV, 2012).

O complemento das dietas de ruminantes com enzimas exógenas tem potencial para melhorar a digestibilidade da parede celular da planta e, portanto, a eficiência da utilização dos alimentos (MEALE et al., 2014). Contudo, poucos trabalhos são encontrados na literatura referentes a utilização de complexos enzimáticos na alimentação de ruminantes, sendo assim se faz necessário estudos que foquem em como esses aditivos interagem no metabolismo e nutrição de ruminantes.

Objetivou-se com o presente trabalho foi avaliar o consumo, a digestibilidade, o balanço de energia e nitrogênio, o comportamento e os metabólitos sanguíneos de borregas alimentadas com níveis crescentes de um complexo enzimático exógeno comercial.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Local**

O experimento foi conduzido no setor de ovinos e caprinos situado nas dependências da Fazenda Capim Branco pertencente a Universidade Federal de Uberlândia - UFU, Uberlândia, Minas Gerais. O período experimental foi realizado durante os meses de fevereiro a maio de 2017. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da UFU, registrado pelo protocolo de nº 017/16.

### **2.2 Animais**

Foram utilizadas cinco borregas mestiças Santa Inês x Dorper com peso inicial médio de  $61,16 \pm 5,80$  kg e escore da condição corporal 4,4 e aproximadamente oito meses de idade. No período de adaptação, todos os animais foram vermifugados, identificados, pesados e distribuídos aleatoriamente em gaiolas metabólicas, as quais eram providas de comedouro, bebedouro, cocho com sal mineral e dispositivo apropriado para coleta de fezes e urina. O experimento teve duração de sessenta dias, divididos em cinco períodos de 12 dias: cinco dias de adaptação dos animais as dietas experimentais e as gaiolas metabólicas; cinco dias de coleta sanguínea e das excretas de fezes e urina; um dia para análise do comportamento ingestivo; e o último dia para avaliação da curva glicêmica dos animais, totalizando sete dias de coleta de dados.

Os animais foram pesados em balança própria para a espécie no primeiro dia do experimento e no último dia de cada período de coleta, obtendo-se, assim, o peso dos animais ao início e término de cada período experimental. O peso foi utilizado para cálculo do consumo em gramas por quilo de peso vivo ( $g \cdot PV^{-1}$ ) e peso metabólico ( $g \cdot PV^{-0,75}$ ) ajustando-se a quantidade de sobras a partir deste.

### **2.3 Alimentação**

Aa dietas foram calculadas para atender às exigências nutricionais de borregas de porte médio, com ganho médio de  $200 g \cdot animal \cdot dia^{-1}$  (NRC, 2007). A ração era fornecida duas vezes ao dia, às 08h:00 e às 16h:00, na forma de ração total misturada (RTM), e o consumo era ajustado de acordo com as sobras do dia anterior, sendo admitido sobras de 5 a 10% do total fornecido.

Os animais receberam água e sal mineral *ad libitum*. As dietas eram compostas por silagem de milho e concentrado em uma proporção percentual 20V:80C. O

concentrado era composto por milho moído, farelo de soja, sal mineral e ureia (Tabela 1).

**Tabela 1** – Proporção dos ingredientes na composição do concentrado experimental e composição bromatológica da silagem e do concentrado.

Ingredientes	g.Kg <sup>-1</sup>					
Milho Moído	605,0					
Farelo de Soja	360,0					
Ureia	10,0					
Sal Mineral	25,0					
Alimentos	MS	PB	FDN	FDA	NDT	EE
Concentrado	897,0	245,0	248,0	73,0	818,8	314,0
Silagem	340,0	65,0	566,0	336,0	631,7	24,0

Matéria Seca = MS; Proteína Bruta = PB; Fibra em Detergente Neutro = FDN; Fibra em Detergente Ácido = FDA; Nutrientes Digestíveis Totais = NDT; Extrato Etéreo = EE; Mínimo = mín.; Máximo = máx.

## 2.4 Enzima

As enzimas utilizadas compõem um produto comercial (ALLZYME® SSF) constituído por pectinase, protease, fitase, betaglucanase, xilanase, celulase e amilase (Tabela 2). Os níveis de enzimas foram calculados de acordo com as recomendações do fabricante, sendo cada porcentagem de enzima calculada em função do consumo de matéria seca por animal por dia (CMS.animal<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>). Foram utilizados dois níveis acima e um nível abaixo da recomendação comercial do fabricante (0; 0,5; 1; 1,5; 2,0%) e o controle, sendo o nível recomendado 1%. O complexo enzimático foi misturado a ração no momento do fornecimento para os animais.

**Tabela 2** – Descrição do produto ALLZYME® SSF pelo fabricante.

Produto Allzyme	Composição Básica
Pectinase (min) 4000 u <sup>*1</sup> /g	Produto de fermentação de <i>Aspergillus niger</i>
Protease (min.) 700 u <sup>*2</sup> /g	
Fitase (min.) 300 u <sup>*3</sup> /g	
Betaglucanase (min.) 200 u <sup>*4</sup> /g	
Xilanase (min.) 100 u <sup>*5</sup> /g	
Celulase (min.) 40 u <sup>*6</sup> /g	
Amilase (min.) 30 u <sup>*7</sup> /g	

\*Uma unidade de atividade enzimática equivale à quantidade de enzima que dextriniza 1 grama de substrato solúvel por minuto, a pH 4,8 e 30°C. Aspecto: ALLZYME® SSF é um granulado de coloração castanha de odor levemente maltado. Densidade volumétrica: 580 kg/m<sup>3</sup>.

Na Tabela 3 estão apresentadas as quantidades de unidades de atividade enzimática de cada enzima na constituição total dos quatro níveis de complexo enzimático avaliados.

**Tabela 3** – Número de unidades de atividade enzimática para cada enzima por tratamento.

Trat	Pect	Prot	Fitase	Betag	Xila	Celu	Amil
0,5%	5368	939,4	402,6	268,4	134,2	53,68	40,26
1,0%	10736	1878,8	805,2	536,8	268,4	107,36	80,52
1,5%	16104	2818,2	1207,8	805,2	402,6	161,04	120,78
2,0%	21472	3757,6	1610,4	1073,6	536,8	214,72	161,04

Tratamento – Trat; Pectinase – Pect; Protease – Prot; Betaglucanase – Betag; Celulase – Celu; Xilanase – Xila; Amilase – Amil.

## 2.5 Coleta de Dados

Nos baldes coletores de urina foram adicionados 100 mL de ácido clorídrico (HCl 2N) na véspera de cada coleta, evitando-se, assim, possíveis processos fermentativos que gerassem perda de nitrogênio por volatilização. O volume total de urina foi medido com proveta graduada. Para cada animal foi retirada uma alíquota de 20% do volume total colhido diariamente e a amostra foi acondicionada em frasco plástico (uma amostra composta por animal por período experimental) e imediatamente congelada para posteriores análises. Também foi realizada a mensuração da densidade da urina através de refratômetro portátil.

As fezes passaram por um processo de avaliação de escore o qual foi realizado visualmente por um único avaliador, obedecendo à seguinte escala conforme Gomes (2008): 1 – fezes ressecadas e sem brilho; 2 – fezes normais; 3 – fezes ligeiramente amolecidas; 4 – fezes amolecidas perdendo o formato e coladas umas às outras (cacho de uva); 5 – fezes amolecidas e sem formato normal (fezes de suínos); e 6 – fezes diarreicas. Esse procedimento foi realizado durante os cinco dias de coleta.

A coleta total de fezes foi realizada diariamente. O peso da produção total era registrado, sendo reservada alíquota de 20%. Ao final de cada fase do experimento, foram preparadas amostras compostas, por animal, que foram embaladas em sacos plásticos individuais e armazenadas a -10°C. No final do ensaio, as amostras compostas, foram descongeladas a temperatura ambiente por 12 horas, colocadas em bandejas de alumínio e levadas a estufa de ventilação forçada (55°C) até atingirem peso constante para determinar a matéria pré-seca. Posteriormente, as amostras foram moídas em moinho de facas com peneira de 1 mm e acondicionadas em recipientes plásticos para futuras análises.

As amostras de silagem, concentrado e sobras de alimento foram retiradas e pesadas diariamente e ao final dos cinco dias de coleta, foram misturadas e homogeneizadas para obtenção da amostra composta para cada animal por período experimental. Após isso, as amostras foram secas em estufa de ventilação forçada à 55°C, sendo, posteriormente, moídas em moinho de facas com peneira de 1 mm e acondicionadas para futuras análises laboratoriais.

Durante as fases de coleta foram disponibilizados 6 L de água animal<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup> em bebedouros individuais, sendo acrescentadas e registradas quantias adicionais de acordo com a ingestão dos animais. As sobras de água foram mensuradas diariamente através de proveta graduada, sendo os valores registrados para calcular o volume de água consumida. Dentro do galpão foi colocado um recipiente de mesmo volume dos bebedouros (6 L) para se mensurar a evaporação que, posteriormente, foi descontada do volume diário consumido para cada animal.

## 2.6 Análises Bromatológica

As análises laboratoriais foram realizadas nas dependências do Laboratório de Nutrição Animal da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia de UFT. Para as determinações de matéria seca, cinzas, extrato etéreo e proteína bruta do material analisado seguiu-se a metodologia proposta por AOAC (1995). Já para a quantificação da fibra em detergente neutro, fibra em detergente ácido, celulose, hemiceluloses e ligninas utilizou-se a metodologia proposta por Van Soest et al. (1991). Para estimativa dos carboidratos totais (CHT) usou-se a equação proposta por Sniffen et al. (1992), segundo a qual,  $CHT = 100 - (\%PB + \%EE + \%MM)$  e, para a estimativa dos carboidratos não fibrosos (CNF) da silagem foi usada a equação preconizada por Hall et al. (1999), qual seja,  $CNF = \%CHT - \%FDN_{cp}$ , sendo  $FDN_{cp}$  a porção de FDN corrigida para cinzas e proteína e em razão da presença de uréia nas dietas, os carboidratos não-fibrosos (CNF) dos concentrados foram estimados como proposto por Hall (2000), em que  $\%CNF = 100 - [(\%PB - \%PB \text{ derivada da uréia} + \% \text{ de uréia}) + \%EE + \%FDN + \%cinzas]$ .

Para o cálculo dos nutrientes digestíveis totais (NDT) no ensaio de digestibilidade utilizou-se a equação sugerida por Weiss (1999):

$$NDT = [PBD + CNFD + FDN_{cp}D + (EED * 2,25)]$$

Onde, PBD; CNFD; FDNcpD e EED significam, respectivamente, consumo de PB, CNF, FDN e EE digestíveis, com a FDN corrigida para cinzas e proteína.

Após a pré-secagem das amostras de sobras e fezes, em estufa a 105°C por 24 horas, foi possível calcular a matéria seca definitiva e o teor dos nutrientes, e posteriormente, a digestibilidade aparente destes.

Primeiramente, foi calculado o consumo de nutrientes a partir da fórmula proposta por Maynard et al. (1984):

$$CNut = (Cons \times \%Cons) - (Sob \times \%Sob)$$

Onde:

CNut = consumo do nutriente (kg);

Cons = quantidade de alimento consumido (kg);

%Cons = teor do nutriente no alimento fornecido (%);

Sob = quantidade de sobra retirada (kg);

%Sob = teor do nutriente nas sobras (%).

Os coeficientes de digestibilidade de matéria seca, matéria orgânica, proteína bruta, extrato etéreo, fibra em detergente neutro, fibra em detergente ácido, celulose, hemiceluloses e energia bruta foram feitos a partir da seguinte fórmula, de acordo com Silva e Leão (1979).

$$CDap = \frac{(Ingerido - Excretado)}{Ingerido} \times 100$$

Onde:

CDap = coeficiente de digestibilidade aparente (%);

Ingerido = média da quantidade de nutrientes do alimento ingerido (ofertado – sobras) (kg/dia);

Excretado = média da quantidade de nutriente nas fezes (kg/dia).

O teor de nitrogênio (N) na urina foi determinado pelo método Kjeldahl (SILVA e QUEIROZ, 2002), com as seguintes adaptações:

- Em um mL de amostra de urina, foram adicionados 5 mL de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e mistura catalítica em um tubo de ensaio;
- Iniciou-se a digestão das amostras em 50°C e aumentou-se a temperatura gradualmente (a cada 50 °C) até ocorrer a mudança de cor da amostra;
- Posteriormente, fez-se a destilação das amostras, adicionando um pouco de água destilada a amostra digerida. No aparelho de destilação adicionou-se 25 mL de hidróxido de sódio 50% (NaOH) e 20 mL de ácido bórico (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>) em erlenmeyer. O volume de amostra destilada coletada foi de 100 mL;
- Após a destilação, a amostra foi titulada utilizando ácido clorídrico (HCl) a 0,1N, adicionando o ácido até observar mudança na cor;
- A quantidade de ácido gasto na titulação foi utilizada para calcular o teor de N da amostra, através da fórmula:

$$\%N = \frac{V \times FC \times N \times 0,014}{P} \times 100$$

Onde:

V = volume de HCl 0,1N gasto na titulação;

FC = fator de correção do HCl 0,1N;

N = normalidade do ácido utilizado na titulação; 0,014 = miliequivalente-grama do nitrogênio;

P = peso da amostra em gramas.

Posteriormente, foi calculado o consumo de N (CN) através da fórmula:

$$CN = [(N \text{ fornecido } (g) - N \text{ das Sobras}(g))$$

O balanço de nitrogênio (BN), ou nitrogênio retido, foi obtido utilizando-se a fórmula proposta por Zeoula et al. (2006), considerando-se as quantidades de nitrogênio consumido (NC); nitrogênio excretado nas fezes (NF) e nitrogênio excretado na urina (NU).

$$BN = [(N \text{ fornecido } g - N \text{ das sobras } g) - (N \text{ nas fezes } g + N \text{ na urina } g)]$$



A partir destes valores, foi realizado o cálculo para nitrogênio de excreção total (NET) e nitrogênio endógeno basal (NEB) de acordo com o AFRC (1993), que considera o N endógeno tecidual e as perdas dérmicas de N como 0,35 e 0,018 do peso metabólico, respectivamente.

Assim, os valores foram expressos como:

$$NET(g.d)^{-1} = (NF + NU)$$

$$NEB(g.d)^{-1} = (0,35 + 0,018) \times PV^{0,75}$$

A energia bruta (EB) foi obtida em calorímetro adiabático modelo PARR 6200. Os valores da energia digestível (ED) foram calculados utilizando-se a técnica direta de determinação de energia com bomba calorimétrica. Para isso, foi medida a energia contida nas fezes, no alimento ofertado e nas sobras do alimento.

A energia metabolizável foi obtida através da fórmula de Blaxter e Clapperton (1965), na qual a ED é igual a EB ingerida menos a EB excretada nas fezes. Já a EM é igual à ED menos a EB da urina mais a energia dos gases (EG).

A produção de metano foi estimada pela seguinte equação:

$$Cm = 0,67 + 0,062 \times D$$

Onde:

Cm = produção de metano em kcal/ 100 kcal de energia consumida; e

D = digestibilidade aparente da energia bruta do alimento.

A estimativa da energia bruta da urina foi realizada segundo a equação proposta por Street et al. (1964):

$$EU.kcal.gm = 0.027 + 0.119 \times (\%NU)$$

## 2.7 Avaliação Comportamental

Para a avaliação do comportamento ingestivo, os animais foram submetidos a observação visual por 24 horas no penúltimo dia de cada período de coleta de dados, perfazendo um total de cinco avaliações comportamentais durante o experimento. Durante o período noturno, o ambiente recebeu iluminação artificial, e por isso, os animais foram pré-adaptados durante um período de cinco dias. Foram observadas, a cada cinco minutos, as variáveis de ingestão de alimento e de água, ruminação e ócio, de acordo com a metodologia proposta por Fischer et al. (1998). As observações comportamentais foram realizadas por observadores treinados, em sistema de revezamento, que se posicionavam de forma estratégica, de modo a não influenciar o comportamento natural dos animais. As observações foram iniciadas às 8h:00 da manhã com término no mesmo horário do dia seguinte. Os cálculos das atividades foram feitos em minutos por dia, admitindo-se que nos cinco minutos subsequentes a cada observação o animal permaneceu na mesma atividade. Já o tempo total de mastigação foi determinado somando-se os tempos de ingestão e ruminação.

A eficiência alimentar em função do consumo de MS, FDN e FDA foi calculada dividindo-se o consumo destas variáveis pelo tempo gasto em horas de ingestão, ruminação e mastigação.

$$EIng = (CMS/CFDN/CFDA)g \div Ingestão (h)$$

$$ERum = (CMS/CFDN/CFDA)g \div Ruminação (h)$$

$$EMast = (CMS/CFDN/CFDA)g \div Mastigação (h)$$

Onde:

EIng = eficiência de ingestão em grama por hora;

ERum = eficiência de ruminação em grama por hora;

EMast = eficiência de mastigação em grama por hora.

## 2.8 Tamanho de Partícula

Para avaliação do tamanho de partícula da ração total misturada (RTM) e das sobras utilizou-se o separador de partícula modelo Penn State Particle Size (PSPS), que continha quatro peneiras, nas quais ficavam retidos diferentes tamanhos de partículas, sendo eles: >19 mm, entre 19 mm e 8 mm, entre 8 mm e 1,18 mm e

partículas <1,18 mm. O uso do PSPS seguiu a metodologia descrita por Kononoff et al. (2003). Eram realizados cinco movimentos de vai e vem em um dos lados da peneira, e então o conjunto era girado em 90°, isso se repetiu por oito vezes, totalizando quarenta movimentos, o conteúdo retido em cada peneira era então pesado.

Para essa avaliação, 2 kg de amostra das RTM's e das sobras foram, individualmente, homogeneizadas e quarteadas ao final de cada período experimental de forma a se obter quatro amostras de 500 g, as quais foram processadas no PSPS para se obter a média do tamanho de partícula para cada peneira, por tratamento em cada fase. Na Tabela 4 está apresentado o perfil de distribuição de partículas das RTM's da dieta oferecida da silagem e do concentrado.

**Tabela 4** – Perfil de distribuição descritiva das partículas da RTM do ofertado, da silagem e do concentrado (%) em função dos tamanhos de partículas.

Itens	> 19 mm (%)	19 mm<8 mm (%)	8 mm<1,18 mm (%)	<1,18 mm (%)
RTM	2,8	14,3	46,6	36,3
Silagem	17,2	53,2	26,6	3,0
Concentrado	0,04	0,08	44,0	54,8

RTM = Ração Total Misturada; Milímetros = mm.

## 2.9 Análises Sanguíneas

As coletas de sangue foram realizadas sempre antes da primeira refeição do dia, sendo três coletas por período experimental de digestibilidade, para realização de média dos parâmetros sanguíneos avaliados. As coletas foram feitas por venopunção jugular com auxílio de *vacuntainer*® e tubo de ensaio com capacidade de 10 mL sem anticoagulante. Posteriormente, as amostras de sangue foram centrifugadas por 10 minutos a 4.000 rpm e os plasmas obtidos eram armazenados em flaconetes, devidamente identificados, sendo mantidos sob refrigeração a -8 °C. Os indicadores bioquímicos determinados no sangue foram: creatinina, ureia, ácido úrico, proteínas totais, albumina, colesterol, triglicerídeos, aspartatoaminotransferase (AST), gama-glutamilttransferase (GGT) e fosfatase alcalina (FA). As análises bioquímicas no plasma foram feitas utilizando-se kits comerciais da Labtest®, em espectrofotômetro da marca Bioplus® 2000.

Para mensuração da glicemia referente a cada fase experimental, as coletas de sangue foram realizadas por venopunção jugular em tubos siliconizados com

anticoagulante (Fluoreto de Sódio com EDTA 10%). O sangue foi centrifugado e o plasma armazenado em flaconetes para posteriores análises de glicose. Os tempos de coleta pré-estabelecidos foram 0 h (antes do fornecimento da ração), 3h, 6h, 9h e 12h pós-prandial. As análises das amostras sanguíneas obtidas durante o período experimental foram procedidas no Laboratório de Análise de Alimentos pertencente ao curso de Zootecnia da UFU, Campus Umuarama.

## 2.10 Delineamento e Análise Estatística

O ensaio foi realizado em um delineamento em quadrado latino (5x5) para os parâmetros de fluxo descontínuo e em um delineamento em quadrado latino (5x5) com medidas repetidas no tempo para os parâmetros de fluxo contínuo (análises sanguíneas), sendo os tratamentos os níveis de inclusão das enzimas nas dietas e as medidas repetidas no tempo, os tempos de coleta (0, 3, 6, 9 e 12h) com cinco repetições, segundo os seguintes modelos estatísticos:

$$Y_{ijl} = \mu + D_j + A_j + PI + e_{ijl}$$

Onde:

$Y_{ijl}$  = valor referente a observação da repetição  $i$  no tratamento, na linha  $j$  e na coluna  $l$

$\mu$  = média geral

$D_i$  = efeito dos tratamentos (dietas)  $i$  ( $i = 0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0\%$ )

$A_j$  = efeito das linhas (animais)  $j$  ( $j = 1; 2; 3; 4; 5$ )

$PI$  = efeito das colunas (períodos)  $l$  ( $l = 1; 2; 3; 4; 5$ )

$e_{ijk}$  = erro aleatório associado a observação.

$$Y_{ijkl} = \mu + D_j + A_j + PI + T_k + FT_{jk} + e_{ijkl}$$

Onde:

$Y_{ijkl}$  = valor referente a observação da repetição  $i$  no tratamento, na linha  $j$ , na coluna  $l$  e no tempo de coleta  $k$

$\mu$  = média geral

$D_i$  = efeito dos tratamentos (dietas)  $i$  ( $i = 0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0\%$ )

$A_j$  = efeito das linhas (animais)  $j$  ( $j = 1; 2; 3; 4; 5$ )

PI = efeito das colunas (períodos) I (I = 1; 2; 3; 4; 5)

Tk = efeito do tempo de coleta k (k = 3; 6, 9 e 12h)

DTik = interação dos efeitos do tratamento j com o tempo de coleta k

eijkl = erro aleatório associado a observação.

Os dados foram submetidos aos testes de Shapiro e Wilk (1965) e Bartlett (1937) para testar os pressupostos de normalidade e homocedasticidade, respectivamente. Após aceitas as pressuposições citadas acima, os resultados foram submetidos a análise de regressão para associar os níveis de enzimas na dieta aos resultados e os tempos de coleta aos resultados. Observou-se como nível de significância 0,05 de probabilidade de erro tipo I, para tomada de decisão quanto ao modelo que melhor explique os resultados.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos consumos de nutrientes são apresentados na Tabela 5. O fornecimento de níveis crescentes do complexo enzimático na dieta de borregas não afetou ( $P > 0,05$ ) o consumo de matéria seca (CMS), matéria orgânica (CMO), proteína bruta (CPB), extrato etéreo (CEE), fibra em detergente neutro (CFDN), fibra em detergente ácido (CFDA), carboidrato total (CCHT), carboidrato não fibroso (CCNF), hemicelulose (CHem), celulose (CCel), e nutrientes digestíveis totais (CNDT) ( $\text{g.animal}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ ,  $\%PV^{-1}$ ,  $\text{g.kg.PV}^{-0,75}$ ).

No presente ensaio, o consumo registrado para a  $\%PV^{-1}$  e  $PV^{-0,75}$  estiveram abaixo do recomendado para animais dessa categoria apresentando as respectivas médias  $1,81\% PV^{-1}$  e  $51,45 \text{ g.kg.PV}^{-0,75}$ . O escore da condição corporal médio foi de 4,5. Animais na fase de terminação apresentam menor consumo de MS em  $\%PV^{-1}$  e em  $\text{g.kg.PV}^{-0,75}$ , em comparação a animais na fase de recria (NRC, 2000). A composição corporal, especialmente a porcentagem de gordura corporal, parece afetar a ingestão de alimentos. A medida que o animal se aproxima da maturidade mais gordura é depositada. Em geral, quanto mais gordo o animal, menor o consumo de alimentos, para qualquer tamanho corporal (FERRELL e JENKINS, 1984).

**Tabela 5 - Consumo de nutrientes de borregas alimentadas com diferentes níveis de um complexo enzimático exógeno na dieta.**

Variáveis	Tratamentos						Valor de P				CV (%)
	0%	0,5%	1,0%	1,5%	2,0%	L	Q	DL			
CMS (g.animal <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	1083,54	1208,32	1242,98	1208,72	1175,18	0,47	0,212	0,932	14,73		
CMS (%PV <sup>-1</sup> )	1,661	1,863	1,894	1,847	1,796	0,526	0,232	0,915	15,26		
CMS (g.kg.PV <sup>-0,75</sup> )	47,21	52,85	53,89	52,54	51,09	0,512	0,228	0,92	15,12		
CMO (g.animal <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	886,2	1000,4	1039,2	1000	966,6	0,524	0,221	0,938	17,67		
CMO (%PV <sup>-1</sup> )	1,36	1,54	1,58	1,52	1,47	0,583	0,231	0,93	18,19		
CMO (g.kg.PV <sup>-0,75</sup> )	38,61	43,78	45,47	43,47	41,97	0,567	0,23	0,933	18,06		
CPB (g.animal <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	267,4	293	301,4	293,8	286,6	0,482	0,226	0,943	13,24		
CPBP (%PV <sup>-1</sup> )	0,41	0,45	0,46	0,45	0,44	0,544	0,248	0,914	13,68		
CPB (g.kg.PV <sup>-0,75</sup> )	11,64	12,81	13,08	12,74	12,46	0,528	0,243	0,925	13,57		
CEE (g.animal <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	34,6	34,2	37,6	38,6	36,4	0,647	0,771	0,913	33,23		
CEE (%PV <sup>-1</sup> )	0,05	0,05	0,06	0,06	0,06	0,745	0,726	0,959	33,47		
CEE (g.kg.PV <sup>-0,75</sup> )	1,51	1,53	1,63	1,67	1,57	0,721	0,737	0,958	33,48		
CFDN (g.animal <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	146,8	164	167,6	165,8	152,4	0,712	0,248	0,993	19,54		
CFDN (%PV <sup>-1</sup> )	0,23	0,25	0,26	0,25	0,23	0,754	0,261	0,992	20,14		
CFDN (g.kg.PV <sup>-0,75</sup> )	6,4	7,3	7,26	7,23	6,62	0,738	0,266	0,992	20,02		
CFDA (g.animal <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	61,4	64,2	65,6	66,4	60,2	0,975	0,404	0,942	20,66		
CFDA (%PV <sup>-1</sup> )	0,09	0,1	0,1	0,1	0,09	0,973	0,433	0,934	21,36		

CFDA (g.kg.PV <sup>-0,75</sup> )	2,67	2,79	2,84	2,89	2,61	0,974	0,428	0,937	21,19
CHEM (g.animal <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	85,6	96,4	102	99,4	92,4	0,551	0,196	0,995	20,08
CHEM (%PV <sup>-1</sup> )	0,13	0,15	0,16	0,15	0,14	0,592	0,205	0,997	20,58
CHEM (g.kg.PV <sup>-0,75</sup> )	3,72	4,22	4,42	4,33	4,01	0,573	0,198	0,998	20,49
CCel (g.animal <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	55,8	57,6	59,4	60,2	53,6	0,919	0,404	0,908	21,47
CCel (%PV <sup>-1</sup> )	0,09	0,09	0,09	0,09	0,08	0,876	0,449	0,917	22,25
CCel (g.kg.PV <sup>-0,75</sup> )	2,44	2,52	2,57	2,62	2,34	0,922	0,438	0,921	22,14
CCHT (g.animal <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	591,6	680,6	708	676	651,8	0,521	0,193	0,916	18,47
CCHT (%PV <sup>-1</sup> )	0,91	1,02	1,07	1,03	0,99	0,582	0,203	0,912	19,3
CCHT (g.kg.PV <sup>-0,75</sup> )	25,79	29,78	30,72	29,39	28,28	0,567	0,202	0,914	19,16
CCNF (g.animal <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	613,2	654,8	661,2	662	632,4	0,724	0,341	0,986	13,83
CCNF (%PV <sup>-1</sup> )	0,94	1,01	0,99	1,01	0,97	0,782	0,469	0,909	14,18
CCNF (g.kg.PV <sup>-0,75</sup> )	26,68	28,59	28,66	28,72	27,49	0,758	0,36	0,974	14,08
CNDT (g.animal <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	904	1011	1039,8	1012	985,4	0,444	0,205	0,915	14,55
CNDT (%PV <sup>-1</sup> )	1,39	1,56	1,59	1,54	1,51	0,498	0,224	0,895	15,06
CNDT (g.kg.PV <sup>-0,75</sup> )	39,38	44,24	45,11	43,89	42,84	0,485	0,224	0,902	14,94

Consumo de matéria seca – CMS; Consumo de matéria orgânica – CMO; Consumo de proteína bruta – CPB; Consumo de extrato etéreo – CEE; Consumo de fibra em detergente neutro – CFDN; Consumo de carboidrato total – CCHT; Consumo de carboidrato não fibroso – CCNF; Consumo de hemicelulose – CHem; Consumo de celulose – CCel; Consumo de nutrientes digestíveis totais – CNDT, em grama animal dia (g.animal<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>); porcentagem do peso vivo – (%PV<sup>-1</sup>) e grama por quilograma de peso metabólico – (g.PV<sup>-0,75</sup>); Probabilidade do efeito do tratamento; Efeito: L: Linear e Q: Quadrático. Desvio da linearidade (DL); Coeficiente de variação (CV).

Na Tabela 6 estão apresentados os coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes presentes na dieta. Não houve diferença ( $P>0,05$ ) para o coeficiente de digestibilidade aparente da matéria seca (DMS). Hernández et al. (2011) não observaram melhoria na digestibilidade em cordeiros alimentados com dietas com 60% de concentrado com o uso de enzima fibrolítica. Da mesma forma, Lynch et al. (2015) não encontraram efeitos positivos no uso de enzimas fibrolíticas exógenas sobre o valor nutritivo e digestibilidade de silagem e feno de alfafa. Peters et al. (2015) examinaram a influência da suplementação com enzimas fibrolíticas na RTM antes da alimentação e não observaram diferença na digestibilidade da matéria seca. Crosby et al. (2006) trabalhando com ovelhas Criola x Suffolk recebendo níveis crescentes (0,0; 0,6; 1,2; 1,8; 2,4 e 3,0 g) de um complexo enzimático exógeno observaram melhoria na digestibilidade aparente da matéria seca de 72,8% para o tratamento controle e de 81,7% para o tratamento com adição de enzima, valor semelhante ao encontrado no presente trabalho que foi de 81,91%.

**Tabela 6** - Digestibilidade aparente dos nutrientes por borregas alimentadas com diferentes níveis de um complexo enzimático exógeno na dieta.

Variáveis	Tratamentos					Valor de P			CV
	0,0%	0,5%	1,0%	1,5%	2,0%	L	Q	DL	
DMS (%)	88,06	90,25	87,12	88,40	87,72	0,525	0,778	0,241	3,11
DMO (%)	87,47	89,91	86,38	89,09	88,52	0,806	0,972	0,283	4,12
DPB (%)	89,09	90,78	88,42	89,12	89,60	0,872	0,895	0,410	3,14
DEE (%)	69,46	74,37	65,55	69,55	67,67	0,404	0,881	0,280	11,40
DFDN (%)	65,81	71,14	60,92	65,21	61,95	0,295	0,860	0,272	13,57
DFDA (%)	71,82	76,46	68,55	72,36	70,34	0,512	0,899	0,296	10,28
DHem (%)	63,73	69,26	58,38	62,98	59,53	0,293	0,877	0,278	15,04
DCel (%)	88,32	90,42	87,42	88,17	87,38	0,264	0,635	0,231	2,82
DCHT (%)	95,11	95,92	94,54	95,09	94,42	0,212	0,614	0,262	1,25
DCNF (%)	89,17	91,01	88,39	89,60	88,96	0,623	0,794	0,302	2,85
DNDT (%)	88,23	90,02	86,35	88,32	87,86	0,581	0,829	0,230	3,45

Digestibilidade da matéria seca – DMS; Digestibilidade da matéria orgânica – DMO; Digestibilidade da proteína bruta – DPB; Digestibilidade do extrato etéreo – DEE; Digestibilidade da fibra em detergente neutro – DFDN; Digestibilidade de carboidrato total – DCHT; Digestibilidade de carboidrato não fibroso – DCNF; Digestibilidade de hemicelulose – DHem; Digestibilidade de celulose – DCel; Digestibilidade de nutrientes digestíveis totais – DNDT; Probabilidade do efeito do tratamento – P; Efeito: L: Linear e Q: Quadrático. Desvio da linearidade (DL); Coeficiente de variação em % (CV).



O balanço de nitrogênio é apresentado na Tabela 7. Observou-se que não houve influência ( $P>0,05$ ) dos tratamentos sobre as variáveis, nitrogênio consumido (NC), nitrogênio excretado na urina (NU), nitrogênio absorvido (NA), balanço de nitrogênio (BN), nitrogênio de excreção total (NET) e nitrogênio endógeno basal (NEB). Pode-se observar que o BN foi similar ao CPB, não houve resposta significativa com a adição do complexo enzimático. Alguns trabalhos relatam que pode haver aumento na digestibilidade da PB com a adição de enzimas fibrolítica na dieta (SALEM et al., 2015), este fato se baseia na hipótese de que a melhoria da digestibilidade de um componente da dieta pode fornecer substratos para bactérias que degradam outros componentes, aumentando dessa forma a degradabilidade de outros nutrientes no ambiente ruminal. O balanço de nitrogênio em porcentagem para cada tratamento foi 54,59; 60,23; 53,08; 58,50; e 59,81% respectivamente para 0; 0,5; 1,0; 1,5; e 2,0% de inclusão da enzima.

**Tabela 7** - Balanço de nitrogênio em borregas alimentadas com diferentes níveis de um complexo enzimático exógeno na dieta.

Variáveis	Tratamentos					Valor de P			CV
	0,0%	0,5%	1,0%	1,5%	2,0%	L	Q	DL	
NC (g.animal <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	42,77	46,87	48,23	46,99	45,83	0,482	0,223	0,942	13,23
NF (g.animal <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	8,3	6,79	9	7,29	7,85	0,898	0,955	0,238	27,16
NU (g.animal <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	11,11	11,84	13,62	12,2	10,57	0,904	0,283	0,881	35,46
NA (g.animal <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	34,46	40,07	39,23	39,69	37,98	0,407	0,171	0,743	14,28
BN (g.animal <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	23,35	28,23	25,6	27,49	27,41	0,405	0,602	0,596	22,87
NET (g.animal <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	19,42	18,63	22,63	19,5	18,42	0,834	0,241	0,318	18,91
NEB (g.animal <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	8,45	8,47	8,51	8,51	8,42	0,866	0,193	0,812	1,27

Nitrogênio consumido – NC; Nitrogênio excretado nas fezes – NF; Nitrogênio excretado na urina – NU; Balanço de nitrogênio – BN; Nitrogênio de excreção total – NET; Nitrogênio endógeno basal – NEB; Probabilidade do efeito do tratamento – P; Efeito: L: Linear e Q: Quadrático. Coeficiente de variação em % (CV).

As médias do balanço de energia se encontram na Tabela 8. Não houve diferença ( $P>0,05$ ) para as variáveis, consumos de energia bruta (CEB), consumos de energia digestível (CED) consumos de energia metabolizável (CEM) e balanço energético (BENERG), sendo as respectivas médias 4593,882; 3779,684; 3492,82; 281,112 e 2684,37 kcal.animal<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>. Não houve diferença para digestibilidade da energia bruta (DEB), a média encontrada foi de 81,93%.

**Tabela 8** - Balanço de energia em borregas alimentadas com diferentes níveis de um complexo enzimático exógeno na dieta.

Variáveis	Tratamentos					Valor de P			CV
	0,0%	0,5%	1,0%	1,5%	2,0%	L	Q	DL	
CEB	4207,93	4693,44	4832,63	4682,58	4552,83	0,490	0,203	0,925	14,67
DEB%	80,54	85,59	81,07	81,74	80,71	0,405	0,172	0,049	3,49
CED	3385,99	4021,35	3946,81	3862,21	3682,06	0,614	0,123	0,723	15,65
CEM	3118,13	3779,30	3641,69	3540,45	3384,53	0,739	0,143	0,645	17,46
EBU	262,19	236,06	299,43	316,02	291,86	0,145	0,572	0,119	15,68
BENERG	2301,85	3113,18	2761,57	2725,81	2519,44	0,953	0,093	0,333	21,00

Consumos de energia bruta – CEBg; Digestibilidade aparente da energia bruta – DEB%; Consumos de energia digestível – CEDg; Consumos de energia metabolizável – CEMg; Energia da urina – EBU; Balanço energético – BENERG. Probabilidade do efeito do tratamento – P; Efeito: L: Linear e Q: Quadrático. Coeficiente de variação em % (CV).

As enzimas exógenas também podem agir diretamente nos alimentos ou estimular indiretamente a digestão por potencializar as atividades das enzimas microbianas (McALLISTER et al., 2001), demonstrando a possibilidade de haver sinergismo entre enzimas exógenas e microbianas (MORGAVI et al., 2000). Não houve diferença ( $P>0,05$ ) para o peso das fezes na matéria natural e escore fecal com a inclusão do complexo enzimático.

Na Tabela 9 são apresentados os dados de consumo de água ( $CA.\text{animal}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ ), consumo de água em função do consumo de matéria seca ( $CA.CMS$ ), consumo de água em função do peso vivo ( $\%PV^{-1}$ ), consumo de água em função do peso metabólico ( $PV^{-0,75}$ ), volume e densidade da urina de borregas alimentadas com diferentes níveis de um complexo enzimático exógeno.

Não houve diferença significativa ( $P>0,05$ ) para o  $CA.L$ ;  $CA.CMS$ ;  $CA.\%PV^{-1}$ ;  $CA.PV^{-0,75}$ . O  $CA$  médio foi de  $3,875 L.\text{animal}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  estando abaixo do considerado normal para animais de clima quente, 5 a 6  $L.\text{animal}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ , segundo Nunes (1998).

O volume e a densidade da urina não sofreram influência dos tratamentos. A densidade específica da urina está diretamente relacionada com a capacidade dos rins do animal em concentrá-la. A média para a densidade urinária dos animais desse experimento foi de 1,034  $kg.L$  estando dentro do recomendado para pequenos ruminantes que varia de 1,015 a 1,045  $kg.L$ . (CARVALHO, 2008).

**Tabela 9** - Consumo de água (L.animal<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>), consumo de água em função do consumo de matéria seca ingerida (L.kg.MS), consumo de água em função do peso vivo (%PV<sup>-1</sup>), consumo de água em função do peso metabólico (PV<sup>-0,75</sup>), volume e densidade da urina, de borregas alimentadas com diferentes níveis de um complexo enzimático exógeno na dieta.

Variáveis	Tratamentos					Valor de P			CV (%)
	0,0%	0,5%	1,0%	1,5%	2,0%	L	Q	DL	
	CA (L.dia)	4,102	3,583	4,181	3,630	3,881	0,591	0,654	
CA.CMS (L.kgMS)	3,956	2,917	3,446	3,051	3,424	0,351	0,120	0,223	20,26
CA.%PV <sup>-1</sup>	6,29	5,55	6,38	5,54	5,97	0,501	0,570	0,086	11,36
CA (mL.PV <sup>-0,75</sup> )	178,83	157,47	181,60	157,59	169,52	0,524	0,591	0,094	11,80
Volume da Urina (L)	0,833	0,889	0,932	0,825	0,743	0,371	0,197	0,897	22,05
Densidade da Urina (kg.L)	1,029	1,030	1,028	1,044	1,042	0,149	0,706	0,585	1,78
Peso das fezes (g)	0,704	0,610	0,653	0,587	0,703	0,911	0,278	0,673	25,14
Escore fecal	2,44	2,51	2,04	2,28	2,32	0,543	0,479	0,519	22,93

Efeito Linear (L); Efeito Quadrático (Q); Desvio da linearidade (DL); Coeficiente de variação (CV).

Na Tabela 10 são apresentados os valores relativos ao comportamento ingestivo e a eficiência alimentar de borregas recebendo diferentes inclusões de um complexo enzimático exógeno. Não houve diferença significativa ( $P>0,05$ ) para ingestão e mastigação, sendo observadas médias em porcentagem de 24 h de 12,81% e 31,59%, respectivamente. A ausência de diferença estatística sobre as variáveis comportamentais ingestão e mastigação podem estar relacionadas a semelhança das dietas experimentais.

Não houve influência dos tratamentos sobre a ruminação. No presente trabalho o tempo médio de ruminação em  $\text{h.dia}^{-1}$  para essa atividade foi  $4,5 \text{ h.dia}^{-1}$  valor bem abaixo do encontrado por Figueiredo et al. (2013) que avaliaram o efeito de dietas distintas sobre o comportamento ingestivo em ovinos, utilizando dieta a base de silagem de cana-de-açúcar, concentrado e 15% de caroço de algodão e observaram o tempo de ruminação de  $10,38 \text{ h.dia}^{-1}$ . Deve-se ressaltar que no presente trabalho as rações eram compostas de 80% de concentrado.

Não foi observada diferença estatística para a variável ócio. Pode-se observar que o tempo despendido em ócio foi em média de 985 minutos, correspondendo a 68,4% do tempo diário. Considerando-se que as dietas possuíam 80% de concentrado era esperado que os animais aumentassem o tempo em ócio, contudo, essa porcentagem está abaixo do encontrado por outros autores que avaliaram o comportamento de ovinos recebendo altas quantidades de concentrado na dieta e verificaram 79%, 80% e 77% de ócio/dia (MENDES et al., 2010; FORBES, 1983; CIRNE et al., 2014).

**Tabela 10** - Comportamento ingestivo e eficiência alimentar de borregas alimentadas com níveis crescentes de um complexo enzimático exógeno

Variáveis	Tratamentos						Valor de P			CV (%)
	0,0%	0,5%	1,0%	1,5%	2,0%	L	Q	DL		
Ingestão (hora)	3,62	2,97	2,93	2,97	2,90	0,883	0,776	0,421	14,44	
Ruminação (hora)	3,98	4,20	5,18	4,50	4,67	0,051	0,141	0,558	15,18	
Mastigação (hora)	7,60	7,17	8,12	7,47	7,57	0,180	0,226	0,314	18,37	
Ócio (hora)	16,40	16,83	15,88	16,53	16,43	0,883	0,776	0,421	6,67	
CMS.Ing (g.h <sup>-1</sup> )	313,0	412,0	433,0	417,0	411,0	0,060	0,054	0,674	17,33	
CMS.Rum (g.h <sup>-1</sup> )	286,0	313,0	265,0	284,0	255,0	0,334	0,690	0,561	23,00	
CMS.Mast (g.h <sup>-1</sup> )	146,0	174,0	161,0	166,0	154,0	0,843	0,243	0,630	18,94	
Ing.FDN (hora)	42,61	56,00	56,23	59,17	50,88	0,220	0,044	0,761	20,37	
Rum.FDN (hora)	38,72	35,04	37,53	33,86	38,76	0,945	0,562	0,800	29,93	
Mast.FDN (hora)	19,85	21,14	22,26	21,18	21,51	0,651	0,640	0,935	24,22	
Ing.FDA (hora)	17,82	22,29	21,92	23,62	20,10	0,391	0,101	0,723	22,08	
Rum.FDA (hora)	16,31	14,21	14,66	13,58	15,44	0,739	0,449	0,896	32,91	
Mast.FDA (hora)	8,33	8,50	8,69	8,48	8,53	0,908	0,872	0,989	27,22	

Consumo de matéria seca em função da ingestão (CMS.Ing); consumo de matéria seca em função da ruminação (CMS.Rum); Consumo de matéria seca em função da mastigação (CMS.Mast); Efeito Linear (L); Efeito Quadrático (Q); Desvio da linearidade (DL); Coeficiente de variação (CV).

Na Tabela 11 é apresentado o perfil de distribuição de partículas das sobras (%) em função dos tratamentos com inclusão do complexo enzimático exógeno. Não houve diferença ( $P>0,05$ ) para a distribuição do tamanho de partícula das sobras em função dos tratamentos. Levando-se em consideração o hábito seletivo dos pequenos ruminantes pode-se inferir que os animais tentaram selecionar as partículas de maior tamanho, visto que houve maior porcentagem de partículas na peneira de 1,18 mm, e no fundo (partículas menores que 1,18 mm), pode estar relacionado com a composição da ração, animais ruminantes tendem a selecionar a dieta de acordo com suas exigências nutricionais e fisiológicas (VAN SOEST, 1994).

As rações eram compostas por 80% de concentrado que possuíam mais de 50% de partículas menores que 1,18 mm, isso explica a maior concentração de partículas abaixo desse tamanho nas sobras. Partículas menores que 1,18 mm podem passar diretamente pelo retículo-rúmen (POPPI et al., 1980), sem que seja necessária ação de nem um dos mecanismos de redução de partícula que são a mastigação durante o processo de preensão dos alimentos; a mastigação posterior, durante a ruminação; a digestão microbiana; e a ruptura devido à fricção provocada pelas paredes do rúmen, sendo os dois primeiros os principais responsáveis pela diminuição do tamanho de partícula (FAICHNEY, 1986).

**Tabela 11** - Perfil de distribuição de partículas das sobras de alimento de borregas em função dos tratamentos com inclusão de um complexo enzimático exógeno

Variáveis	Tratamentos					Valor de P			CV
	0,0%	0,5%	1,0%	1,5%	2,0%	L	Q	DL	
> 19mm (%)	0,46	1,02	1,13	0,7	0,78	0,663	0,129	0,44	65,75
19<8mm (%)	6,42	9,43	9,47	6,58	8,56	0,755	0,361	0,212	38,91
8<1,18mm (%)	35,23	40,03	39,26	38,61	36,96	0,748	0,106	0,706	11,5
<1,18mm (%)	57,89	49,52	50,12	54,09	53,69	0,685	0,103	0,382	12,31
PBSobras	21,33	22,09	21,87	21,79	21,76	0,634	0,303	0,632	3,72
FDNSobras	16,11	17,33	16,79	16,1	17,78	0,365	0,773	0,221	9,4

Efeito Linear (L); Efeito Quadrático (Q); Desvio da linearidade (DL); Coeficiente de variação (CV); Milímetros (mm).

Na Tabela 12 é apresentado o perfil bioquímico sanguíneo de borregas alimentadas com níveis crescentes do complexo enzimático exógeno. Não houve diferença ( $P>0,05$ ) para a variável creatinina tendo média de 0,84 mg/dL situada

abaixo dos valores recomendados que são 1,2 - 1,9 mg/dL (KANEKO et al., 2008). Não houve diferença ( $P>0,05$ ) para ureia apresentando valor médio de 65,8 mg/dL estando acima dos valores recomendados que são 17,12 – 42,8 (GONZÁLEZ e SILVA, 2006). A concentração sanguínea de ureia está em relação direta com o aporte proteico da ração, bem como da relação energia e proteína da dieta (GONZÁLEZ, 2000), cabe ressaltar que as dietas possuíam em média 19,15% de PB o que pode ter exercido a capacidade do rúmen e sobrecarregado a taxa de excreção

O ácido úrico não foi influenciado pelos tratamentos, apresentando média de 0,19 mg/dL estando dentro dos valores recomendados entre 0 – 1,9 mg/dL, de acordo com Kaneko et al. (2008).

Na análise de proteínas totais (PT) não foi observada diferença ( $P>0,05$ ) e o valor médio encontrado foi de 5,71 g/dL estando próximo do recomendado para a espécie ovina que é de 6 – 7,9 g/dL (GONZÁLEZ e SILVA, 2006). Baixos valores de PT estão relacionados a deficiência de PB na dieta; em que dietas nutricionais com baixos teores de proteína ou casos de subnutrição severa diminuem as concentrações sanguíneas de PT (BRITO, 2004). Contudo, isso não foi evidenciado neste experimento, visto que as dietas foram balanceadas para ganho de peso de 200 g.anima<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup> e a relação volumoso concentrado era a mesma para todos os tratamentos.

Houve diferença ( $P<0,05$ ) para as concentrações séricas de albumina, apresentando comportamento linear decrescente de 0,085 mg/dL para cada 0,5% de inclusão do complexo enzimático. A albumina sérica é considerada o indicador mais sensível para determinar o status nutricional proteico (PEIXOTO et al., 2010). No presente estudo, o valor médio foi de 4,53 g/dL, acima do esperado para espécie que é de 2,4 – 3,0 g/dL (GONZÁLEZ e SILVA, 2006). O consumo de água poderia explicar o aumento desse metabólito, pois menores consumos de água podem elevar as concentrações dos metabólitos sanguíneos (SOUZA e BIRGEL JUNIOR et al., 2009), no entanto o consumo de água no presente trabalho esteve dentro do esperado para espécie.

Observou-se efeito linear decrescente ( $P<0,05$ ) sobre a aspartatoaminotransferase (AST) havendo diminuição de 8,9 UI/L para cada 0,5% de inclusão de enzima. A atividade enzimática representada pela AST manteve-se em média em 106,77 UI/L considerada normal para a espécie ovina de 60 – 280 UI/L

González e Silva (2006), demonstrando que nenhum dos tratamentos causou comprometimento ao funcionamento hepático.

De acordo com Herdt (1988) a AST é uma das enzimas de escolha para avaliação hepática mostrando-se bem sensível, mas com pouca especificidade. Já González e Silva et al. (2000) afirmaram que a AST em níveis elevados pode indicar transtornos hepáticos. O conhecimento sobre o metabolismo sanguíneo em ruminantes ainda é limitado, sendo necessário o desenvolvimento de novos trabalhos que busquem melhor compreender como esses metabólitos realmente funcionam.

Para a gama-glutamiltransferase (GGT) em todos os tratamentos os valores estiveram acima do recomendado por Kaneko et al. (2008) para a espécie ovina, situado na faixa de 20 – 52 UI/L. A média encontrada para a GGT no presente trabalho foi de 70,10 UI/L. A não diferença pode ser explicada pelo fornecimento de dieta única além do manejo e ambiente semelhante os quais as borregas foram submetidos durante todo o período experimental. Mendonça et al. (2008) relataram que o aumento da atividade sérica de GGT pode estar associada a problemas hepáticos, todavia não se pode inferir que os animais do presente experimento tiveram algum problema hepático já que os valores de GGT foram maiores do que o recomendado em todos os tratamentos.

Não houve diferença ( $P>0,05$ ) para a FA, e o valor médio encontrado no presente trabalho foi de 146,20 UI/L estando dentro do recomendado por Kaneko et al. (2008) entre (68 – 387 UI/L).

É importante ressaltar que os valores de referência para todos os metabólitos sanguíneos supracitados não podem ser considerados como normais para todas as categorias, visto que esses dados foram obtidos através de avaliações pontuais de animais mantidos em ambientes controlados (MENDONÇA et al., 2008).



**Tabela 12 – Bioquímica sanguínea de borregas alimentadas com níveis crescentes de um complexo enzimático exógeno.**

Variáveis	Tratamentos						Valor de P			CV (%)
	0,0%	0,5%	1,0%	1,5%	2,0%	L	Q	DL		
Creatinina (mg/dL)	0,77	0,88	0,85	0,89	0,85	0,122	0,099	0,422	8,89	
Ureia (mg/dL)	62,40	67,20	67,53	62,06	69,80	0,292	0,995	0,131	9,41	
Ácido Úrico (mg/dL)	0,15	0,21	0,25	0,20	0,16	0,916	0,126	0,901	52,68	
Proteínas Totais (g/L) <sup>1</sup>	5,52	5,90	5,69	5,73	5,69	0,667	0,243	0,285	5,05	
Albumina (g/L)	4,62	4,79	4,48	4,37	4,40	0,041 <sup>1</sup>	0,882	0,237	5,92	
Triglicerídeos (mg/dL)	22,13	22,33	22,46	22,26	20,13	0,530	0,515	0,954	20,36	
Colesterol (mg/dL)	39,86	47,99	45,20	47,86	42,13	0,612	0,046	0,410	13,39	
FA (UI/L)	173,73	128,93	150,53	143,86	133,93	0,216	0,492	0,282	23,93	
AST (UI/L)	128,33	106,06	114,59	96,66	88,20	0,043 <sup>2</sup>	0,981	0,596	26,25	
GGT (UI/L)	69,00	72,00	70,66	72,13	66,73	0,591	0,163	0,699	8,04	

<sup>1</sup>Y = 4,710800-0,174400X (R<sup>2</sup>=61,67%);

<sup>2</sup>Y = 124,705200-17,932800X (R<sup>2</sup>=82,57%).

Aspartatoaminotransferase (AST); Gama-glutamilttransferase (GGT); Fosfatase Alcalina (FA); Efeito Linear (L); Efeito Quadrático (Q); Desvio da linearidade (DL); Coeficiente de variação (CV).

Na Tabela 13 é apresentado o perfil glicêmico de borregas alimentadas com níveis crescentes de complexo enzimático exógeno na dieta. Pode-se observar que houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) para a glicemia das borregas alimentadas com 0,5% de enzimas havendo comportamento linear decrescente e diminuição de 0,53 mg/dL para cada 0,5% de enzima. Cunningham (2008) relata que o controle deste metabólito é realizado pela insulina e pelo glucagon, sob influência do cortisol, mantendo as médias dentro do intervalo da normalidade.

Os ruminantes possuem uma versatilidade bioquímica diferente dos não-ruminantes pois dispõem de várias rotas metabólicas gliconeogênicas hepáticas para a manutenção dos níveis glicêmicos na circulação no período pós-prandial e jejum. Uma queda linear nos níveis de glicose poderia ser causada por uma redução na fermentação ruminal e menor produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) principalmente o propionato que é o principal precursor gliconeogênico em ruminantes (KOZLOSKI, 2011). Contudo, não foram realizadas avaliações ruminais de AGCC, não sendo possível associar essa diminuição da glicose plasmática a produção de AGCC. No presente ensaio, o nível de glicose plasmática médio foi de 74,24 mg/dL estando de acordo com o recomendado, 50 – 80 mg/dL, segundo Kaneko et al. (2008). São poucos os trabalhos referentes ao uso de complexos enzimáticos na nutrição de ovinos e pouco se sabe sobre os mecanismos de ação desses aditivos, dessa forma, faz-se necessário novas pesquisas que busquem melhor compreender o funcionamento das enzimas no metabolismo de ruminantes.

**Tabela 13** – Glicemia de borregas (mg/dL) alimentadas com níveis crescentes de um complexo enzimático exógeno

Tratamentos	Tempo (h)					Valor de P			CV (%)
	0	3	6	9	12	L	Q	DL	
0,0%	68,20	64,80	63,00	68,40	66,20	0,979	0,601	0,741	15,78
0,5%	81,20	75,20	75,40	73,20	66,20	0,043 <sup>1</sup>	0,811	0,768	
1,0%	68,20	65,20	67,20	63,20	63,80	0,487	0,948	0,870	
1,5%	63,80	69,80	77,60	66,80	66,00	0,928	0,083	0,429	
2,0%	66,00	80,40	76,60	66,20	68,40	0,545	0,095	0,144	
L	0,223	0,151	0,103	0,542	0,812				
Q	0,535	0,475	0,695	0,893	0,653				
DL	0,146	0,222	0,300	0,514	0,960				

<sup>1</sup> $Y = 89,173333 - 1,066667X$  ( $R^2 = 87,95\%$ ).

Efeito Linear (L); Efeito Quadrático (Q); Desvio da linearidade (DL); Coeficiente de variação (CV).

#### 4. CONCLUSÃO

A inclusão do complexo enzimático exógeno não influencia o consumo de matéria seca, o consumo de água, e o perfil de distribuição de partícula de sobras das dietas. No entanto, a glicemia e a concentração sérica de albumina e aspartatoaminotransferase foram afetadas.

#### 5. REFERÊNCIAS

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis** (red.). Washington DC: AOAC, 1015p. 1980.

BARTLETT, M.S. Properties of sufficiency and statistical tests. **Proceedings of the Royal Society**, v. 160, Series A, p. 268-282, 1937.

BERNARDES, T.F.; REGO, A.C. Study on the practices of silage production and utilization on Brazilian dairy farms. **Journal of Dairy Science**, v.97, n.3, p.1852 -1861, 2014.

BRITO, M.R.A. **Variação dos perfis metabólico, hematológico e lácteo em ovinos leiteiros na serra gaúcha**. 2004. 53 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

CARVALHO, M.B. Semiologia do Sistema Urinário. In: FEITOSA, F.L (Ed.). **Semiologia Veterinária: a arte do diagnóstico**. São Paulo: Roca. p.389- 409, 2008.

CIRNE, L.G.A.; OLIVEIRA, G.J.C.; JAEGER, S.M.P.L.; et al. Comportamento ingestivo de cordeiros em confinamento, alimentados com dieta exclusiva de concentrado com diferentes porcentagens de proteína. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.66, n.1, p.229–234, 2014.

CROSBY, M.M.; MENDOZA, G.D.; MELGOZA, L.M. et al. Amylase on starch digestibility and sheep performance, **Journal of Applied Animal Research**, v.30, n. 2, p.133–136, 2006.

CUNNINGHAM, J. G. **Tratado de fisiologia veterinária**. 4.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

FAICHNEY, G.J. The kinetics of particulate matter in the rumen. In: MILLIGAN, L.P.; GROVUM, W.L; DOBSON, A. (Eds.) **Control of digestion and metabolism in ruminants**.

INTERNACIONAL SYMPOSIUM ON RUMINANT PHYSIOLOGY, 6, 1986, Canada. **Proceedings...** Englewood Cliffs: Prentice-Hall, p.173-195. 1986.

FERRELL, C. L., JENKINS, T. G. Energy utilization by mature, nonpregnant, nonlactating cows of different types. **Journal of Animal Science.**, 58(1):234-243. 1984.

FIGUEIREDO, M.R.P.; SALIBA, E.O.S.; BORGES, I.; et al. Comportamento ingestivo de ovinos alimentados com diferentes fontes de fibra. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.65, n.2, p.485–489, 2013.

FISCHER, V.; DESWYSEN, A.G.; AMOUCHE, E.H. et al. Efeitos da pressão de pastejo sobre o padrão neotemeral do comportamento ingestivo de ovinos em pastagem. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.27, p.164-170, 1998.

FORBES, J.M. Physiology of regulation of food intake. In: ROOK, J.A.F.; THOMAS, P.C. (Eds.). **Nutritional physiology of farms animals**. London: Longman, p.177-202. 1983.

GIESECKE, D.; EHRENTREICH, L.; STANGASSINGER, M. Mammary and renal excretion of purine metabolites in relation to energy intake and milk yield in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.81, n.9, p.2408 - 2420, 1998.

GOMES, S.P. **Tamanho de partícula do volumoso e frequência de alimentação sobre aspectos nutricionais e do metabolismo energético em ovinos**. 2008. 83p.Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte, 2008.

GONZÁLEZ, F.H.D. Uso de perfil metabólico para determinar o status nutricional em gado de corte. In: GONZÁLEZ, F.H.D.; BARCELLOS, J.O; OSPINA, H.; RIBEIRO, L.A.O. (Eds). **Perfil Metabólico em ruminantes: seu uso em nutrição e doenças nutricionais**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000.

GONZÁLEZ, F.H.D.; SILVA, S.C. **Introdução à bioquímica clínica veterinária**. 2.ed. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006. Guanabara Koogan, 710 p. 2008.

HERDT, T.H. Fatty liver in dairy cows. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.4, n.2, p.213-231, 1988.

HERNÁNDEZ, P.A.; MENDOZA, G.D.; BÁRCENA, J.R.; et al. Effect of exogenous fibrolytic enzyme and slow release urea in finishing rations for lambs. **Journal of Applied Animal Research**, v.39, n.2, p.104–107, 2011.

JAYME, C.G.; GONÇALVES, L.C.; MOLINA, L.R. et al. Consumo e digestibilidade aparente de silagens de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu adicionada de aditivos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.3, p.704 -711, 2011.

KAMBLE, R.D.; JADHAV, A.R. The isolation, identification and screening of potential xylanases of cellulase-free producing fungi and their production. **African Journal of Biotechnology**, v.11, p.14175-14181, 2012.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. Clinical biochemistry of domestic animals. 6 ed. San Diego: **Academic Press**, 916p., 2008.

KONONOFF, P.J.; HEINRICHS, A.J.; BUCKMASTER, D.R. modification of the Penn State forage and total mixed ration particle separator and the effects of moisture content on its measurements. **Journal of Dairy Science**, v.86, p.1858- 1863, 2003.

KOZLOSKI, G. V. **Bioquímica dos ruminantes**. 3<sup>a</sup> ed. Revisada e ampliada. Santa Maria: Editora da UFSM, 2011.

LYNCH, J.P.; JIN, L.; CHURCH, J.S. et al. Fibrolytic enzymes and a ferulic acid esterase-producing bacterial additive applied to alfalfa hay at baling: Effects on fibre digestibility, chemical composition and conservation characteristics. **Grass and Forage Science**, v.70, n.1, p.85-93, 2015.

McALLISTER, T. A.; HRISTOV, A. N.; BEAUCHEMIN, K. A. et al. Enzymes in ruminant diets. In: BEDFORD, M. R.; PARTRIDGE, G. G. (Eds.). **Enzymes in Farm Animal Nutrition**. Oxon: CABI Publishing, p.273-298. 2001.

MEALE, S.J. BEAUCHEMIN, K.A. CHRISTOV, A.N.A.V.; CHAVES, T.A.M. Opportunities and challenges in using exogenous to improve nonruminant animal production. **Journal of Animal Science**, p. 427–442, 2014.

MENDES, C.Q.; TURINO, V.F.; SUSIN, I. et al. Comportamento ingestivo de cordeiros e digestibilidade dos nutrientes de dietas contendo alta proporção de concentrado e diferentes fontes de fibra em detergente neutro. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p.594-600, 2010.

MENDONÇA, F.S.; CAMARGO, L.M.; FREITAS, S.H.; et al. Aspectos clínicos e patológicos de um surto de fotossensibilização hepatógena em ovinos pela ingestão de *Brachiaria decumbens*. **Ciência Animal Brasileira**, v.9, n.4, p.1034–1041, 2008.

MORGAVI, D.P.; NEWBOLD, C.J.; BEEVER, D.E. et al. Stability and stabilization of potential feed additive enzymes in rumen fluid. **Enzyme and Microbial Technology**, v.26, n.2-4, p.171-177, 2000.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. Nutrient requirements of beef cattle. 7.ed. rev. Washington, D.C: National Academy Press, 234 p. 2000.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 1328 p.

NUNES, I. J. **Nutrição animal básica**. 2 ed. Belo Horizonte: UFMG, 388 p. 1998.

PEIXOTO, L.A.O.; OSÓRIO, M.T.M.; OSÓRIO, J.C.S. Metabólitos sanguíneos de ovelhas Ile de France sob suplementação com sal orgânico ou sal comum durante a estação de monta. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n,1, p.191-197, 2010.

PETERS, A.; ULRICH, M.; DÄNICKE, S. Effect of exogenous fibrolytic enzymes on performance and blood profile in early and mid-lactation Holstein cows. **Animal Nutrition**, v.1, p. 229-238, 2015.

POPPI, D.P.; NORTON, B.W.; MINSON, D.J. et al. The validity of the critical size theory for particles leaving the rumen. **Journal of Agriculture Science**, v.94, n.2, p.275-280, 1980.

REDDY, N.S.; NIMMAGADDA, A.; RAO, K.R.S.S. An overview of the microbial  $\alpha$ -amylase family. **African Journal of Biotechnology**, v.2, n.12, p.645-648, 2003.

REIS, R.A.; LARA, E.C.; RABELO, C.H.S. Enzimas na nutrição de ruminantes. In: CONGRESSO NORDESTINO DE PRODUÇÃO ANIMAL, 10, 2015, Teresina, PI. **Anais...**Teresina: SNPA, p. 55-76. 2015.

SALEM, A.Z.M.; BUENDIA-RODRIGUEZ, G.; ELGHANDOUR, M.M.Y.; MARIEZCURRENA BERASAIN, M.A.; PENA JIMENEZ, F.J.; PLIEGO, A.B.; CHAGOYAN, J.C.V.; CERRILLO, M.A.; RODRIGUEZ, M.A. Effects of cellulase and xylanase enzymes mixed with increasing doses of *Salix Babylonica* extract on in vitro

rumen gas production kinetics of a mixture of corn silage with concentrate. **Journal of Integrative Agriculture**, v.14, p.31–139, 2015.

SHAPIRO and WILK. An Analysis of Variance Test for Normality. **Biometrika**, v. 52, n. 3/4, p. 591-609. 1965.

SILVA, J.F.C.; LEÃO, M.I. **Fundamentos de nutrição de ruminantes**. Piracicaba: Livrocere, 380 p. 1979.

SOUZA, R.M.; BIRGEL JUNIOR, E.H. Influência do puerpério e da fase pós-puerperal no lipidograma de vacas da raça Holandesa criadas no Estado de São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.46, n.1, p.5-10, 2009.

TAKIYA, C, S. **Desempenho de bovinos alimentados com dietas contendo enzimas amilolíticas exógenas**. 2016. 83 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de São Paulo, Pirassununga. 2016.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional Ecology of the Ruminant**. 2.ed. Ithaca: Cornell University, 476p. 1994.

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

**CAPÍTULO 5 - CONSUMO, DIGESTIBILIDADE, BALANÇO DE NITROGÊNIO E ENERGIA, COMPORTAMENTO E METABOLITOS SANGUÍNEOS DE CORDEIROS ALIMENTADOS COM NÍVEIS CRESCENTES DE UM MIX DE ENZIMAS NA DIETA**

---

Trabalho formatado de acordo com as normas do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal (PPGcat) Tropical da Universidade Federal do Tocantins



## **Consumo, digestibilidade, comportamento e bioquímica sanguínea de cordeiros alimentadas com níveis crescentes de um MIX de enzimas na dieta**

**Resumo** - O objetivo do presente trabalho foi avaliar o consumo, a digestibilidade, o comportamento e os metabólitos sanguíneos de borregos alimentados com níveis crescentes de um MIX de enzimas exógenas na dieta. O ensaio foi realizado em um delineamento em quadrado latino (5x5), com cinco tratamentos e cinco repetições. Foram utilizados cinco borregos mestiços Santa Inês x Dorper com peso inicial médio de  $25,89 \pm 2,6$  kg e aproximadamente quatro meses de idade. Para condução do experimento todos os animais utilizados foram alojados em gaiolas metabólicas individuais, durante sessenta dias. Avaliou-se a adição de um MIX de enzimas que era composto por três produtos comerciais nas seguintes proporções ( $\frac{1}{3}$ -AMAIZE<sup>TM</sup>;  $\frac{1}{3}$ -FIBROZYME<sup>®</sup>;  $\frac{1}{3}$ -ALLZYME<sup>®</sup> SSF). Os tratamentos consistiram em dieta controle e quatro níveis de inclusão de enzima amilolítica 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0%. Foi observada diferença significativa para os consumos de matéria seca ( $\text{g.animal}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ ), apresentando comportamento linear crescente e acréscimo de 0,045g para cada 0,5% do MIX de enzimas incluída na dieta. Não houve diferença significativa para o consumo de matéria seca em função do peso vivo  $\%PV^{-1}$  e peso metabólico  $PV^{-0,75}$ . Não houve diferença significativa para o coeficiente de digestibilidade aparente da matéria seca e escore fecal. O peso das fezes na matéria natural diferiu significativamente com a inclusão do MIX. O consumo de água aumentou linearmente com a inclusão do MIX de enzimas apresentando acréscimo de 183 mL para cada 0,5%. O comportamento ingestivo não foi afetado pelos tratamentos. Não houve diferença significativa para eficiência de ruminação e mastigação. A distribuição de partículas das sobras de alimento não sofreu efeito dos tratamentos. Houve diferença significativa para os metabólitos sanguíneos glicose e aspartatoaminotransferase apresentando comportamento linear decrescente. As inclusões de um MIX de enzimas exógenas nos níveis testados no presente trabalho não influenciaram a digestibilidade da matéria seca, o comportamento ingestivo e a eficiência alimentar dos borregos. A inclusão do MIX de enzimas causou um aumento no consumo dos nutrientes, no consumo de água e interferiu nas concentrações séricas de aspartatoaminotransferase.

**Palavras-Chave:** amilase, fibra, ingestão, nutrição, ovinos, xilanase

## **Feed intake, digestibility, feeding behavior and blood biochemistry of lambs fed diets with increasing levels of an exogenous enzyme MIX**

**Abstract** – The objective of this study was to evaluate the feed intake, digestibility, feeding behavior, and blood metabolites of lambs fed diets with increasing levels of an exogenous enzyme MIX. The experiment was conducted using a Latin square design (5x5), with five treatments and five replicates. Five Santa Inês x Dorper crossbred male lambs with a mean initial body weight of  $25.89 \pm 2.6$  kg and aged four months were used. All animals were housed in individual metabolic cages for sixty days. The dietary inclusion of an enzyme MIX composed of three commercial products at the equal proportions ( $\frac{1}{3}$ -AMAIZE<sup>TM</sup>;  $\frac{1}{3}$ -FIBROZYME<sup>®</sup>; and  $\frac{1}{3}$ -ALLZYME<sup>®</sup> SSF) was evaluated. The treatments consisted of a control diet and four inclusion levels of the enzyme MIX (0.5; 1.0; 1.5 and 2.0%). The dry matter intake ( $\text{g}\cdot\text{animal}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ ) increased linearly by 0.045g with each 0.5% of inclusion of the enzyme MIX. There was no significant difference for dry matter intake as a percent of body weight ( $\%BW^{-1}$ ) and metabolic weight ( $BW^{0.75}$ ). There was no significant difference for apparent digestibility coefficient of dry matter and fecal score. The fecal output weight (organic matter basis) differed significantly in lambs fed different inclusion levels of the enzyme MIX. The water intake increased linearly by 183 mL with each 0.5% of inclusion of the enzyme MIX. Neither feeding behavior nor the efficiencies of rumination and chewing were affected by treatments. The particle size distribution of orts was not influenced by the inclusion of the enzyme MIX. The blood metabolites glucose and aspartate aminotransferase reduced linearly with the inclusion of the enzyme MIX. The dietary inclusion of the exogenous enzyme MIX did not affect the dry matter digestibility, feeding behavior, and feeding efficiency in lambs. On the other hand, the inclusion of the enzyme MIX increased nutrient intake, water intake and affected the serum concentration of aspartate aminotransferase in lambs.

**Keywords:** amylase, fiber, ingestion, nutrition, sheep, xylanase

## 1. INTRODUÇÃO

Os sistemas modernos de criação utilizam técnicas de manejo alimentar de modo a maximizar o desempenho zootécnico dos animais, obtendo maiores índices produtivos, favorecendo um abate precoce e maior retorno econômico (ARAÚJO FILHO et al., 2010). A utilização de enzimas exógenas na nutrição de ruminantes vem sendo cada vez mais estudada, devido ao grande potencial que esta pode fornecer a nutrição e conseqüentemente a produção animal, uma vez que pode aumentar a degradabilidade ruminal dos nutrientes e diminuir dessa forma o desperdício.

Enzimas, amilolíticas, fibrolíticas e proteolíticas, são utilizadas para melhorar o valor nutritivo de silagens e cereais (YOUNG et al., 2012), uma vez que estes são os principais alimentos utilizados na nutrição de ruminantes no Brasil (BERNARDES e RÊGO, 2014). Para atingir máximo benefício com o uso de enzimas na nutrição de ruminantes, um grande número de enzimas diferentes ou uma enzima com ação sobre diversos substratos deveria ser usado na dieta, visto que as rações de ruminantes são compostas por uma enorme variedade de alimentos incluindo volumosos, concentrados, sub e coprodutos (TAKIYA, 2016).

O uso de diferentes enzimas com capacidade destronizaste para diversos nutrientes tem sido foco de vários estudos como enzimas fibrolíticas (YANG et al., 2011; CHUNG et al., 2012; MOHAMED et al., 2013), enzimas amilolíticas (NOZIÈRE et al., 2014); KLINGERMAN et al., 2009; GENCOGLU et al., 2010), enzimas proteolíticas (EUN e BEAUCHEMIN, 2005; VERA et al., 2012) e complexo enzimático composto por enzimas fibrolíticas, amilolíticas e proteolítica (EL-KADY et al., 2006)

O entendimento e a compreensão de como as enzimas exógenas se comportam no metabolismo dos ruminantes é de extrema importância para o desenvolvimento da nutrição e produção animal (REIS et al., 2015). Contudo, poucos trabalhos são encontrados na literatura referentes a utilização de enzimas na alimentação de ovinos, assim faz-se necessário estudos que enfoquem como esses aditivos interagem no metabolismo e nutrição de ruminantes.

Diante do exposto o objetivo do presente trabalho foi avaliar o consumo, a digestibilidade, o comportamento e metabolitos sanguíneos de borregos alimentados com níveis crescentes de uma mistura de enzimas exógenas na dieta.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Local**

O experimento foi conduzido no setor de ovinos e caprinos situado nas dependências da Fazenda Capim Branco pertencente a Universidade Federal de Uberlândia - UFU, Uberlândia, Minas Gerais. O período experimental foi realizado durante os meses de fevereiro a maio de 2017. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da UFU, registrado pelo protocolo de nº 017/16.

### **2.2 Animais**

Foram utilizados cinco borregos mestiços Santa Inês x Dorper com peso inicial médio de  $25,89 \pm 2,6$  kg e escore da condição corporal 2,5 e aproximadamente 3 meses de idade. No período de adaptação, todos os animais foram vermifugados, identificados, pesados e distribuídos aleatoriamente em gaiolas metabólicas, as quais eram providas de comedouro, bebedouro, cocho com sal mineral e dispositivo apropriado para coleta de fezes e urina. O experimento teve duração de sessenta dias, divididos em cinco períodos de 12 dias: cinco dias de adaptação dos animais as dietas experimentais e as gaiolas metabólicas; cinco dias de coleta sanguínea e das excretas de fezes e urina; um dia para análise do comportamento ingestivo; e o último dia para avaliação da curva glicêmica dos animais, totalizando sete dias de coleta de dados.

Os animais foram pesados em balança própria para a espécie no primeiro dia do experimento e no último dia de cada período de coleta, obtendo-se, assim, o peso dos animais ao início e término de cada período experimental. O peso foi utilizado para cálculo do consumo em gramas por quilo de peso vivo ( $\text{g. PV}^{-1}$ ) e peso metabólico ( $\text{g. PV}^{-0,75}$ ) ajustando-se a quantidade de sobras a partir deste.

### **2.3 Alimentação**

As dietas foram calculadas para atender às exigências nutricionais de borregas de porte médio, com ganho médio de  $200 \text{ g.animal.dia}^{-1}$  (NRC, 2007). A ração era fornecida duas vezes ao dia, às 08h:00 e às 16h:00, na forma de ração total misturada (RTM), e o consumo era ajustado de acordo com as sobras do dia anterior, sendo admitido sobras de 5 a 10% do total fornecido.

Os animais receberam água e sal mineral *ad libitum*. As dietas eram compostas por silagem de milho e concentrado em uma proporção percentual 20V:80C. O

concentrado era composto por milho moído, farelo de soja, sal mineral e ureia (Tabela 1)

**Tabela 1** – Proporção dos ingredientes na composição do concentrado experimental e composição bromatológica da silagem e do concentrado.

Ingredientes	g.Kg <sup>-1</sup>					
Milho Moído	605,0					
Farelo de Soja	360,0					
Ureia	10,0					
Sal Mineral	25,0					
Alimentos	MS	PB	FDN	FDA	NDT	EE
Concentrado	897,0	245,0	248,0	73,0	818,8	314,0
Silagem	340,0	65,0	566,0	336,0	631,7	24,0

Matéria Seca = MS; Proteína Bruta = PB; Fibra em Detergente Neutro = FDN; Fibra em Detergente Ácido = FDA; Nutrientes Digestíveis Totais = NDT; Extrato Etéreo = EE; Mínimo = mín.; Máximo = máx.

## 2.4 Enzima

As enzimas utilizadas compõem um produto denominado de MIX de enzimas composto por três produtos comerciais nas seguintes proporções ( $\frac{1}{3}$ -AMAIZE™;  $\frac{1}{3}$ -FIBROZYME®;  $\frac{1}{3}$ -ALLZYME® SSF) compostos por pectinase, protease, fitase, betaglucanase, xilanase, celulase e amilase, os níveis de enzimas foram dispostos de acordo com as recomendações do fabricante dos três produtos, sendo cada porcentagem de enzima calculada em função do consumo de matéria seca animal dia. Foram dispostos dois níveis acima e um nível abaixo da recomendação comercial do fabricante (0,0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0%) e o controle, sendo o nível recomendado 1%. A mistura de enzimas foi adicionada a ração no momento do fornecimento para os animais.

**Tabela 2** – Descrição do MIX de enzimático pelo autor.

Proporção	Composto Mix de Enzima	Fonte de Extração
$\frac{1}{3}$	Amilase (min.) 600 u*/g	Levedura inativada e fermentação de <i>Aspergillus niger</i>
$\frac{1}{3}$	Xilanase (min.) 100 u*/g	Levedura inativada, Extrato de Yucca, Levedura seca de cervejaria, Produto seco de fermentação de <i>Trichoderma longibrachiatum</i>
$\frac{1}{3}$	Pectinase (min) 4000 u*/g Protease (min.) 700 u*/g Fitase (min.) 300 u*/g Betaglucanase (min.) 200 u*/g Xilanase (min.) 100 u*/g Celulase (min.) 40 u*/g Amilase (min.) 30 u*/g	Produto de fermentação de <i>Aspergillus niger</i>

\*Uma unidade de atividade enzimática equivale à quantidade de enzima que dextriniza 1 grama de substrato solúvel por minuto, a pH 4,8 e 30°C.

Na tabela 3 são apresentadas as quantidades de unidade de atividade enzimática para cada tratamento em função das enzimas utilizadas na mistura de enzimas.

**Tabela 3** – Número de unidades de atividade enzimática para cada enzima por tratamento.

Tratamento	Pect	Prot	Fitase	Betag	Celu	Xila	Amil
0,5%	733,3	128,3	55,0	36,7	7,3	36,7	115,5
1,0%	1466,7	256,7	110,0	73,3	14,7	73,3	231,0
1,5%	2200,0	385,0	165,0	110,0	22,0	110,0	346,5
2,0%	2933,3	513,3	220,0	146,7	29,3	146,7	462,0

Pectinase – Pect; Protease – Prot; Betaglucanase – Betag; Celulase – Celu; Xilanase – Xila; Amilase – Amil.

## 2.5 Coleta de Dados

Nos baldes coletores de urina foram adicionados 100 mL de ácido clorídrico (HCl 2N) na véspera de cada coleta, evitando-se, assim, possíveis processos fermentativos que gerassem perda de nitrogênio por volatilização. O volume total de urina foi medido com proveta graduada. Para cada animal foi retirada uma alíquota de 20% do volume total colhido diariamente e a amostra foi acondicionada em frasco plástico (uma amostra composta por animal por período experimental) e imediatamente congelada para posteriores análises. Também foi realizada a mensuração da densidade da urina através de refratômetro portátil.

As fezes passaram por um processo de avaliação de escore o qual foi realizado visualmente por um único avaliador, obedecendo à seguinte escala conforme Gomes (2008): 1 – fezes ressecadas e sem brilho; 2 – fezes normais; 3 – fezes ligeiramente amolecidas; 4 – fezes amolecidas perdendo o formato e coladas umas às outras (cacho de uva); 5 – fezes amolecidas e sem formato normal (fezes de suínos); e 6 – fezes diarreicas. Esse procedimento foi realizado durante os cinco dias de coleta.

A coleta total de fezes foi realizada diariamente. O peso da produção total era registrado, sendo reservada alíquota de 20%. Ao final de cada fase do experimento, foram preparadas amostras compostas, por animal, que foram embaladas em sacos plásticos individuais e armazenadas a -10°C. No final do ensaio, as amostras compostas, foram descongeladas a temperatura ambiente por 12 horas, colocadas em bandejas de alumínio e levadas a estufa de ventilação forçada (55°C) até atingirem peso constante para determinar a matéria pré-seca. Posteriormente, as amostras

foram moídas em moinho de facas com peneira de 1 mm e acondicionadas em recipientes plásticos para futuras análises.

As amostras de silagem, concentrado e sobras de alimento foram retiradas e pesadas diariamente e ao final dos cinco dias de coleta, foram misturadas e homogeneizadas para obtenção da amostra composta para cada animal por período experimental. Após isso, as amostras foram secas em estufa de ventilação forçada à 55°C, sendo, posteriormente, moídas em moinho de facas com peneira de 1 mm e acondicionadas para futuras análises laboratoriais.

Durante as fases de coleta foram disponibilizados 6 L de água animal<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup> em bebedouros individuais, sendo acrescentadas e registradas quantias adicionais de acordo com a ingestão dos animais. As sobras de água foram mensuradas diariamente através de proveta graduada, sendo os valores registrados para calcular o volume de água consumida. Dentro do galpão foi colocado um recipiente de mesmo volume dos bebedouros (6 L) para se mensurar a evaporação que, posteriormente, foi descontada do volume diário consumido para cada animal.

## **2.6 Análises Bromatológica**

As análises laboratoriais foram realizadas nas dependências do Laboratório de Nutrição Animal da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia de UFT. Para as determinações de matéria seca, cinzas, extrato etéreo e proteína bruta do material analisado seguiu-se a metodologia proposta por AOAC (1995). Já para a quantificação da fibra em detergente neutro, fibra em detergente ácido, celulose, hemiceluloses e ligninas utilizou-se a metodologia proposta por Van Soest et al. (1991). Para estimativa dos carboidratos totais (CHT) usou-se a equação proposta por Sniffen et al. (1992), segundo a qual,  $CHT = 100 - (\%PB + \%EE + \%MM)$  e, para a estimativa dos carboidratos não fibrosos (CNF) da silagem foi usada a equação preconizada por Hall et al. (1999), qual seja,  $CNF = \%CHT - \%FDN_{cp}$ , sendo  $FDN_{cp}$  a porção de FDN corrigida para cinzas e proteína e em razão da presença de uréia nas dietas, os carboidratos não-fibrosos (CNF) dos concentrados foram estimados como proposto por Hall (2000), em que  $\%CNF = 100 - [(\%PB - \%PB \text{ derivada da uréia} + \% \text{ de uréia}) + \%EE + \%FDN + \%cinzas]$ .

Para o cálculo dos nutrientes digestíveis totais (NDT) no ensaio de digestibilidade utilizou-se a equação sugerida por Weiss (1999):

$$NDT = [PBD + CNFD + FDN_{cpD} + (EED * 2,25)]$$

Onde, PBD; CNFD; FDN<sub>cpD</sub> e EED significam, respectivamente, consumo de PB, CNF, FDN e EE digestíveis, com a FDN corrigida para cinzas e proteína.

Após a pré-secagem das amostras de sobras e fezes, em estufa a 105°C por 24 horas, foi possível calcular a matéria seca definitiva e o teor dos nutrientes, e posteriormente, a digestibilidade aparente destes.

Primeiramente, foi calculado o consumo de nutrientes a partir da fórmula proposta por Maynard et al. (1984):

$$CNut = (Cons \times \%Cons) - (Sob \times \%Sob)$$

Onde:

CNut = consumo do nutriente (kg);

Cons = quantidade de alimento consumido (kg);

%Cons = teor do nutriente no alimento fornecido (%);

Sob = quantidade de sobra retirada (kg);

%Sob = teor do nutriente nas sobras (%).

Os coeficientes de digestibilidade de matéria seca, matéria orgânica, proteína bruta, extrato etéreo, fibra em detergente neutro, fibra em detergente ácido, celulose, hemiceluloses e energia bruta foram feitos a partir da seguinte fórmula, de acordo com Silva e Leão (1979).

$$CDap = \frac{(Ingerido - Excretado)}{Ingerido} \times 100$$

Onde:

CDap = coeficiente de digestibilidade aparente (%);

Ingerido = média da quantidade de nutrientes do alimento ingerido (ofertado – sobras) (kg/dia);

Excretado = média da quantidade de nutriente nas fezes (kg/dia).



O teor de nitrogênio (N) na urina foi determinado pelo método Kjeldahl (SILVA e QUEIROZ, 2002), com as seguintes adaptações:

- Em um mL de amostra de urina, foram adicionados 5 mL de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e mistura catalítica em um tubo de ensaio;
- Iniciou-se a digestão das amostras em 50°C e aumentou-se a temperatura gradualmente (a cada 50 °C) até ocorrer a mudança de cor da amostra;
- Posteriormente, fez-se a destilação das amostras, adicionando um pouco de água destilada a amostra digerida. No aparelho de destilação adicionou-se 25 mL de hidróxido de sódio 50% (NaOH) e 20 mL de ácido bórico (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>) em erlenmeyer. O volume de amostra destilada coletada foi de 100 mL;
- Após a destilação, a amostra foi titulada utilizando ácido clorídrico (HCl) a 0,1N, adicionando o ácido até observar mudança na cor;
- A quantidade de ácido gasto na titulação foi utilizada para calcular o teor de N da amostra, através da fórmula:

$$\%N = \frac{V \times FC \times N \times 0,014}{P} \times 100$$

Onde:

V = volume de HCl 0,1N gasto na titulação;

FC = fator de correção do HCl 0,1N;

N = normalidade do ácido utilizado na titulação; 0,014 = miliequivalente-grama do nitrogênio;

P = peso da amostra em gramas.

Posteriormente, foi calculado o consumo de N (CN) através da fórmula:

$$CN = [N \text{ fornecido } (g) - N \text{ das Sobras}(g)]$$

O balanço de nitrogênio (BN), ou nitrogênio retido, foi obtido utilizando-se a fórmula proposta por Zeoula et al. (2006), considerando-se as quantidades de

nitrogênio consumido (NC); nitrogênio excretado nas fezes (NF) e nitrogênio excretado na urina (NU).

$$BN = [(N \text{ fornecido } g - N \text{ das sobras } g) - (N \text{ nas fezes } g + N \text{ na urina } g)]$$

A partir destes valores, foi realizado o cálculo para nitrogênio de excreção total (NET) e nitrogênio endógeno basal (NEB) de acordo com o AFRC (1993), que considera o N endógeno tecidual e as perdas dérmicas de N como 0,35 e 0,018 do peso metabólico, respectivamente.

Assim, os valores foram expressos como:

$$NET(g.d)^{-1} = (NF + NU)$$

$$NEB(g.d)^{-1} = (0,35 + 0,018) \times PV^{0,75}$$

A energia bruta (EB) foi obtida em calorímetro adiabático modelo PARR 6200. Os valores da energia digestível (ED) foram calculados utilizando-se a técnica direta de determinação de energia com bomba calorimétrica. Para isso, foi medida a energia contida nas fezes, no alimento ofertado e nas sobras do alimento.

A energia metabolizável foi obtida através da fórmula de Blaxter e Clapperton (1965), na qual a ED é igual a EB ingerida menos a EB excretada nas fezes. Já a EM é igual à ED menos a EB da urina mais a energia dos gases (EG).

A produção de metano foi estimada pela seguinte equação:

$$Cm = 0,67 + 0,062 \times D$$

Onde:

Cm = produção de metano em kcal/ 100 kcal de energia consumida; e

D = digestibilidade aparente da energia bruta do alimento.

A estimativa da energia bruta da urina foi realizada segundo a equação proposta por Street et al. (1964):

$$EU.kcal.gm = 0.027 + 0.119 \times (\%NU)$$

## 2.7 Avaliação Comportamental

Para a avaliação do comportamento ingestivo, os animais foram submetidos a observação visual por 24 horas no penúltimo dia de cada período de coleta de dados, perfazendo um total de cinco avaliações comportamentais durante o experimento. Durante o período noturno, o ambiente recebeu iluminação artificial, e por isso, os animais foram pré-adaptados durante um período de cinco dias. Foram observadas, a cada cinco minutos, as variáveis de ingestão de alimento e de água, ruminação e ócio, de acordo com a metodologia proposta por Fischer et al. (1998). As observações comportamentais foram realizadas por observadores treinados, em sistema de revezamento, que se posicionavam de forma estratégica, de modo a não influenciar o comportamento natural dos animais. As observações foram iniciadas às 8h:00 da manhã com término no mesmo horário do dia seguinte. Os cálculos das atividades foram feitos em minutos por dia, admitindo-se que nos cinco minutos subsequentes a cada observação o animal permaneceu na mesma atividade. Já o tempo total de mastigação foi determinado somando-se os tempos de ingestão e ruminação.

A eficiência alimentar em função do consumo de MS, FDN e FDA foi calculada dividindo-se o consumo destas variáveis pelo tempo gasto em horas de ingestão, ruminação e mastigação.

$$EIng = (CMS/CFDN/CFDA)g \div Ingestão (h)$$

$$ERum = (CMS/CFDN/CFDA)g \div Ruminação (h)$$

$$EMast = (CMS/CFDN/CFDA)g \div Mastigação (h)$$

Onde:

EIng = eficiência de ingestão em grama por hora;

ERum = eficiência de ruminação em grama por hora;

EMast = eficiência de mastigação em grama por hora.

## 2.8 Tamanho de Partícula

Para avaliação do tamanho de partícula da ração total misturada (RTM) e das sobras utilizou-se o separador de partícula modelo Penn State Particle Size (PSPS), que continha quatro peneiras, nas quais ficavam retidos diferentes tamanhos de partículas, sendo eles: >19 mm, entre 19 mm e 8 mm, entre 8 mm e 1,18 mm e partículas <1,18 mm. O uso do PSPS seguiu a metodologia descrita por Kononoff et al. (2003). Eram realizados cinco movimentos de vai e vem em um dos lados da peneira, e então o conjunto era girado em 90°, isso se repetiu por oito vezes, totalizando quarenta movimentos, o conteúdo retido em cada peneira era então pesado.

Para essa avaliação, 2 kg de amostra das RTM's e das sobras foram, individualmente, homogeneizadas e quarteadas ao final de cada período experimental de forma a se obter quatro amostras de 500 g, as quais foram processadas no PSPS para se obter a média do tamanho de partícula para cada peneira, por tratamento em cada fase. Na Tabela 4 está apresentado o perfil de distribuição de partículas das RTM's da dieta oferecida da silagem e do concentrado.

**Tabela 4** – Perfil de distribuição descritiva das partículas da RTM do ofertado, da silagem e do concentrado (%) em função dos tamanhos de partículas.

Itens	> 19 mm (%)	19 mm<8 mm (%)	8 mm<1,18 mm (%)	<1,18 mm (%)
RTM	2,8	14,3	46,6	36,3
Silagem	17,2	53,2	26,6	3,0
Concentrado	0,04	0,08	44,0	54,8

RTM = Ração Total Misturada; Milímetros = mm.

## 2.9 Análises Sanguíneas

As coletas de sangue foram realizadas sempre antes da primeira refeição do dia, sendo três coletas por período experimental de digestibilidade, para realização de média dos parâmetros sanguíneos avaliados. As coletas foram feitas por venopunção jugular com auxílio de *vacuntainer*® e tubo de ensaio com capacidade de 10 mL sem anticoagulante. Posteriormente, as amostras de sangue foram centrifugadas por 10 minutos a 4.000 rpm e os plasmas obtidos eram armazenados em flaconetes, devidamente identificados, sendo mantidos sob refrigeração a -8 °C. Os indicadores bioquímicos determinados no sangue foram: creatinina, ureia, ácido úrico, proteínas totais, albumina, colesterol, triglicerídeos, aspartatoaminotransferase (AST), gama-

glutamiltransferase (GGT) e fosfatase alcalina (FA). As análises bioquímicas no plasma foram feitas utilizando-se kits comerciais da Labtest<sup>®</sup>, em espectrofotômetro da marca Bioplus<sup>®</sup> 2000.

Para mensuração da glicemia referente a cada fase experimental, as coletas de sangue foram realizadas por venopunção jugular em tubos siliconizados com anticoagulante (Fluoreto de Sódio com EDTA 10%). O sangue foi centrifugado e o plasma armazenado em flaconetes para posteriores análises de glicose. Os tempos de coleta pré-estabelecidos foram 0 h (antes do fornecimento da ração), 3h, 6h, 9h e 12h pós-prandial. As análises das amostras sanguíneas obtidas durante o período experimental foram procedidas no Laboratório de Análise de Alimentos pertencente ao curso de Zootecnia da UFU, Campus Umuarama.

## 2.10 Delineamento e Análise Estatística

O ensaio foi realizado em um delineamento em quadrado latino (5x5) para os parâmetros de fluxo descontínuo e em um delineamento em quadrado latino (5x5) com medidas repetidas no tempo para os parâmetros de fluxo contínuo (análises sanguíneas), sendo os tratamentos os níveis de inclusão das enzimas nas dietas e as medidas repetidas no tempo, os tempos de coleta (0, 3, 6, 9 e 12h) com cinco repetições, segundo os seguintes modelos estatísticos:

$$Y_{ijl} = \mu + D_j + A_j + Pl + e_{ijl}$$

Onde:

$Y_{ijl}$  = valor referente a observação da repetição  $i$  no tratamento, na linha  $j$  e na coluna  $l$

$\mu$  = média geral

$D_i$  = efeito dos tratamentos (dietas)  $i$  ( $i = 0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0\%$ )

$A_j$  = efeito das linhas (animais)  $j$  ( $j = 1; 2; 3; 4; 5$ )

$Pl$  = efeito das colunas (períodos)  $l$  ( $l = 1; 2; 3; 4; 5$ )

$e_{ijk}$  = erro aleatório associado a observação.

$$Y_{ijkl} = \mu + D_j + A_j + Pl + Tk + FTjk + e_{ijkl}$$

Onde:

$Y_{ijkl}$  = valor referente a observação da repetição  $i$  no tratamento, na linha  $j$ , na coluna  $l$  e no tempo de coleta  $k$

$\mu$  = média geral

$D_i$  = efeito dos tratamentos (dietas)  $i$  ( $i = 0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0\%$ )

$A_j$  = efeito das linhas (animais)  $j$  ( $j = 1; 2; 3; 4; 5$ )

$Pl$  = efeito das colunas (períodos)  $l$  ( $l = 1; 2; 3; 4; 5$ )

$T_k$  = efeito do tempo de coleta  $k$  ( $k = 3; 6, 9$  e  $12h$ )

$DT_{jk}$  = interação dos efeitos do tratamento  $j$  com o tempo de coleta  $k$

$e_{ijkl}$  = erro aleatório associado a observação.

Os dados foram submetidos aos testes de Shapiro e Wilk (1965) e Bartlett (1937) para testar os pressupostos de normalidade e homocedasticidade, respectivamente. Após aceitas as pressuposições citadas acima, os resultados foram submetidos a análise de regressão para associar os níveis de enzimas na dieta aos resultados e os tempos de coleta aos resultados. Observou-se como nível de significância 0,05 de probabilidade de erro tipo I, para tomada de decisão quanto ao modelo que melhor explique os resultados.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve diferença ( $P < 0,05$ ) para o CMS, CMO, CPB, CFDN, CFDA, CHEM, CCEl e CNDT em grama animal dia  $g.\text{animal}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  (Tabela 5). Pode-se observar que os animais do grupo controle apresentaram menores consumos provavelmente a inclusão do MIX de enzima alterou de alguma forma a palatabilidade da dieta causando um maior consumo, contudo não se pode afirmar essa hipótese. O CMS  $g.\text{animal}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ , mostrou um comportamento linear crescente e aumento de 0,045g para cada 0,5% de inclusão da mistura de enzimas. Segundo o NRC (2007), o consumo de MS de cordeiros em terminação deve estar próximo  $1000 g.\text{animal}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ , no presente trabalho o CMS médio foi de  $1066 g.\text{animal}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ , estando dentro da faixa recomendada para animais dessa categoria.

Não houve diferença significativa para o consumo dos nutrientes em função do peso vivo ( $\%PV^{-1}$ ) e do peso metabólico ( $PV^{-0,75}$ ). Isso pode ser resposta da homogeneidade dos animais e das dietas diferindo apenas na quantidade de enzimas adicionada.

**Tabela 5** - Consumo de nutrientes em grama animal dia ( $\text{g.animal}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ ), em função do peso vivo ( $\%PV^{-1}$ ) e em função do peso metabólico ( $PV^{-0,75}$ ), de borregos alimentadas com diferentes níveis de enzima exógena na dieta.

Variáveis	Tratamentos						Valor de P				CV (%)
	0,0%	0,5%	1,0%	1,5%	2,0%	L	Q	DL			
CMS ( $\text{g.animal}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ )	0,998	0,993	0,996	1202,2	1140,4	0,025 <sup>1</sup>	0,695	0,195	12,79		
CMS ( $\%PV^{-1}$ )	3,24	2,94	3,08	3,48	3,34	0,297	0,482	0,367	14,88		
CMS ( $\text{g.kg.PV}^{-0,75}$ )	76,25	70,83	73,39	84,28	80,65	0,171	0,522	0,322	14,01		
CMO ( $\text{g.animal}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ )	841,48	830,19	883,37	1029,42	969,63	0,028 <sup>2</sup>	0,698	0,198	14,31		
CMO ( $\%PV^{-1}$ )	2,73	2,46	2,59	2,94	2,84	0,287	0,457	0,413	16,11		
CMO ( $\text{g.kg.PV}^{-0,75}$ )	64,33	59,32	61,83	71,41	68,63	0,169	0,505	0,359	15,36		
CPB ( $\text{g.animal}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ )	239,7	236,31	237,99	289,49	273,01	0,021 <sup>3</sup>	0,665	0,148	12,46		
CPBP ( $\%PV^{-1}$ )	0,78	0,75	0,74	0,83	0,82	0,279	0,408	0,331	13,67		
CPB ( $\text{g.kg.PV}^{-0,75}$ )	18,27	16,88	17,53	20,08	19,28	0,151	0,456	0,279	13,02		
CEE ( $\text{g.animal}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ )	24,6	19,31	20,19	30,64	29,34	0,054	0,154	0,159	27,77		
CEE ( $\%PV^{-1}$ )	0,08	0,06	0,06	0,09	0,09	0,241	0,139	0,332	29,02		
CEE ( $\text{g.kg.PV}^{-0,75}$ )	1,89	1,34	1,52	2,11	2,08	0,169	0,141	0,281	28,53		
CFDN ( $\text{g.animal}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ )	130,52	131,77	139,87	159,39	158,67	0,015 <sup>4</sup>	0,833	0,624	14,44		
CFDN ( $\%PV^{-1}$ )	0,43	0,39	0,43	0,46	0,46	0,124	0,547	0,495	14,48		
CFDN ( $\text{g.kg.PV}^{-0,75}$ )	10,2	9,31	10,28	11,05	11,21	0,067	0,551	0,543	14,06		
CFDA ( $\text{g.animal}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ )	51,86	52,95	56,16	61,65	63,55	0,019 <sup>5</sup>	0,784	0,874	14,55		
CFDA ( $\%PV^{-1}$ )	0,17	0,15	0,17	0,18	0,19	0,112	0,405	0,486	13,54		

CFDA (g.kg.PV <sup>-0,75</sup> )	3,96	3,71	4,12	4,27	4,47	0,062	0,485	0,614	13,35
CHEM (g.animal <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	78,66	78,82	83,7	97,74	95,12	0,017 <sup>6</sup>	0,875	0,465	15,33
CHEM (%PV <sup>-1</sup> )	0,26	0,23	0,26	0,28	0,28	0,151	0,538	0,491	15,89
CHEM (g.kg.PV <sup>-0,75</sup> )	6,03	5,61	6,16	6,77	6,73	0,084	0,612	0,502	15,39
CCel (g.animal <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	46,75	47,66	51,05	55,3	57,71	0,021 <sup>7</sup>	0,775	0,927	15,29
CCel (%PV <sup>-1</sup> )	0,15	0,14	0,16	0,16	0,17	0,113	0,405	0,467	14,09
CCel (g.kg.PV <sup>-0,75</sup> )	3,57	3,33	3,74	3,83	4,06	0,066	0,485	0,603	13,96
CCHT (g.animal <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	538,14	517,46	506,65	455,47	485,12	0,240	0,715	0,783	19,19
CCHT (%PV <sup>-1</sup> )	1,09	1,02	1,01	0,97	0,96	0,136	0,574	0,757	17,35
CCHT (g.kg.PV <sup>-0,75</sup> )	28,89	27,25	26,74	23,97	25,54	0,157	0,607	0,762	17,69
CCNF (g.animal <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	514,5	475,1	462,2	432,1	452,7	0,212	0,505	0,929	19,11
CCNF (%PV <sup>-1</sup> )	1,7	1,42	1,48	1,24	1,37	0,145	0,431	0,677	26,19
CCNF (g.kg.PV <sup>-0,75</sup> )	39,84	34,22	34,97	30,22	32,89	0,157	0,445	0,735	24,36
CNDT (g.animal <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	837,16	831,21	831,23	1017,69	952,43	0,028 <sup>8</sup>	0,737	0,156	13,19
CNDT (%PV <sup>-1</sup> )	2,71	2,46	2,57	2,95	2,79	0,321	0,471	0,378	14,94
CNDT (g.kg.PV <sup>-0,75</sup> )	39,38	44,24	45,11	43,89	42,84	0,485	0,224	0,902	14,94

Consumo de matéria seca – CMS; Consumo de matéria orgânica – CMO; Consumo de proteína bruta – CPB; Consumo de extrato etéreo – CEE; Consumo de fibra em detergente neutro – CFDN; Consumo de carboidrato total – CCHT; Consumo de carboidrato não fibroso – CCNF; Consumo de hemicelulose – CHEM; Consumo de celulose – CCEl; Consumo de nutrientes digestíveis totais – CNDT, em grama animal dia (g.animal<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>); porcentagem do peso vivo – (%PV<sup>-1</sup>) e grama por quilograma de peso metabólico – (g.PV<sup>-0,75</sup>); Probabilidade do efeito do tratamento; Efeito: L: Linear e Q: Quadrático. Desvio da linearidade (DL); Coeficiente de variação (CV). <sup>1</sup>Y = 0,810718+0,091105X (R<sup>2</sup>=61,61%); <sup>2</sup>Y = 0,231346+0,023959X (R<sup>2</sup>=60,14%); <sup>3</sup>Y = 0,020661+0,004159X (R<sup>2</sup>=40,75%); <sup>4</sup>Y = 0,127267+0,016783X (R<sup>2</sup>=87,98%); <sup>5</sup>Y = 0,050823+0,006415X (R<sup>2</sup>=95,48%); <sup>6</sup>Y = 0,076444+0,010367X (R<sup>2</sup>=81,82%); <sup>7</sup>Y = 0,045786+0,005913X (R<sup>2</sup>=96,72%); <sup>8</sup>Y = 0,810398+0,0083489X (R<sup>2</sup>=58,35%).



As ingestões de matéria seca e de nutrientes digestíveis totais elevaram-se linearmente ( $P < 0,05$ ), com o aumento da porcentagem de enzima na dieta. Esse aumento pode ter sido decorrente da melhoria nos padrões fermentativos no ambiente ruminal (Van Soest, 1982), o que possibilitaria um melhor desempenho das atividades enzimáticas com a adição do MIX de enzimas. Outras hipóteses seriam: um efeito associativo positivo entre os ingredientes com a inclusão do MIX, no entanto, não se pode afirmar essa hipótese.

Pode-se observar que não diferença significativa ( $P < 0,05$ ) para a DMS, a média encontrada para essa variável foi de 80,65% (Tabela 6). O não efeito para o DMS no presente trabalho pode ser associado a quantidade de enzima fornecida pois uma sub-dosagem pode não ter efeito significativo sobre a degradação de um nutriente no ambiente ruminal e uma super-dosagem pode exceder o limite máximo de enzima podendo ocasionar competição por sítios de adesão e degradação enzimática com os microrganismos ruminais diminuindo, dessa forma, a eficiência ruminal afetando a digestão total no trato gastrointestinal (ROJO et al., 2007).

**Tabela 6** - Digestibilidade aparente dos nutrientes por borregos alimentadas com diferentes níveis de enzima amilolítica exógena na dieta.

Variáveis	Tratamentos					Valor de P			CV
	0,0%	0,5%	1,0%	1,5%	2,0%	L	Q	DL	
DMS (%)	81,30	80,07	78,90	81,64	81,36	0,673	0,230	0,448	3,41
DMO	85,32	85,77	84,00	85,30	84,61	0,628	0,869	0,602	3,17
DPB	84,71	85,65	83,50	86,64	86,08	0,481	0,710	0,462	4,25
DEE	88,58	88,86	87,17	88,68	87,45	0,519	0,966	0,527	2,95
DFDN%	65,19	67,31	64,17	64,37	65,04	0,769	0,873	0,805	11,69
DFDA%	64,11	65,92	62,78	64,90	63,47	0,839	0,927	0,805	12,13
DHem%	65,90	68,21	65,07	64,04	66,05	0,728	0,908	0,722	11,62
DCel%	62,15	63,92	60,74	62,88	61,40	0,834	0,935	0,826	13,44
DCHT	87,02	87,25	88,73	88,62	88,76	0,203	0,687	0,856	2,89
DCNF%	93,25	92,81	93,49	93,71	93,58	0,507	0,956	0,785	1,74
DNDT%	86,85	87,22	85,52	86,80	86,11	0,576	0,830	0,540	2,70

Digestibilidade da matéria seca – DMS; Digestibilidade da matéria orgânica – DMO; Digestibilidade da proteína bruta – DPB; Digestibilidade do extrato etéreo – DEE; Digestibilidade da fibra em detergente neutro – DFDN; Digestibilidade de carboidrato total – DCHT; Digestibilidade de carboidrato não fibroso – DCNF; Digestibilidade de hemicelulose – DHem; Digestibilidade de celulose – DCel; Digestibilidade de nutrientes digestíveis totais – DNDT; Probabilidade do efeito do tratamento – P; Efeito: L: Linear e Q: Quadrático. Desvio da linearidade (DL); Coeficiente de variação (CV).

O balanço de nitrogênio é apresentado na Tabela 7. Observou-se que não houve influência ( $P>0,05$ ) dos tratamentos sobre as variáveis nitrogênio excretado na urina (NU), balanço de nitrogênio (BN), nitrogênio de excreção total (NET) e nitrogênio endógeno basal (NEB). O consumo de nitrogênio (CN) e o nitrogênio absorvido (NB) sofreram influência ( $P<0,05$ ) com a inclusão da enzima. Este fato pode estar relacionado ao maior consumo de PB, dos animais recebendo maiores doses do MIX de enzimas, visto que, o NC está diretamente relacionado ao consumo de MS que também foi influenciado pelos tratamentos.

**Tabela 7** - Balanço de N em borregos alimentadas com diferentes níveis de enzima amilolítica exógena na dieta.

Variáveis	Tratamentos					Valor de P			CV
	0,0%	0,5%	1,0%	1,5%	2,0%	L	Q	DL	
NC (g.animal <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	38,35	37,81	38,07	46,31	43,68	0,021 <sup>1</sup>	0,665	0,148	12,46
NF (g.animal <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	7,46	7,65	8,13	7,71	7,48	0,964	0,487	0,918	18,99
NU (g.animal <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	16,13	15,23	12,99	15,91	17,75	0,647	0,301	0,846	37,70
NA (g.animal <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	30,89	30,15	29,94	38,60	36,19	0,016 <sup>2</sup>	0,504	0,108	14,48
BN (g.animal <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	14,75	14,91	16,95	22,68	18,44	0,120	0,642	0,375	36,53
NET (g.animal <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	23,59	22,89	21,12	23,62	25,23	0,606	0,340	0,872	22,97
NEB (g.animal <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	4,87	5,22	5,00	5,30	5,24	0,085	0,552	0,243	5,94

Nitrogênio consumido – NC; Nitrogênio excretado nas fezes – NF; Nitrogênio excretado na urina – NU; Nitrogênio excretado no leite – NL; Balanço de nitrogênio – BN; Nitrogênio de excreção total – NET; Nitrogênio endógeno basal – NEB; Probabilidade do efeito do tratamento – P; Efeito: L: Linear e Q: Quadrático.

As médias do balanço de energia se encontram na Tabela 8. Não houve diferença ( $P>0,05$ ), para as variáveis, consumos de energia bruta (CEB), consumos de energia digestível (CED) consumos de energia metabolizável (CEM) e balanço energético (BENERG). A não significância pode estar relacionada a qualidade e semelhança das dietas experimentais.

**Tabela 8** - Balanço de energia em borregos alimentadas com diferentes níveis de enzima amilolítica exógena na dieta.

Variáveis	Tratamentos					Valor de P			CV
	0,0%	0,5%	1,0%	1,5%	2,0%	L	Q	DL	
CEB	3670,39	3545,82	3445,08	3147,11	3354,90	0,192	0,606	0,733	15,36
DEB%	81,75	81,26	81,77	82,61	80,93	0,952	0,728	0,765	4,22
CED	2992,64	2914,20	2831,24	2609,38	2770,65	0,273	0,666	0,783	16,31
EM	2672,23	2592,36	2542,64	2298,92	2454,66	0,287	0,726	0,767	18,40
EBU	314,67	316,13	282,85	304,67	310,29	0,765	0,433	0,640	15,28
BENERG	2000,22	1966,45	1934,54	1766,98	1876,10	0,457	0,831	0,842	21,59

Consumos de energia bruta – CEB; Digestibilidade aparente da energia bruta – DEB%; Consumos de energia digestível – CEDg; Consumos de energia metabolizável – CEMg; Energia da urina – EBU; Balanço energético – BENERG. Probabilidade do efeito do tratamento – P; Efeito: L: Linear e Q: Quadrático.

Na Tabela 9 são apresentados os dados de consumo de água ( $CA.\text{animal}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ ), consumo de água em função do consumo de matéria seca ( $CA.CMS$ ), consumo de água em função do peso vivo ( $CA.\%PV^{-1}$ ), consumo de água em função do peso metabólico ( $CA.PV^{-0,75}$ ), volume e densidade da urina de borregos alimentados com diferentes níveis de uma mistura de enzimas exógenas na dieta. Houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) para o  $CA.\text{animal}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  havendo comportamento linear crescente de 183 mL de água para cada 0,5% de mistura de enzima adicionada na dieta.

Houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) para o peso das fezes na matéria natural apresentando comportamento linear crescente com inclusão da mistura de enzimas. Para cada 0,5% de inclusão o peso das fezes aumentou em 0,06 g. Esse resultado pode estar relacionado CMS que também foi linear, ou seja, os animais recebendo maiores quantidades de enzimas consumiram maior quantidade de alimentos e excretaram maior quantidade de fezes. Não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) para o escore fecal com a inclusão do MIX de enzimas.

O maior  $CA.\text{animal}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  foi registrado para o tratamento com 2% e o menor para o tratamento controle pode estar relacionado ao CMS que também mostrou comportamento linear crescente (Tabela 5). De acordo com o NRC (2007), o consumo voluntário de água em ovinos é de duas a três vezes a ingestão de matéria seca, ou seja, o CMS maior influenciou o maior CA. O CA médio foi de  $3,814 L.\text{animal}^{-1}.\text{dia}^{-1}$

**Tabela 9** - Consumo de água (animal<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>), consumo de água em função do consumo de matéria seca ingerida (L.kg.MS), consumo de água em função do peso vivo (%PV<sup>-1</sup>), consumo de água em função do peso metabólico (PV<sup>-0,75</sup>), volume e densidade da urina, de borregos alimentados com diferentes uma mistura de enzimas exógenas na dieta.

Variáveis	Tratamentos						Valor de P			CV (%)
	0,0%	0,5%	1,0%	1,5%	2,0%	L	Q	DL		
CA (L.dia)	3,64	3,38	3,62	4,31	4,10	0,053	0,595	0,264	15,85	
CA.CMS (L.kgMS)	3,61	3,47	3,75	3,60	3,61	0,910	0,924	0,857	20,52	
CA.%PV <sup>-1</sup>	11,71	9,88	11,61	12,46	12,08	0,374	0,645	0,402	21,95	
CA (mL.PV <sup>-0,75</sup> )	276,24	238,74	274,06	301,75	291,07	0,262	0,630	0,388	20,14	
Volume da Urina (L)	1,22	1,06	1,09	1,05	1,27	0,786	0,098	0,751	20,18	
Densidade da Urina (kg.L)	1,02	1,02	1,02	1,02	1,02	0,585	0,689	0,629	0,44	
Peso das fezes (g)	0,67	0,76	0,77	0,97	0,88	0,021 <sup>1</sup>	0,590	0,378	21,21	
Escore fecal	3,12	3,60	3,20	3,85	3,44	0,365	0,526	0,302	19,47	

$$^1Y = 0,967668 + 0,098532X \quad (R^2 = 62,48\%)$$

Efeito Linear (L); Efeito Quadrático (Q); Desvio da linearidade (DL); Coeficiente de variação (CV).

estando abaixo do normal segundo Nunes, (1998) para animais de clima quente, que é de 5 a 6 L.animal.<sup>-1</sup>dia<sup>-1</sup>.

Não houve diferença significativa ( $P>0,05$ ) para os o CA.CMS; CA.%PV<sup>-1</sup> e CA.PV<sup>-0,75</sup>, volume e densidade da urina. A densidade específica da urina está diretamente relacionada com a capacidade dos rins do animal em concentrá-la. A média para densidade da urina no presente trabalho foi de 1,024 kg.L estando dentro do recomendado para pequenos ruminantes que varia de 1,015 a 1,045 (CARVALHO, 2008).

Na Tabela 10 são apresentados os valores relativos ao comportamento ingestivo e a eficiência alimentar de borregos recebendo diferentes inclusões de uma mistura de enzimas exógenas na dieta. Não houve diferença significativa ( $P>0,05$ ) para ingestão, ruminação e mastigação, sendo observadas médias em porcentagem de 24 h de 13,33; 25,05 e 238,39% respectivamente. A ausência de diferença estatística sobre as variáveis comportamentais com a adição da mistura de enzimas pode estar relacionada a semelhança das dietas experimentais. Entretanto, eram esperadas diferenças para o comportamento, visto que houve diferença no CMS animal<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>.

Os tempos despendidos em ingestão e ruminação estão diretamente relacionados a qualidade da dieta, nesse contexto animais consumindo alimentos com elevado teor de nutrientes digestíveis totais deverão passar menos tempo exercendo tais atividades. Conseqüentemente a qualidade da dieta influenciará os tempos de mastigação, já que esta é resultante da soma de ingestão e ruminação. Oliveira, (2012) avaliando o efeito de enzima amilolítica exógenas na dieta em bovinos de corte não observou diferença na ingestão de alimento, semelhante ao observado no presente trabalho.

Não houve diferença significativa ( $P>0,05$ ) para a variável ócio. Pode-se observar que o tempo despendido em ócio foi em média 887,1 minutos, correspondendo a 61,06% de 24h. Considerando-se que as dietas possuíam 80% de concentrado, era esperado que os animais passassem mais tempo em ócio, o que ocorreu no presente trabalho, contudo, essa porcentagem está abaixo do encontrado por outros autores que avaliaram o comportamento de ovinos recebendo altas quantidades de concentrado na dieta e verificaram 79%, e 77% de ócio/dia, respectivamente para os seguintes autores Mendes et al., (2010) e Cirne et al., (2014).

**Tabela 10** - Comportamento ingestivo e eficiência alimentar de borregos alimentados com níveis crescentes de uma mistura de enzimas exógenas na dieta

Variáveis	Tratamentos						Valor de P			CV (%)
	0,0%	0,5%	1,0%	1,5%	2,0%	L	Q	DL		
Ingestão (hora)	2,77	3,33	3,60	3,43	3,17	0,138	0,239	0,651	10,41	
Ruminação (hora)	5,77	6,13	6,00	6,81	5,52	0,075	0,136	0,986	25,32	
Mastigação (hora)	8,20	9,47	9,60	10,25	8,68	0,411	0,558	0,324	16,79	
Ócio (hora)	15,47	14,53	14,40	13,75	15,32	0,138	0,239	0,650	16,69	
CMS.Ing (g.h <sup>-1</sup> )	562,00	327,00	289,00	333,00	355,00	0,183	0,106	0,757	54,47	
CMS.Rum (g.h <sup>-1</sup> )	177,00	186,00	155,00	200,00	188,00	0,413	0,497	0,115	16,50	
CMS.Mast (g.h <sup>-1</sup> )	129,00	115,00	100,00	125,00	122,00	0,894	0,115	0,334	18,44	
Ing.FDN (hora)	50,08	41,01	37,69	46,70	52,36	0,490	0,028	0,684	21,88	
Rum.FDN (hora)	23,28	22,06	22,57	24,26	30,33	0,097	0,167	0,947	26,17	
Mast.FDN (hora)	16,95	15,47	16,00	16,52	17,04	0,393	0,086	0,971	26,02	
Ing.FDA (hora)	20,05	16,33	15,11	18,04	21,00	0,526	0,020	0,838	21,56	
Rum.FDA (hora)	9,31	8,79	9,03	9,33	12,17	0,112	0,143	0,845	26,55	
Mast.FDA (hora)	6,79	5,69	5,64	6,12	7,53	0,447	0,079	0,988	27,09	

Consumo de matéria seca em função da ingestão (CMS.Ing); consumo de matéria seca em função da ruminação (CMS.Rum); Consumo de matéria seca em função da mastigação (CMS.Mast); Efeito Linear (L); Efeito Quadrático (Q); Desvio da linearidade (DL); Coeficiente de variação (CV)

Não houve diferença ( $P>0,05$ ) para a eficiência alimentar de ingestão, ruminação e mastigação de borregos alimentados com níveis crescentes de uma mistura de enzimas exógenas na dieta (Tabela 10). Cirne et al. (2014) trabalhando com cordeiros alimentados com dietas exclusivas de concentrado encontraram média para eficiência de ingestão de matéria seca de  $0,415 \text{ g.h}^{-1}$  valor superior à média encontrada no presente trabalho de  $0,373 \text{ g.h}^{-1}$ , ressalta-se que nesse experimento 80% da dieta era composto por concentrado.

Na Tabela 11 é apresentado o perfil de distribuição de partículas das sobras, PB e FDN (%) em função dos tratamentos com inclusão de uma mistura de enzimas exógenas na dieta. Pode-se observar que houve maior porcentagem de partículas na peneira de 1,18 mm, e no fundo (partículas menores que 1,18 mm), podendo estar relacionado a composição da ração, animais ruminantes tendem a selecionar a dieta de acordo com suas exigências nutricionais e fisiológicas (VAN SOEST, 1994).

O padrão de seleção dos animais foi favorável e adequado em comparação a RTM fornecida, mostrando que os animais consumiram a ração e o perfil de distribuição das sobras foi semelhante ao perfil de distribuição das RTM's (Tabela 4).

**Tabela 11** - Perfil de distribuição das partículas das sobras de alimento de borregos em função dos tratamentos com inclusão de uma mistura de enzimas exógenas na dieta.

Variáveis	Tratamentos					Valor de P			CV
	0,0%	0,5%	1,0%	1,5%	2,0%	L	Q	DL	
> 19mm (%)	4,30	3,58	1,50	3,30	2,55	0,360	0,431	0,534	92,18
19<8mm (%)	17,91	13,47	14,36	19,21	13,59	0,754	0,882	0,226	40,55
18<1,18mm (%)	38,26	38,97	39,33	37,48	35,06	0,223	0,266	0,976	11,48
<1,18mm (%)	39,51	43,98	44,80	40,00	48,78	0,220	0,826	0,279	18,32
PBSobras	21,33	22,09	31,87	22,2	21,76	0,372	0,158	0,59	3,39
FDNSobras	19,2	20,69	16,92	20,01	17,82	0,572	0,945	0,334	22,09

Efeito Linear (L); Efeito Quadrático (Q); Desvio da linearidade (DL); Coeficiente de variação (CV); Milímetros (mm).

As rações eram compostas por 80% de concentrado que possuíam mais de 50% de partículas menores que 1,18 mm, isso pode explicar a maior concentração de partículas abaixo desse tamanho nas sobras. Partículas menores que 1,18 mm podem passar diretamente pelo retículo-rúmen (POPPI et al., 1980), sem que seja necessária

ação de nem um dos mecanismos de redução de partícula que são a mastigação durante o processo de preensão dos alimentos; a mastigação posterior, durante a ruminação; a digestão microbiana; e a ruptura devido à fricção provocada pelas paredes do rúmen, sendo os dois primeiros os principais responsáveis pela diminuição do tamanho de partícula (FAICHNEY, 1986).

Pode-se observar que não houve diferença ( $P>0,05$ ) para creatinina, Ureia, ácido úrico, proteínas totais, albumina, triglicerídeos, colesterol (Tabela 12). A gama-glutamyltransferase (GGT) em todos os tratamentos os valores estiveram acima do recomendado por Kaneko et al. (2008) para a espécie ovina, situada na faixa de 20 – 52 UI/L.

A média encontrada para a GGT no presente trabalho foi de 104,94 UI/L a não diferença significativa pode ser explicada pelo fornecimento de dieta única além do manejo e ambiente semelhante os quais os borregos foram submetidos durante todo o período experimental. Mendonça et al., (2008) relataram que o aumento da atividade sérica de GGT, podendo estar associada a problemas hepáticos, e González e Silva, (2006) apontam que a GGT no plasma é de origem hepática, sendo indicativo de colestase e proliferação de ductos biliares. O consumo de alimentos contendo alguma toxina (OSWEILER, 1998), lipdose hepática em vacas (PEEK et al., 2001), e animais infectados com *fasciola hepática* (MULLER, 2001), podem levar a quadros de elevação dos níveis plasmáticos de GGT. Todavia não se pode inferir que os animais do presente experimento tiveram algum problema hepático, já que os valores de GGT foram maiores do que o recomendado em todos os tratamentos, inclusive o controle.

Não houve diferença ( $P>0,05$ ) para a FA, e o valor médio encontrado no presente trabalho foi de 550,37 UI/L estando acima do recomendado por Kaneko et al. (2008) entre (68 – 387 UI/L). Os maiores valores de FA podem estar relacionados a idade dos borregos, a FA em animais jovens pode ser 2 a 3 vezes superior a concentrações séricas encontradas em animais adultos (GONZÁLEZ e SILVA, 2006).

É importante ressaltar que os valores de referência para todos os metabólitos sanguíneos supracitados não podem ser considerados como normais para todas as categorias, visto que esses dados foram obtidos através de avaliações pontuais de animais mantidos em ambientes controlados (MENDONÇA et al, 2008).



**Tabela 12** – Bioquímica sanguínea de borregos alimentados com níveis crescentes de uma mistura de enzimas exógenas na dieta.

Variáveis	Tratamentos						Valor de P			CV (%)
	0,0%	0,5%	1,0%	1,5%	2,0%	L	Q	DL		
Creatinina (mg/dL)	0,66	0,67	0,67	0,65	0,66	0,844	0,901	0,983	16,92	
Ureia (mg/dL)	57,93	74,66	50,93	60,73	57,46	0,438	0,773	0,044	21,73	
Ácido Úrico (mg/dL)	0,05	0,06	0,06	0,08	0,07	0,253	0,901	0,826	57,78	
Proteínas Totais (g/L)	7,49	8,10	7,76	8,68	7,88	0,271	0,293	0,247	10,50	
Albumina (g/L)	3,87	3,57	3,61	3,93	3,84	0,461	0,165	0,169	7,29	
Triglicerídeos (mg/dL)	15,46	16,80	15,53	17,53	13,93	0,651	0,290	0,478	22,48	
Colesterol (mg/dL)	32,86	27,20	31,60	33,53	30,93	0,853	0,816	0,527	29,46	
FA (UI/L) <sup>1</sup>	569,60	540,80	494,86	570,46	576,13	0,755	0,251	0,610	17,16	
AST (UI/L)	186,20	137,53	127,26	116,73	122,33	0,022 <sup>1</sup>	0,132	0,867	29,04	
GGT (UI/L)	131,86	100,40	92,66	98,13	101,66	0,147	0,108	0,820	27,27	

<sup>1</sup>Y = 167,720000-29,707200X (R<sup>2</sup>=70,34%).

Aspartatoaminotransferase (AST); Gama-glutamilttransferase (GGT); Fosfatase Alcalina (FA); Efeito Linear (L); Efeito Quadrático (Q); Desvio da linearidade (DL); Coeficiente de variação (CV).

Na Tabela 13 são apresentados os dados referentes ao perfil glicêmico de borregos alimentados com diferentes inclusões de um MIX de enzimas exógenas na dieta. Não houve diferença significativa para glicose plasmática sendo encontrado valor médio de 54,79 mg/dL estando dentro do recomendado por Kaneko et al. (2008), 50 – 80 mg/dL.

Não se encontra na literatura trabalhos utilizando mistura de produtos enzimáticos comerciais na nutrição de ovinos. Pouco se sabe sobre os mecanismos de ação de uma única enzima adicionada em dietas para ruminantes. Estudar a ação de diversas enzimas em conjunto tornasse um desafio gigantesco, levando-se em consideração o universo ruminorreticular e suas interações já existentes. Todavia é de extremamente importante para quem trabalha com dietas ricas em alimentos variados, situação essa encontrada na maioria das propriedades no Brasil sob uma diversificação de alimentos, forragens e subprodutos, nesse contexto faz-se necessário novas pesquisas que busquem compreender e elucidar o funcionamento das enzimas na nutrição de ruminantes.

**Tabela 13** – Glicemia de borregos (mg/dL) alimentados com níveis crescentes de um MIX de enzimas na dieta.

Tratamentos	Tempo (h)					Valor de P			CV (%)
	0	3	6	9	12	L	Q	DL	
0,0%	58,00	58,20	56,00	58,40	60,20	0,748	0,645	0,941	
0,5%	55,00	54,00	51,80	54,40	51,20	0,615	0,981	0,862	
1,0%	54,75	49,50	56,25	56,25	49,00	0,767	0,570	0,444	
1,5%	55,20	56,20	51,80	54,20	55,40	0,911	0,671	0,830	18,35
2,0%	51,60	58,80	56,00	56,20	51,40	0,834	0,218	0,806	
L	0,145	0,688	0,998	0,588	0,122				
Q	0,960	0,019	0,433	0,421	0,072				
DL	0,717	0,446	0,302	0,713	0,098				

Efeito Linear (L); Efeito Quadrático (Q); Desvio da linearidade (DL); Coeficiente de variação (CV).

#### 4. CONCLUSÃO

As inclusões de um MIX de enzimas exógenas nos níveis testados no presente trabalho não influenciaram a digestibilidade da matéria seca, o comportamento ingestivo e a eficiência alimentar dos borregos.

A inclusão do MIX de enzimas causou um aumento no consumo dos nutrientes, no consumo de água e interferiu nas concentrações séricas de aspartatoaminotransferase.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFRC - Agricultural and Food Research Council. Energy and protein requirements of ruminants. Wallingford: CAB International, 175p.1993.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis** (red.). Washington DC: AOAC, 1015p. 1980.

ARAÚJO FILHO, J.T.; COSTA, R.G.; FRAGA, A.B.; SOUSA, W.H.; CEZAR, M.F.; BATISTA, A.S.M. Desempenho e composição de cordeiros deslançados terminados em confinamento com diferentes dietas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p.363-371, 2010.

BARTLETT, M. S. Properties of sufficiency and statistical tests. **Proceedings of the Royal Society**, v. 160, *Series A*, p. 268-282, 1937.

BERNARDES, T. F.; RÊGO, A. C. Study on the practices of silage production and utilization on Brazilian dairy farms. **Journal of Dairy Science**, v.97, n.3, p.1852 - 1861, 2014.

BLAXTER, K. L., CLAPPERTON, J. L. Prediction of the amount of methane produced by ruminants. **British Journal of Nutrition**, v.19, n.1-2, p.511-522, 1965.

CARVALHO, M. B. Semiologia do Sistema Urinário. In: FEITOSA, F.L. **Semiologia Veterinária: a arte do diagnóstico**. São Paulo: Roca. Cap. 9, p.389- 409, 2008.

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

CIRNE, L. G. A.; OLIVEIRA, G. J. C.; JAEGER, S. M. P. L.; et al. Comportamento ingestivo de cordeiros em confinamento, alimentados com dieta exclusiva de concentrado com diferentes porcentagens de proteína. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 1, p. 229–234, 2014.

EL-KADY, R.I., I.M. AWADALLA, M.I. Mohamed, M. Fadel and H.A. El-Rahman, Effect of exogenous enzymes on the growth performance and digestibility of growing buffalo calves. **Int. J. Agric. Biol.**, 8: 354-359. 2006.

EUN, J.-S.; BEAUCHEMIN, K. A. Effects of a proteolytic feed enzyme on intake, digestion, ruminal fermentation, and milk production. **Journal of dairy science**, v. 88, n. 6, p. 2140–53, 2005.

FAICHNEY, G.J. The kinetics of particulate matter in the rumen. In: MILLIGAN, L.P.; GROVUM, W.L; DOBSON, A. (Eds.) Control of digestion and metabolism in ruminants. INTERNACIONAL SYMPOSIUM ON RUMINANT PHYSIOLOGY, 6., 1984, Canada. **Proceedings...** Englewood Cliffs: Prentice-Hall, p.173-195. 1986.

FISCHER, V.; DESWYSEN, A.G.; AMOUCHE, E.H. DUTTILLEUL, P.; LOBATO, J.F.P. Efeitos da pressão de pastejo sobre o padrão neotemeral do comportamento ingestivo de ovinos em pastagem. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.27, p.164-170, 1998.

GENCOGLU, H.; SHAVER, R. D.; STEINBERG, W.; et al. Effect of feeding a reduced-starch diet with or without amylase addition on lactation performance in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 2, p. 723–732, 2010.

GOMES, S.P. **Tamanho de partícula do volumoso e frequência de alimentação sobre aspectos nutricionais e do metabolismo energético em ovinos**. 2008. 83p. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte, 2008.

GONZÁLEZ, F.H.D.; SILVA, S.C. **Introdução à bioquímica clínica veterinária**. 2.ed. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.

GONZÁLEZ, F.H.D. Uso de perfil metabólico para determinar o status nutricional em gado de corte. In: GONZÁLEZ, F.H.D.; BARCELLOS, J.O; OSPINA, H.; RIBEIRO, L.A.O. (Eds). **Perfil Metabólico em ruminantes: seu uso em nutrição e doenças nutricionais**. Porto Alegre, Brasil, Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000.

HALL, M.B. Calculation of non-structural carbohydrate content of feeds that contain non-protein nitrogen. **University of Florida**. p.A-25 (Bulletin 339). 2000.

HALL, M.B. Neutral detergent-soluble carbohydrates: nutritional relevance and analysis. Florida: **University of Florida**, (Bulletin 339). 1999.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. (ed.) Clinical biochemistry of domestic animals. 5.ed. San Diego: **Academic Press**, cap.12, p.303-325. 1997.

KANEKO J.J., HARVEY J.W. & BRUSS M.L. Clinical Biochemistry of Domestic Animals. 6th ed. **Academic Press**, San Diego. 916p. 2008.

KLINGERMAN, C. M.; HU, W.; MCDONELL, E. E.; DERBEDROSIAN, M. C. An evaluation of exogenous enzymes with amylolytic activity for dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 3, p. 1050–1059, 2009.

KONONOFF, P. J., A. J. HEINRICHS, and D. R. Buckmaster. Modification of the Penn State Forage and Total Mixed Ration Particle Separator and the Effects of Moisture Content on its Measurements. **J. Dairy Science**. 86: 1858- 1863. 2003.

MAYNARD, L.A; LOOSLI, J.K; HINTZ, H.F; WARNER, R.G. **Nutrição animal**. 3ed. Rio de Janeiro: Freitas Bastos S.A., 726p., 1984.

MENDES, C.Q.; TURINO, V.F.; SUSIN, I. et al. Comportamento ingestivo de cordeiros e digestibilidade dos nutrientes de dietas contendo alta proporção de concentrado e diferentes fontes de fibra em detergente neutro. **Rev. Bras. Zootec.**, v.39, p.594-600, 2010.

MENDONÇA, F. S.; CAMARGO, L. M.; FREITAS, S. H.; et al. Aspectos clínicos e patológicos de um surto de fotossensibilização hepatógena em ovinos pela ingestão de *Brachiaria decumbens*. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 4, p. 1034–1041, 2008.

MOHAMED, D. E.-D. A.; BORHAMI, B. E.; EL-SHAZLY, K. A. Effect of Dietary Supplementation With Fibrolytic Enzymes on the Productive Performance of Early Lactating Dairy Cows. **Journal of Agricultural Science**, v. 5, n. 6, p. 146–155, 2013.

MULLER, G. Fasciolose. In: RIET-CORREA, F. et al. (Ed.) **Doenças de Ruminantes e Equinos**. São Paulo: Varela, 2001. V.2, p.118-130. 2001.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. Nutrient requirements of small ruminants. Washington, D. C.: **National Academy Press.**, 362 p. 2007.

NOZIÈRE, P.; STEINBERG, W.; SILBERBERG, M. Amylase addition increases starch ruminal digestion in first-lactation cows fed high and low starch diets. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 4, p. 2319–2328, 2014.

NUNES, I. J. **Nutrição animal básica**. 2 ed. Belo Horizonte: UFMG, 388 p. 1998.

OSWEILER, G. D. **Toxicologia Veterinária**. Porto Alegre: ArtMed, p526. 1998.

OLIVEIRA, L. G. Desempenho de bovinos alimentados com dietas contendo enzimas amilolíticas exógenas. **Dissertação** (Ciência Animal). Universidade Federal de Goiás. 35p. 2012.

PEEK, S.F et al. Hypokalemia, Muscle Weakness and Recumbency in Dairy cattle (17 Cases 1991 – 1998). In: **Annual Convention American Association of bovine Practitioners**, p34, 2001.

POPPI, D.P.; NORTON, B.W.; MINSON, D.J. et al. The validity of the critical size theory for particles leaving the rumen. **Journal of Agriculture Science**, v.94, n.2, p.275-280, 1980.

REIS, R. A, LARA, E. C. RABELO, C. H. S. Enzimas na Nutrição de Ruminantes. Palestras. **Anais...** X Congresso Nordestino de Produção Animal, Teresina, PI: SNPA. p.22. 2015.

ROJO, R.; MENDOZA, G. D.; PLATA, F. X. Comparison of method of application on the effect of amylolytic enzymes on in vitro Ruminal Starch Digestion. **Journal of Applied Animal Research**, v. 32, n. 1, p. 81–84, 2007.

SHAPIRO and WILK. An Analysis of Variance Test for Normality. **Biometrika**, v. 52, n. 3/4, p. 591-609. 1965.

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

SILVA, J. F. C.; LEÃO, M. I. **Fundamentos de nutrição de ruminantes**. Piracicaba: Livroceres, 380 p. 1979.

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de Alimentos (métodos químicos e biológicos)** 2 ed. Viçosa: UFV. Imp. Univ. 165 p. 2002.

TAKIYA, C, S. Desempenho de bovinos alimentados com dietas contendo enzimas amilolíticas exógenas. 2016. 83 p. **Dissertação** (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de São Paulo, Pirassununga. 2016.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional Ecology of the Ruminant**. 2.ed. Ithaca: Cornell University, 476p. 1994.

VERA, J. M.; SMITH, A. H.; ZOBELL, D. R. Effects of an exogenous proteolytic enzyme on growth performance of beef steers and in vitro ruminal fermentation in continuous cultures<sup>1</sup>. **The Professional Animal Scientist**, v. 28, n. 4, p. 452–463, 2012.

YANG, H. E.; SON, Y. S.; BEAUCHEMIN, K. A. Effects of exogenous enzymes on ruminal fermentation and degradability of alfalfa hay and rice straw. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 24, n. 1, p. 56–64, 2011.

YOUNG, K. M.; LIM, J. M.; DER BEDROSIAN, M. C. et al. Effect of exogenous protease enzymes on the fermentation and nutritive value of corn silage. **Journal of Dairy Science**, v.95, n.11, p.6687-6694, 2012.

WEISS, W.P. Energy prediction equations for ruminant feeds. In: CORNELL NUTRITION CONFERENCE FOR FEED MANUFACTURERS, 61, 1999, **Proceedings...** Ithaca: Cornell University, p.176-185,1999.

ZEOULA, L.M.; FERELI, F.; PRADO, I.N.; GERON, L.J.V.; NETO, S.F.C.; PRADO, O.P.P.P.; MAEDA, E.M. Digestibilidade e balanço de nitrogênio de rações com diferentes teores de proteína degradável no rúmen e milho moído como fonte de amido em ovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.5, p.2179-2186, 2006.

## **6. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os resultados obtidos no presente trabalho mostram que apenas os produtos MIX de enzimas e AMAIZE™ foram capazes de causar efeito significativas no consumo e digestibilidade aparente respectivamente.

A utilização de enzimas fibrolíticas e complexos enzimáticos com baixos teores de amilases em dietas de alto grão não são eficientes em modificar a taxa de digestão e consumo dos nutrientes. Para que as enzimas tenham efeito positivo e exerçam seu papel de lise no ambiente ruminoreticular é necessário que se utilize produtos capazes de degradar substratos específicos da dieta a ser testada como amido ou celulose, dessa maneira, pode-se amplificar as taxas de degradação dos nutrientes melhorando a produtividade animal.