

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

DOUGLAS KLEITON BARBOSA

**SUPLEMENTAÇÃO DE VACAS LEITEIRAS DA RAÇA
HOLANDESA COM ENZIMAS FIBROLÍTICAS.**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO II

DOIS VIZINHOS
2017

DOUGLAS KLEITON BARBOSA

**SUPLEMENTAÇÃO DE VACAS LEITEIRAS DA RAÇA HOLANDESA
COM ENZIMAS FIBROLÍTICAS.**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, apresentado ao curso de Bacharelado em Zootecnia, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus Dois Vizinhos, como requisito parcial para obtenção do título de ZOOTECNISTA.

Orientador: Prof. Dr. Douglas Sampaio Henrique

Co - Orientadora: Prof. Dra. Anelise Perboni

DOIS VIZINHOS

2017



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



**TERMO DE APROVAÇÃO
TCC**

**SUPLEMENTAÇÃO DE VACAS LEITEIRAS DA RAÇA HOLANDESA
COM ENZIMAS FIBROLÍTICAS.**

Autor: Douglas Kleiton Barbosa

Orientador: Prof. Dr. Douglas Sampaio Henrique

Co - Orientadora Prof. Dra. Anelise Tessari Perboni

TITULAÇÃO: Zootecnista

APROVADO em de junho de 2017.

Emilyn Midori Maeda

Paulo Cella

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

DEDICATÓRIA

Dedico esta obra a todos que comigo conviveram por todos esses anos, aos que passaram pela minha vida mesmo por pouco tempo e deixaram, mesmo que hoje esquecido, um momento de felicidade, de amor, carinho, solidariedade e paz, que fizeram de mim quem eu sou hoje. À minha família, dedico muito mais, dedico minha vida, o ar que respiro e cada dia que vivo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus e ao menino Jesus pelos momentos de paz e reflexão, pela benção sempre concedida e pela vida que me foi dada. Agradeço aos meus pais Valdecir e Noemi, minha avó Hilda, meus irmãos Deivid, Daniele e Danlei, meu sobrinho Luiz Felipe e por fim e não menos importante minha companheira Ana Maria e família por terem me concedido tanta felicidade, por eu ter tido a melhor vida que eu poderia ter, pelos melhores momentos, pelas melhores lembranças, pela melhor educação. Obrigada por tamanha paciência nas horas mais difíceis e, por me ajudarem a enxergar sempre o lado positivo de qualquer situação, obrigado pelo apoio, confiança e atenção. Ao Mestre. Douglas Sampaio Henrique, pela orientação, confiança e paciência durante todos esses anos que convivemos juntos. À Prof. Emilyn Midori Maeda pelo apoio, ensinamentos e confiança. Aos amigos que encontrei no caminho e que me ajudaram a concluir esse trabalho: Lucas José Oberosler, Raquel Fornazari e Tainara Oliveira. Agradeço imensamente a todos os professores, em especial Prof. Marco Antonio Possenti, Almir Antonio Gnoatto e Paulo Cella, que me passaram conhecimento e valores que vão ficar comigo pelo resto de minha vida. Enfim a todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	07
2 OBJETIVO	08
2.1. OBJETIVO GERAL	08
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	08
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	09
3.1 IMPORTÂNCIA DAS ENZIMAS	09
3.2 ATUAÇÃO DAS ENZIMAS.....	11
4 MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1 DESCRIÇÃO GERAL DA PESQUISA.....	13
4.2 SEPARAÇÃO DOS GRUPOS.....	15
4.3 CONTROLE LEITEIRO E ANÁLISES DE QUALIDADE DO LEITE.....	16
4.4 ANÁLISES BROMATOLÓGICAS.....	18
4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	19
5 RESULTADOS E DISCUÇÃO.....	20
6 CONCLUSÃO	<u>23</u>
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	<u>24</u>

RESUMO

BARBOSA, Douglas Kleiton. Suplementação de vacas leiteiras da raça holandesa com enzimas fibrolíticas, Paraná, 2016. Trabalho (Conclusão de Curso) - Programa de Bacharelado em Zootecnia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2016.

A crescente demanda mundial por alimentos de origem animal tem causado a intensificação dos sistemas de produção primária. No sistema de produção de leite esta intensificação pode ser caracterizada pelo melhoramento genético e a melhoria no manejo nutricional dos animais. Para manter altas produções e fornecer a concentração necessária de nutrientes é preciso fornecer altas quantidades de concentrados, porém, isso pode acarretar certas anomalias na fermentação ruminal afetando a produção e a saúde do animal. A utilização de Enzimas digestivas vem ganhando um espaço considerável no setor, com intuito de promover maior desempenho e saúde animal. O objetivo deste trabalho foi avaliar a utilização de doses crescentes de enzimas fibrolíticas diluídas e aplicadas na alimentação com intuito de melhorar produção e qualidade de vacas leiteiras da raça holandesa em sistema de confinamento *Compost Barn*. A pesquisa foi realizada em uma propriedade leiteira localizada no município de Dois Vizinhos, na região sudoeste do Paraná. Foram avaliados no experimento 24 animais com peso, produção, idade e fase de lactação aproximadas em análise de covariância em um período de 21 dias, com 14 dias de adaptação à dieta e sete dias de coleta de dados sobre: produção e composição do leite. As concentrações de enzimas utilizadas foram ineficaz para qualidade de leite aumento de produção.

Palavras Chave: Xilanase. Produção de Leite. Desempenho Produtivo. Nutrição Animal.

ABSTRACT

BARBOSA, Douglas Kleiton. Supplementation of dairy Holstein cows with Fibrolytic enzymes. Final paper, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, 2016.

The growing global demand for food of animal origin has caused the intensification of primary production systems. In milk production system of this deepening can be characterized by the breeding and improvement in the nutritional management of animals. To maintain high production and provide the necessary concentration of nutrients is necessary to provide high amounts of concentrates, however, this can lead to certain anomalies in ruminal fermentation affecting the production and health of the animal. The use of digestive enzymes is gaining considerable space in the sector, in order to promote greater performance and animal health. The objective of this study is to evaluate the use of increasing doses of Fibrolytic enzymes diluted and applied in the diet of dairy cows Compost Barn system, and evaluate the performance of dairy cows. The research will be conducted on a dairy property located in the city of Two Neighbors, in southwestern Paraná. They will be evaluated in the experiment in statistical linear model in a period of 21 days with 14 days for diet adaptation and seven days of data collection on: production and milk composition. The animals selected for the experiment will weight approximately date of production and lactation.

Keywords: Xylanase. Milk production. Productive performance. Animal nutrition.

1. INTRODUÇÃO

As enzimas digestivas são utilizadas como aditivos na alimentação tanto de ruminantes quanto de não-ruminantes e tem por função e objetivo melhorar o valor nutritivo do alimento facilitando sua digestão. A suplementação na ração de ruminantes com enzimas exógenas não era bem recebida, pois acreditava-se que as enzimas exógenas não sobreviveriam à proteólise do rúmen e que alta atividade fibrolítica da microbiota ruminal impediria resultados significantes com a adição de uma pequena fração de enzimas (BEAUCHEMIN; RODE, 1995).

No entanto, nos últimos anos, muitos estudos têm explorado a possibilidade de melhorar o valor nutritivo da forragem para ruminantes, utilizando enzimas fibrolíticas exógenas (BEAUCHEMIN E HOLTSHAUSEN, 2010).

O aumento da digestibilidade da fibra usando enzimas exógenas pode levar a melhorias significativas no desempenho de ruminantes em muitas partes do mundo, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. Os efeitos das enzimas fibrolíticas exógenas são influenciados por muitos fatores tais como tipo e dose da enzima, tipo de dieta administrada aos animais e método de aplicação das enzimas entre outros. (BEAUCHEMIN et al, 2003).

O intuito principal deste trabalho foi avaliar possíveis efeitos de diferentes dosagens de misturas entre enzimas Xylanase e celulase na dieta de vacas holandesas em um sistema de confinamento *Compost Barn*, para estabelecer qual a dosagem ideal para melhorar a produção e a qualidade do leite.

2 OBJETIVO

2.1. OBJETIVO GERAL

Determinar os possíveis efeitos das enzimas xilanase e celulase na produção e qualidade do leite de vacas holandesas.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar, aplicar e avaliar as melhores concentrações das enzimas xilanase e celulase para melhorar a produção e a qualidade do leite.
- Descobrir a influência da mistura entre as enzimas xilanase e celulase nos sólidos totais, gordura e proteína do leite.
- Notificar possíveis efeitos negativos da enzima xilanase e celulase no desempenho de vacas em lactação.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 IMPORTÂNCIA DAS ENZIMAS

O estudo de enzimas tem grande importância pelo fato de serem essenciais para os ruminantes não só na degradação dos alimentos, mas também sobre algumas doenças genéticas hereditárias em que pode haver uma deficiência ou até mesmo ausência total de uma ou mais enzimas e outras doenças podem se originar devido à aplicação e atividade de determinada enzima, e ainda alguns medicamentos agem através de interações com enzimas. (NELSON. D.L, 2011).

As condições ideais para atuação das misturas enzimáticas comerciais normalmente são: temperatura em torno de 60°C e o pH entre 4 e 5 (COUGHLAN, 1985). Essas condições diferem das condições do rúmen de acordo com Beauchemin et al, (2003) afirmando que as condições normais do rúmen que possui temperatura de 39°C e o pH 6,0 e 6,7. Contudo as misturas enzimáticas favorecem a atividade fibrolítica em pH 4,5.

As enzimas como um todo são proteínas globulares, e podem ser de estrutura terciária ou quaternária, atuando como catalisadores biológicos que compõem variadas reações bioquímicas, e ainda aceleram reações termodinamicamente favorecidas, são versáteis e específicas ao substrato que utilizam. (COELHO et al., 2008; CHAMPE; HARVEY, 1989).

Existem variados métodos de se aplicar enzimas. Todavia o método e a quantidade ideal ainda são desconhecidos. Como atividade da enzima depende estritamente do tipo de alimentação a especificidade da enzima ao tipo de alimento deve ser observada ao selecionar o método de fornecimento (HVELPLUND ET AL., 2009).

O hidrogênio e sua concentração influencia principalmente a velocidade das reações químicas, e a desnaturação das enzimas se dá de acordo com os extremos de pH. Portanto, cada enzima possui uma faixa de pH ideal. (CAMPESTRINI et al., 2005). As características das reações e propriedades catalisadas por enzimas é que a reação tem sua atividade na cavidade da enzima conhecida como sítio ativo, apenas sendo um substrato específico que pode se ligar ao sítio ativo. (NELSON; COX, 2011). Para ocorrer a máxima eficiência de atividade das enzimas o meio em

que ocorre a reação enzimática deve estar com temperatura e pH ótimos. De acordo com Morgavi et al. (2000), A maior parte das enzimas desenvolvidas pela indústria são proveniente do fungo *Trichoderma* e sua função consiste em fazer a degradação da fibra e efetuar a liberação das enzimas uma por uma no meio, e agem principalmente na degradação do substrato. Diferentemente do sistema que age a microbiota ruminal, pois a grande maioria sintetiza os complexos multienzimáticos. As principais enzimas provem a partir de quatro tipos de bactérias (*Bacillus subtilis*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, e *Streptococcus faecium*, spp.) e de três fungos (*Aspergillus oryzae*, *Trichoderma reesei*, e *Saccharomyces cerevisiae*) e são utilizadas como aditivos na alimentação animal (CAMPESTRINI et al., 2005).

O rúmen é considerado um ecossistema microbiano único, com pH variando entre 6,0 e 7,0 e temperatura em torno de 39°C, e possui meio anaeróbico com presença de substratos com atividade fermentativa, embora com intensidade variável. Três diferentes classes de microrganismos compõem a colonização, são bactérias, fungos e protozoários, sendo os fungos e bactérias que secretam os complexos enzimáticos (KOZLOSKI, 2009). A degradação dos alimentos ingeridos pelos ruminantes principalmente carboidratos só é possível devido a essa secreção destes complexos enzimáticos.

3.2 ATUAÇÃO DAS ENZIMAS

De acordo com Vargas e Kolver (1997), a degradação e aproveitamento dos alimentos com estrutura mais fibrosa pelos ruminantes, está ligado à secreção e síntese das enzimas através dos micro-organismos presentes nos rúmen, ocasionando a hidrólise da parede celular das gramíneas. No entanto a conversão alimentar, principalmente os fibrosos tem resultados pouco eficientes na transformação em carne e leite, ocasionando uma grande necessidade de novas biotecnologias nas dietas de rebanhos para obter maior aproveitamento dos nutrientes.

Segundo Hristov et al. (2000) as misturas enzimáticas fibrolíticas podem causar um aumento de 30% na atividade e função da xilanase especialmente no intestino usando a suplementação específica dessas enzimas na dieta dos animais. Além disso, foi observada certa redução na viscosidade intestinal após fornecimento dos níveis mais altos de enzimas, que resultou uma maior absorção de nutrientes no intestino dos animais.

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

Quatro fatores são essenciais para o aumento da digestão da fibra por manipulação microbiana como cita McSweeney et al (1999), sendo o número e o tipo de microrganismos que degradam a fibra, a aceitação microbiana à fibra, as enzimas que hidrolisam as ligações químicas na parede celular e as interações dentro e entre as espécies fibrolíticas e não-fibrolíticas.

O fornecimento das misturas enzimáticas no meio ruminal, onde o ambiente pode ou não submeter as enzimas exógenas a condições desfavoráveis (PH, temperatura e condições físicas da digesta), pode limitar a parcial ou total atividade da enzima e comprometer sua estrutura (CHESSON 1993).

A razão para a ineficácia de infusão ruminal de enzimas encontrada em alguns experimentos ainda é desconhecida, embora se tenha a hipótese de que houve contacto insuficiente entre as enzimas e substrato em partículas (LEWIS, G. E. et al. 1996). E o porquê da adição de enzimas na dieta é para tentar reduzir

efeitos negativos, ou seja, (fatores antinutricionais possivelmente gerados nos alimentos *in natura*, ou ainda pelo metabolismo normal da espécie da qual o material se origina, e talvez, por alguns mecanismos que diferem da decomposição ou inativação de alguns nutrientes, queda na digestão ou no metabolismo do alimento, tornando efeito contrário à nutrição ideal e adequada). Os efeitos e fatores antinutricionais em sua maioria não são tóxicos para os animais, contudo sua presença nas dietas causa crescimento reduzido e piora na conversão alimentar (VIEIRA. S. L, 2003).

Pesquisas têm mostrado que a suplementação na dieta com enzimas exógenas ocasiona o aumento da atividade da xilanase e celulase no rúmen (HRISTOV et al., 2000; MORGAVI et al., 2000).

Lewis et al. (1999), constataram maior produção de leite, cerca de 1,3 kg/dia e melhor desempenho na condição corporal de vacas no início e meio da lactação suplementadas com enzimas fibrolíticas adicionadas sobre o volumoso. Yang et al. (1999), fornecendo dois níveis diferentes de produto enzimático em uma dieta com 45% de concentrado, observaram aumento de 7% na produção de leite de vacas alimentadas com enzimas comparadas com vacas alimentadas com a dieta controle.

Martins et al (2006) avaliaram o consumo e a digestibilidade aparente total de dietas compostas de silagem de milho e feno de tifton 85 suplementadas com celulase e xilanase e encontraram aumento de digestibilidade da parede celular dos volumosos.

O melhor aproveitamento de alimentos fibrosos pelos ruminantes, comparando com os monogástricos, se dá pelo fato de possuírem os pré-estômagos colonizados por microrganismos, sendo a fermentação microbiana ruminal juntamente com a eructação e ruminação que garantem um processo eficiente de digestão das forrageiras (FURLAN; MACARI; FARIA FILHO, 2011).

Kung Jr. et al (2000) trataram silagem de milho e feno de alfafa com adição de celulase e xilanase antes de misturar com concentrados e obtiveram melhoria na produção de leite sem qualquer oscilação no consumo de matéria seca, porém ainda é necessário avaliar as fontes de enzimas e as doses necessárias para obter um bom desempenho e ganho econômico.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DESCRIÇÃO GERAL DA PESQUISA

O experimento foi conduzido em uma propriedade localizada no município de Dois Vizinhos, PR mais precisamente na linha Conrado que conta com uma área de 43 há. A propriedade conta com um sistema de confinamento conhecido como *compost Barn* que possui 1.250 m² entre cama, bebedouros, comedouros e corredor, com capacidade máxima de 50 animais.

Controle da dieta.



Fonte: Arquivo pessoal

Foram avaliadas 24 vacas em lactação, sendo seis vacas distribuídas em quatro tratamentos. Os tratamentos foram divididos em quatro níveis (0, 500, 1000 e 1500 Mg por kg de MS de ração total) de mistura enzimática (80% de xilanase e 20% de celulase). O produto enzimático foi fornecido em três proporções diferentes, 05g, 15g e 25g/animal/dia sendo misturado e disponibilizado na ração total. O período experimental foi de 21 dias, sendo 14 dias de adaptação à dieta e sete dias de coleta de dados sobre: produção e composição do leite. O trabalho teve início dia 10 até o dia 30 de julho atendendo os 21 dias do experimento entre adaptação e coleta de dados e foram escolhidos animais com peso, produção e data de lactação aproximada.

O experimento iniciou em julho de 2016 e teve 21 dias de duração. Os animais passaram por um período de adaptação de 14 dias, após este período iniciou o acompanhamento e coleta de dados para pesquisa e obtenção de resultados. Os animais que foram avaliados no presente experimento tem em media 650 Kg com uma produção média de 30 L leite por ordenha. O controle da produção leiteira e alimentação foram feitos ainda no período de adaptação assim como três análise do leite sendo antes, durante e após o período experimental, as análises foram feitas no laboratório PROVLAB ANALISES LABORATORIAIS na cidade de Francisco Beltrão, Paraná, Brasil.

As misturas enzimáticas foram fornecidas individualmente, misturado com a dieta já balanceada pelo responsável técnico da propriedade, sendo após a ordenha da manhã. O grupo controle recebeu a dieta igual porem sem a mistura enzimática.

4.2 SEPARAÇÃO DOS GRUPOS

Para ter uma visão mais ampla da propriedade e o manejo utilizado, foi dividido os quatro grupos, com peso, produção e data de lactação mais próximos possíveis. Cada grupo continha seis animais e para identificar cada animal de cada grupo foi utilizado quatro cores de acordo com o nível de enzima, vermelho para o grupo controle, amarelo para cinco gramas de enzima, verde para dez gramas de enzima e azul para vinte e cinco gramas de enzima

Tabela 1 - Separação dos grupos de animais de acordo com a quantidade de enzima fornecida.

	0 UI	P/L	500 UI	P/L	1000 UI	P/L	1500 UI	P/L
	Marta	50	Linca	54	Azaleia	60	Penta	50
	Amarok	36	Dolores	50	Certeza	58	Caju	58
	Dora	36	Caramelo	36	Salina	46	Sem brinco	50
	Dureza	30	Ranger	40	Joelma	50	Marreca	40
	Crica	16	Fada	35	Laka	36	Rolinha	36
	Loira	20	Cacau	38	Esmeralda	44	Mila	36
Media tratamento		31,3		42,2		49,0		45,0

Legenda: Ui - unidade internacional; P/L - produção diária de leite;

4.3 CONTROLE LEITEIRO E ANÁLISES DE QUALIDADE DO LEITE

O controle leiteiro começou no dia zero, e se estendeu durante todo o período da pesquisa, com controle na ordenha da manhã rigorosamente iniciando 5:30 horas e igualmente a tarde, sendo coletada amostras de todos os animais selecionados para realizar a pesquisa. A coleta se deu por meio de frascos de 50 ML com conservante bronapol que evita a proliferação microbiana na amostra. O leite coletado deveria ser o mais homogêneo possível, ou seja, dentro do frasco deveria ter amostras de leite dos quatro tetos, sendo assim a forma de coleta utilizada foi usar coletores pneumáticos inclusos no equipamento de ordenha indicados pelo fabricante da ordenha, com ótima precisão e baixa margem de erro, usado também para medir o volume de leite tirado diariamente.

As análises de qualidade do leite (gordura, proteína, lactose, sólidos totais, estrato seco desengordurado, contagem de células somáticas e nitrogênio) foram feitas no laboratório PROVLAB ANALISES LABORATORIAIS na cidade de Francisco Beltrão, Paraná, Brasil.

Com isso, foi feita a análise físico/químicas das amostras de cada animal e de cada tratamento para fazer um comparativo conforme o andamento da pesquisa e com o fornecimento da enzima e avaliar os valores crescentes de gordura, proteína bruta, lactose e sólidos totais como mostra a tabela a seguir.

Tabela 2 – Resultados das análises físico/químicas de todos os animais avaliados.

SEQ.	GORDURA	PROTEINA	LACTOSE	SOLIDOS	CCS	ESD	NITROGÊNIO
	(%)	(%)	(%)	(%)	(x 1000/1	(g/100g)	(mg/dL)
1 MILA	3,48	2,84	5,01	12,27	145	8,79	21,81
2 SALINA	2,77	3,22	4,77	11,69	48	8,92	17,33
3 FADA	3,24	3,87	4,76	12,87	20	9,63	19,49
4 MARECA	2,55	3,01	4,37	10,84	29	8,29	19,59
5 CARAMELO	4,07	3,4	4,92	13,37	23	9,3	18,8
6 DUREZA	3,88	3,11	4,99	12,94	102	9,06	13,29
7 AMAROK	3,23	2,99	4,58	11,74	148	8,51	16,26
8 LINKA	2,69	2,99	4,49	11,1	29	8,41	21,33
9 ROLINHA	2,56	3,06	5,07	11,61	33	9,05	22,77
10 DOLORES	2,29	3,19	4,73	11,12	218	8,83	16,9
11 RANGER	3,84	3,2	4,93	12,94	68	9,1	10,52
12 CAJU	2,72	2,95	4,83	11,42	24	8,7	22,79
13 CACAU	3,93	3,36	4,67	12,95	85	9,02	19,13
14 SEM BRINCO	3,47	3,06	4,94	12,41	67	8,94	18,12
15 PENTA	2,84	2,91	4,89	11,56	12	8,72	23,52
16 CRICA	3,5	4,2	4,31	13	97	9,5	22,25
17 DORA	3,23	2,82	4,99	11,96	17	8,73	17,92
18 CERTEZA	2,84	2,69	4,6	11,04	381	8,2	19,31
19 MILA	3,57	2,81	4,85	12,17	217	8,6	20,47
20 JOELMA	2,42	3,27	5,06	11,67	70	9,25	19,57
21 LAKA	1,86	2,86	4,86	10,47	27	8,61	20,8
22 ESMERALDA	2,88	3,06	5,05	11,94	177	9,06	16,59
23 AZALEIA	2,73	2,96	4,39	11	34	8,27	24,79
24 JOELMA	3,23	3,08	4,37	11,63	147	8,4	16,68
MÉDIA	3,08	3,12	4,77	11,90	92,42	8,83	19,17

4.4 ANÁLISES BROMATOLÓGICAS

Todos os alimentos que compõem a dieta total foram analisados no laboratório da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, as amostras dos alimentos foram coletadas durante o período de adaptação para ter em mãos os valores reais da qualidade de cada ingrediente que faziam parte da dieta, sendo eles silagem de milho, casca de soja, concentrado, feno de aveia, torta de soja e ração total, sendo determinados a matéria seca (MS), matéria mineral (MM), extrato etéreo (EE) e proteína bruta (PB), de acordo com a metodologia descrita por Silva e Queiroz (2002). Análise de fibra insolúvel em detergente neutro (FDN) serão realizadas pelo método de Mertens et al. (2002) como mostra a tabela a seguir:

Tabela 3 – Valores das análises de cada alimento que compõe a dieta total.

Amostra	MS%	PB%MS	EE%MS	MM%MS	CT%MS	MO%MS	FDN% MS	CNF %MS
Silagem	29,9	8,0	5,5	6,0	80,5	94,0	38,2	42,3
Casca soja	86,5	13,1	2,0	7,2	77,7	92,8	61,6	16,1
Concentrado	79,6	23,5	3,6	9,4	63,5	90,6	17,7	45,7
Feno aveia	64,0	14,0	3,0	10,9	72,1	89,1	58,1	14,0
Torta soja	85,5	41,7	5,8	6,9	45,6	93,1	11,6	34,0
Ração total	66,7	18,5	4,0	8,0	69,4	92,0	32,1	37,3

MS: matéria seca; PB: proteína bruta; EE: extrato etéreo; MM: matéria mineral; CT: concentrado total; MO: matéria orgânica; FDN: fibra detergente neutro;

A proporção utilizada na propriedade era de 60/40 volumoso e concentrado respectivamente, fornecendo duas vezes ao dia de acordo com o balanceamento da dieta, sendo aplicada a mistura enzimática sobre a ração total na alimentação da manhã, Com acompanhamento para verificação de ingestão do produto enzimático.

Proporção entre quantidade de alimento fornecido x Kg em Matéria seca consumida.

Alimento	Kg/DIA X M.S CONSUMIDA	
Silagem	30 Kg/dia	8,97 Kg/MS
Casca de soja	1,2 Kg/dia	1,038 Kg/MS
Concentrado	8 Kg/dia	6,37 Kg/ MS
Feno de aveia	1,5 Kg/dia	0,96 Kg/MS
Torta de soja	3 Kg/dia	2,56 Kg/MS
TOTAL	43,7 Kg/dia	19,90 Kg/MS

4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.

A normalidade da distribuição dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Para os dados cuja distribuição não era normal foi feita a transformação de Box-Cox. A produção e a composição do leite obtidos antes de começar o fornecimento da enzima, foram usados como covariável no modelo estatístico para avaliar o efeito da dose da enzima nessas respectivas variáveis. Análise de Covariância foi realizada usando o Proc Mixed do SAS (v. 9.4), no qual foi testado primeiramente o efeito da covariável usando o modelo:

$$y_i = \alpha_i + \beta_i x_i + e_i \quad (1)$$

em que, α_i representa o intercepto da i -ésima dose de enzima, β_i é o coeficiente angular da i -ésima dose de enzima e $e_i \sim iid N(0, \sigma^2)$ é o erro experimental. Após verificar o efeito da covariável foi testada a hipótese de haver um coeficiente angular comum para todos os níveis de enzima por meio do ajuste do seguinte modelo:

$$y_i = \alpha_4 + (\alpha_i - \alpha_4) + \beta_4 x_i + (\beta_i - \beta_4) x_i + e_i \quad (2)$$

o modelo acima possui os mesmos elementos do modelo (1) sendo que α_4 e β_4 são o intercepto e o coeficiente angular do nível mais alto de enzima, respectivamente. Como todas as variáveis testadas tiveram efeito significativo para a co-variável e coeficiente angular comum, o efeito de tratamento foi testado com o modelo abaixo:

$$y_i = \alpha_i + \beta x_i + e_i \quad (3)$$

em que, α_i representa o intercepto da i -ésima dose de enzima, β é o coeficiente angular comum para todos os níveis de enzima e $e_i \sim iid N(0, \sigma^2)$ é o erro experimental. Como o tratamento era quantitativo (níveis de enzima) foi utilizado o comando ESTIMATE do SAS (v 9.4) para avaliar se o formato da curva de resposta era linear, quadrática ou cúbica.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os diferentes níveis da mistura de enzimas xilanase e celulase não influenciaram ($P > 0,05$) a produção e a qualidade do leite a conforme resultados apresentados na (Tabela 4). Apenas a CCS apresentou $p < 0,05$, mas ao se realizar a análise de regressão não se constatou efeito ($p > 0,05$) do teor de mistura enzimática sobre a CCS.

Tabela 4 – Resultados da análise estatística de produção e qualidade do leite.

Médias e Intervalos de Confiança (95%) das varáveis de composição do leite para cada nível de produto fornecido									
Tratamen	0g/dia	5g/dia	15g/dia	25g/dia	valor P				
					ANOVA	L	Q	C	
Produção	305,55 ± 27,18	313,84 ± 23,83	310,16 ± 25,18	287,93 ± 24,275	0,4099				
Gordura	3,11 ± 0,36	2,88 ± 0,37	2,83 ± 0,37	3,13 ± 0,35	0,4729				
Proteína	2,99 ± 0,09	3,11 ± 0,12	3,09 ± 0,11	3,00 ± 0,10	0,2660				
Sólidos	11,85 ± 0,35	11,78 ± 0,36	11,75 ± 0,36	11,92 ± 0,35	0,8815				
CCS	76,42 ± 23,55	38,26 ± 11,87	72,25 ± 22,19	52,63 ± 16,94	0,0108	0,4820	0,2186	0,0022	
ESD	8,79 ± 0,13	8,97 ± 0,14	8,85 ± 0,14	8,75 ± 0,14	0,1459				
Nitrogêni	18,17 ± 2,13	20,47 ± 2,16	18,97 ± 2,13	19,81 ± 2,15	0,4231				

L: valor linear; Q: valor quadrático; C: valor cúbico;

Diferente de nossos resultados, Schingoethe et al. (1999), observaram um pequeno aumento no teor de proteína e gordura do leite (13% e 20% respectivamente), e na produção de leite (10,8%), adicionando misturas enzimáticas fibrolíticas nas dietas com silagem de milho.

Alguns fatores que podem ter influenciado o não efeito das misturas enzimáticas em nosso trabalho podem estar relacionados a dieta ser de extrema qualidade e bem balanceada com fibra de alta qualidade em teores adequados. Sendo assim, não haveria necessidade de enzimas exógenas para melhorar a qualidade da dieta. Outros fatores a serem considerados são a temperatura e tempo de ação da enzima antes, durante e após ingestão pelo animal. Segundo Nsereko et al., (2000) a adição da mistura enzimática no alimento antes da ingestão torna-os mais sensíveis à hidrólise ruminal.

Na alimentação animal todos os aditivos usados devem mostrar uma considerável faixa de termoestabilidade, inclusive as enzimas, para resistir à temperatura interna dos órgãos digestivos dos animais, de acordo com Castro e Mendes. (2004), as enzimas possuem uma variação térmica de acordo com sua origem, sendo as fúngicas que detêm maior estabilidade térmica. Portanto, acreditamos que o fator temperatura não seja o responsável pela desnaturação das enzimas que utilizamos.

Alguns autores salientam que as enzimas apresentam menor efetividade quando aplicadas diretas no ambiente ruminal junto com o alimento fornecido, e ainda, as enzimas para terem um efeito positivo precisam de uma forte ligação com o substrato para fazer a degradação do alimento fornecido (FONTES et al., 1995). Sendo assim, a simples mistura do produto enzimático com a ração pode não ter sido eficaz no sentido de gerar uma forte ligação entre as enzimas e seus substratos, reduzindo a eficiência das mesmas.

A perda de atividade enzimática exógena a partir do rúmen pode ocorrer através da degradação por proteases microbianas ou do não contato com o substrato no rúmen. Contudo, existem evidências de que a degradação de enzimas no rúmen pode não ser um problema significativo (Chesson. 1993). No trabalho de Hristov et al. (1996) foi demonstrado que a atividade enzimática exógena é mantida durante várias horas no rúmen e no intestino delgado da vaca leiteira.

A partir desses resultados é possível afirmar que enzimas fibrolíticas começam a degradar o alimento fibroso assim que são ingeridas com oscilação no seu desempenho de acordo com a qualidade do ambiente e do alimento, e podem auxiliar a melhor atividade do microrganismos existentes no rumem melhorando o aproveitamento do substrato (DAWSON & TRICARICO, 2007).

Segundo McAllister et al. (2001), o modo que as enzimas fibrolíticas agem, tem uma grande complexidade, podendo obter respostas variáveis de acordo com a forma e a utilização nas dietas de vacas leiteiras. Portanto, são necessárias mais pesquisas sobre a atuação das enzimas para padronizar quantidade, produção e o melhor método de aplicá-las nas dietas de ruminantes.

Segundo Lurdes (2005) ainda existem dúvidas quanto à uniformização dos níveis enzimáticos, formas de aplicação das enzimas entre outras, que produzem resultados contraditórios que geram dificuldades na avaliação dos produtos enzimáticos e dificultam a obtenção de resultados concretos.

6 CONCLUSÃO

A adição de diferentes dosagens do produto com a mistura de enzimas celulase e xilanase na dieta de vacas leiteiras confinadas em sistema *Compost Barn* não apresentou efeito na produção ou na qualidade de leite De vacas holandesas de alta produção, sendo necessários mais estudos, principalmente, em relação à forma de aplicação do produto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEAUCHEMIN, K. A.; Colombatto, D.; Morgavi, D. P.; Yang, W. Z., 2003: Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. *Journal of Animal Science* 81, E37–E47.

BEAUCHEMIN, K. A.; Holtshausen, L., 2010: Developments in enzyme usage in ruminants. In: M. R. Bedford, G. G. Partridge (eds), *Enzymes in Farm Animal Nutrition*, 2nd edn, CABI, Oxford, United Kingdom, pp. 206–230.

BEAUCHEMIN, K. A.; YANG, W. Z.; RODE, L. M. Effects of grain source and enzyme additive on site and extent of nutrient digestion in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 2, p. 378-390, 1999.

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

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Produção integrada no Brasil : agropecuária sustentável alimentos seguros** / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretária de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo. – Brasília : Mapa/ACS, 2009. 1008 p

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

CAMPESTRINI, Evandro; SILVA, V.T.M.; APPELT, Matias D. Utilização de enzimas na alimentação animal. **Revista Eletrônica Nutritime**.v.2.nº6.p.259-272. 2005.

CHESSON, A. Feed enzymes. **Animal Feed Science and Technology** , v.45, p.65-79, 1993.

COELHO, Maria A.Z.; SALGADO, Andrea M.; RIBEIRO, Bernardo D. **Tecnologia Enzimática**. Petrópolis- RJ, EPUB, 2008. p.288.

COUGHLAN, M.P. The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application. **Biotechnol. Genet. Eng. Rev.**, v. 3, p. 39-109, 1985.

DAWSON, K.A.; TRICARICO, J.M. **The use of exogenous fibrolytic enzymes to enhance microbial activities in the rumen and the performance of ruminant animals.** Disponível em: <http://en.engormix.com/Articles/View.aspx?id=695>. Publicado em: 31 out. 2007.

FONTES, C.M; HALL J.; HIRST, B.H. et al. The resistance of cellulases and xylanases to proteolytic inactivation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.43, p.52-57, 1995.

FURLAN, R.L.; MACARI, M.; FARIA FILHO, D.E. Anatomia e fisiologia do trato gastrointestinal. In: BERCHIELLI, T.T. (Ed.) **Nutrição de ruminantes.** Jaboticabal: Funep, 2006. p.583.

HRISTOV, A., T.A. McAllister and Cheng, K.-J. (1996). exogenous enzymes for ruminants: Modes of action and potential applications. *Proceedings 17th Western Nutrition Conference*, pp 5 I-6. Edmonton: Alberta.

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

HVELPLUND, T., M.R. Weisbjerg, I.K. Hindrichsen and J. Madseen, 2009. **The effect of adding exogenous enzymes at ensiling on nutrient availability in different forages.** *Proceedings of the TSAP Conference*, September, 2009, Mwanza, Tanzania, pp: 1-7

IBÁÑEZ, Emilio M. A., et al. Efeito de enzimas fibrolíticas sobre a degradação microbiana ruminal da fibra de cana-de-açúcar. *Ciência Animal Brasileira*, Goiânia, v. 11, n. 3, p. 488-495, jul./set. 2010.

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

KUNG JR, L. The Effect of Treating Forages with Fibrolytic Enzymes on its Nutritive Value and Lactation Performance of Dairy Cows. **Journal of Dairy Science.** vol. 83, no. 1, 2000.

LEWIS, G. E. et al. Effect of direct-fed fibrolytic enzymes on the digestive characteristics of a forage-based diet fed to beef steers. **Journal of Animal Science**, v. 74, n. 12, p. 3020-3028, 1996.

LEWIS, G. E. et al. Effect of direct-fed fibrolytic enzymes on the lactational performance of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 3, p. 611-617, 1999.

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

MARTINS, P.C. e GUILHOTO, J.J.M. **Leite e derivados e a geração de emprego, renda e ICMS no contexto da economia brasileira**. In: GOMES,A.T., LEITE, J.L.B.; CARNEIRO, A.V. (edits.) O agronegócio do leite no Brasil. Embrapa Gado de Leite. Juiz de Fora, MG. 2001.

McSWEENEY, C.S.; DALRYMPLE, B.P.; GOBIUS, K.S. et al. The application of rumen biotechnology to improve the nutritive value of fibrous feedstuffs: pre- and post-ingestion. **Livestock Production Science**, v.59, p.265-2283, 1999.

MEIRELES, A.J. – Leite Paulista – **História da Formação de Um Sistema Cooperativista no Brasil**, 1983.

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

NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. ed 5. p. 1275. Porto Alegre: Artmed, 2011.

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

NSEREKO, V.L.; MORGAVI, D.P.; RODE, L.M.; BEAUCHEMIN, K.A.; McALLISTER, T.A. Effects of fungal enzyme preparations on hydrolysis and subsequent degradation of alfalfa hay fiber by mixed rumen microorganisms in vitro. **Animal Feed Science and Technology**, v. 88, p. 153-170, 2000.

SCHINGOETHE, D.J.; STEGEMAN, G.A.; TREACHER, R.J. Response of lactating dairy cows to a cellulase and xylanase enzyme mixture applied to forages at the time of feeding. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 5, p. 996-1003, 1999.

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

TEMPELMAN,R.J. Experimental design and statistical methods for classical and bioequivalence hypothesis testing with an application to dairy nutrition studies. **Journal of Animal Science** v.82, p. E162–E172, 2004.

VARGA, G.A.; KOLVER, E.S. Microbial and animal limitations to fiber digestion and utilization. **Journal of Nutrition**, v.127, p.819-823, 1997.

VIEIRA, Sergio L. Oportunidade para o uso de enzimas em dietas vegetarianas. **IV SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA**, 2003, Chapecó – SC. Anais... Chapecó: 2003. p91 - 95.