

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RICARDO DINARTI MACHADO

ENZIMAS EXÓGENAS NA ALIMENTAÇÃO DE VACAS LEITEIRAS

CURITIBA

2019

RICARDO DINARTI MACHADO

ENZIMAS EXÓGENAS NA ALIMENTAÇÃO DE VACAS LEITEIRAS

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Zootecnia, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo de Almeida

CURITIBA

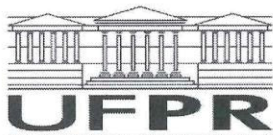
2019

M149e Machado, Ricardo Dinarti
Enzimas exógenas na alimentação de vacas leiteiras / Ricardo
Dinarti Machado. - Curitiba, 2019.
52 p.: il.,

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná. Setor
de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia.
Orientador: Rodrigo De Almeida

1. Bovino de leite. 2. Leite - Produção. 3. Lactose. 4. Leite -
Composição. I. Almeida, Rodrigo De (Orientador). II. Título. III.
Universidade federal do Paraná.

CDU 636.23.084.5



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ZOOTECNIA -
40001016082P0

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ZOOTECNIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **RICARDO DINARTI MACHADO** intitulada: **Enzimas exógenas na alimentação de vacas leiteiras**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 28 de Fevereiro de 2019.

RODRIGO DE ALMEIDA
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

SIMONE GISELE DE OLIVEIRA
Avaliador Interno (UFPR)

JOSE LUCIANO ANDRIGUETTO
Avaliador Externo (UFPR)

À Mina.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por ter guiado e protegido meus passos ao longo de todo este percurso.

Ao meu gerente de unidade, Marcelo Alvarez Ferreira, por ter acreditado em mim desde o início e me proporcionado a oportunidade de realizar este curso.

Ao Professor Rodrigo de Almeida, por ter me conduzido (mais uma vez) e por ser um exemplo profissional que eu levarei para toda a vida.

Aos meus colegas do Grupo do Leite, principalmente, Giancarlo, Deivid e Danieli pelas risadas e companheirismo durante as aulas.

A todo o pessoal da Quimtia, por ter viabilizado a realização deste projeto, em especial a Rebeca Weigel, sempre solícita e disposta em contribuir.

Ao Sr. Jan Noordegraaf Neto, proprietário da Chácara Condessa, pela enorme gentileza em ceder os animais de seu rebanho durante o período experimental.

Ao gerente da Chácara Condessa, Gilvani, pela amizade e por toda ajuda e paciência durante o experimental e, também, a todos os funcionários.

Ao coordenador da pecuária da Capal, Rodrigo Barros Navarro, pelo companheirismo e instruções técnicas durante o período experimental.

As amigas Ana Carolina e Aline, por terem me ajudado durante o experimento, mesmo sob as intempéries climáticas.

Aos meus pais, Wanderley e Deolinda, pelos almoços em Curitiba e pela torcida durante todo o mestrado.

E a minha bela e carinhosa esposa, Laura, por sempre me apoiar e se dedicar a mim, mesmo nos momentos mais turbulentos, sendo meu porto seguro durante a realização deste trabalho.

RESUMO

A suplementação de enzimas exógenas na alimentação de bovinos leiteiros tem a intenção de melhorar o aproveitamento dos alimentos pelos rebanhos, influenciando diretamente na produção de leite e seus componentes. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da suplementação de um complexo enzimático, composto por celulases, xilanases, amilases e proteases sobre a produtividade de vacas leiteiras de alta produção. O local experimental foi em um rebanho leiteiro comercial, localizado em Arapoti-PR. Foram utilizadas 94 vacas multíparas da raça Holandesa, blocadas por produção de leite, dias em lactação e ordem de lactação. Os tratamentos foram os grupos Controle (CON), animais que receberam 30 gramas de milho grão moído como placebo e Precizyon (ENZ), animais que receberam 24 gramas de milho moído mais 6 gramas do complexo enzimático Precizyon® X 200. Durante o período experimental foram coletadas amostras de leite para se determinar a composição do leite dos animais experimentais, referentes a gordura, proteína, lactose, caseína, sólidos totais, extrato seco desengordurado, contagem de células somáticas e nitrogênio ureico no leite. Amostras de fezes e dieta total misturada foram coletadas para se determinar o amido fecal, bem como para se determinar o coeficiente de digestibilidade com a utilização do marcador interno Fibra em Detergente Neutro Indigestível. Não houve diferenças ($P>0,05$) na produção de leite, produção de leite corrigida para 3,5% de gordura e produção de leite corrigida para energia. Também não foram detectadas diferenças ($P>0,05$) para teores e quantidades de gordura, proteína e caseína, bem como não houve diferenças ($P>0,05$) nas quantidades de lactose, sólidos totais e extrato seco desengordurado. Contudo, foram observadas diferenças nos teores de lactose ($P=0,02$), sólidos totais ($P=0,02$) e extrato seco desengordurado ($P<0,01$), sempre a favor dos animais suplementados com enzimas exógenas (ENZ). O escore linear de contagem de células somáticas foi semelhante ($P>0,05$) entre os grupos, mas o nitrogênio ureico no leite diferiu ($P<0,01$), com valores de NUL mais altos para as vacas do grupo ENZ. As vacas do grupo ENZ apresentaram menores ($P=0,03$) concentrações de amido em suas fezes em relação as do grupo CON. Entretanto, o coeficiente de digestibilidade da dieta foi maior ($P=0,02$) para o grupo CON (66,7%), em relação ao grupo ENZ (59,7%). Assim, conclui-se que o complexo enzimático não alterou a produção de leite, mas alguns componentes do leite, reduziu favoravelmente o teor de amido fecal, mas diminuiu a digestibilidade da dieta dos animais suplementados.

Palavras-chave: Enzimas. Vacas leiteiras. Amido fecal. Digestibilidade

ABSTRACT

The supplementation of exogenous enzymes in the diet of dairy cattle is intended to improve the utilization of food by the herds, directly influencing the production of milk and its components. The objective of this study was to evaluate the effects of supplementation of an enzymatic complex, composed of cellulases, xylanases, amylases and proteases on the productivity of high production dairy cows. The experimental site was in a commercial dairy herd, located in Arapoti-PR. A total of 94 Holstein multiparous cows were used, blocked by milk production, days in milk and lactation order. The treatments were Control (CON), animals that received 30 grams of milled corn as placebo and Precizyon (ENZ), animals that received 24 grams of milled corn plus 6 grams of the enzyme complex Precizyon® X 200. During the experimental period milk samples were collected to determine the milk composition of the experimental animals, regarding fat, protein, lactose, casein, total solids, solids-not-fat, somatic cell count and urea nitrogen in milk. Fecal and total mixed diet samples were collected to determine the fecal starch, as well as to determine the digestibility coefficient with the use of the internal marker Indigestible Neutral Detergent Fiber. There were no differences ($P>0.05$) in milk production, milk production corrected to 3.5% fat and milk production corrected for energy. There were also no differences ($P>0.05$) in the amounts and amounts of fat, protein and casein, and there were no differences ($P>0.05$) in the amounts of lactose, total solids and solids-not-fat. However, differences in lactose ($P=0.02$), total solids ($P=0.02$) and solids-not-fat ($P<0.01$) were observed, always in favor of animals supplemented with exogenous enzymes (ENZ). The linear somatic cell count score was similar ($P>0.05$) between the groups, but milk urea nitrogen differed ($P<0.01$), with higher NUL values for cows in the ENZ group. Cows in the ENZ group had lower ($P=0.03$) starch concentrations in their faeces than in the CON group. However, the coefficient of digestibility of the diet was higher ($P=0.02$) for the CON group (66.7%), in relation to the ENZ group (59.7%). Thus, it was concluded that the enzymatic complex did not alter the milk production, but some milk components favorably reduced the fecal starch content, but decreased the digestibility of the diet of the supplemented animals.

Key words: Enzymes. Dairy cows. Fecal starch. Digestibility.

LISTA DE GRÁFICOS

- GRÁFICO 1 - VARIAÇÃO DA MATÉRIA SECA (MS %) DOS ALIMENTOS VOLUMOSOS, DIETA TOTAL MISTURADA (TMR) E SOBRAS DA DIETA (FA: FENO DE AVEIA; PS: PRÉ-SECADO DE AVEIA; SM: SILAGEM DE MILHO; TMR (TOTAL MIXED RATION): DIETA TOTAL MISTURADA), AO LONGO DOS 28 DIAS EXPERIMENTAIS29
- GRÁFICO 2 - PRODUÇÃO MÉDIA DIÁRIA DE LEITE, EM KG DE LEITE POR DIA (KG/D), MENSURADA PARA OS GRUPOS CONTROLE (CON) E PRECIZYON (ENZ), AO LONGO DO PERÍODO EXPERIMENTAL (DE 11/04/2018 A 08/05/2018).31
- GRÁFICO 3 - TEOR DE AMIDO FECAL MÉDIO (%) OBTIDO PARA OS GRUPOS CONTROLE (CON) E PRECIZYON (ENZ) AO LONGO DO PERÍODO EXPERIMENTAL (COLETAS DE 1 A 8).....39
- GRÁFICO 4 - COEFICIENTE MÉDIO DE DIGESTIBILIDADE (%) DOS GRUPOS CONTROLE (CON) E PRECIZYON (ENZ), AO LONGO DO PERÍODO EXPERIMENTAL (COLETAS DE 1 A 8).....40

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - COMPOSIÇÃO DA DIETA TOTAL FORNECIDA AOS LOTES DO GRUPO CONTROLE E PRECIZYON, AO LONGO DE TODO O PERÍODO EXPERIMENTAL, EM PORCENTAGEM DA MATÉRIA SECA (%MS)	25
TABELA 2 - NÍVEIS DE GARANTIA DO COMPLEXO ENZIMÁTICO ¹ PRECIZYON [®] X 200.	25
TABELA 3 - COMPOSIÇÃO MÉDIA DOS ALIMENTOS VOLUMOSOS E DIETA TOTAL ¹ DOS GRUPOS CONTROLE (CON) E PRECIZYON (ENZ) AO LONGO DAS 4 SEMANAS EXPERIMENTAIS.....	28
TABELA 4 - MÉDIAS AJUSTADAS E ERROS PADRÕES MÉDIOS (EPM) DA PRODUÇÃO DE LEITE E PRODUÇÕES DE LEITE CORRIGIDA (PLC) PARA 3,5% DE GORDURA E ENERGIA, TEORES (%) E PRODUÇÕES DE COMPONENTES DO LEITE (KG/D), ESCORE LINEAR DE CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS E NITROGÊNIO UREICO NO LEITE (NUL), DOS GRUPOS CONTROLE (CON) E PRECIZYON (ENZ).	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µm	Micrômetro
CCS	Contagem de células somáticas
CON	Grupo Controle
ECC	Escore de condição corporal
ENZ	Grupo Precizyon
ESD	Extrato seco desengordurado
FDA	Fibra em detergente ácido
FDN	Fibra em detergente neutro
FDNI	Fibra em detergente neutro indigestível
IMS	Ingestão de matéria seca
MS	Matéria seca
NUL	Nitrogênio ureico do leite
TMR	Dieta total misturada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	14
	2.1 OBJETIVO GERAL	14
	2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3	REVISÃO DE LITERATURA	15
	3.1 CELULASE E XILANASE.....	16
	3.2 AMILASE.....	18
	3.3 PROTEASE.....	21
4	MATERIAL E MÉTODOS	23
	4.1 COMISSÃO DE ÉTICA	23
	4.2 LOCAL	23
	4.3 PERÍODO EXPERIMENTAL	23
	4.4 ANIMAIS AVALIADOS.....	23
	4.5 TRATAMENTOS.....	24
	4.6 DELINEAMENTO	26
	4.7 ANÁLISES.....	26
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
	5.1 PRODUÇÃO DE LEITE	30
	5.2 GORDURA.....	32
	5.3 PROTEÍNA.....	33
	5.4 CASEÍNA	33
	5.5 LACTOSE	34
	5.6 SÓLIDOS TOTAIS.....	35
	5.7 EXTRATO SECO DESENGORDURADO (ESD).....	36
	5.8 ESCORE LINEAR DE CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS ..	36
	5.9 NITROGÊNIO UREICO DO LEITE	37
	5.10 AMIDO FECAL.....	38
	5.11 DIGESTIBILIDADE	40
6	CONCLUSÃO	43
	REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

A alimentação é um dos fatores mais impactantes na rentabilidade da bovinocultura de leite e isto, aliado ao alto preço das *commodities*, tais como o milho e a soja, faz com que nutricionistas busquem alternativas mais econômicas, ou de menor custo, na formulação de dietas para rebanhos leiteiros, como por exemplo, a utilização de subprodutos da indústria alimentícia e a inclusão de aditivos que aumentem a eficiência produtiva (McCARTHY et al., 2013). Outrossim, animais de alto desempenho produtivo possuem maior exigência nutricional, quando comparados a animais de baixa produção, tornando-os responsáveis por uma alimentação de custo mais elevado, quando analisados individualmente. Contudo, tipicamente estes animais são mais eficientes, apresentando maior rentabilidade (HRISTOV et al., 1996).

Neste sentido, o tratamento biológico utilizando-se enzimas exógenas na alimentação de bovinos leiteiros tem a intenção de melhorar o aproveitamento dos alimentos pelos rebanhos (BEAUCHEMIN et al., 2003). Tais enzimas já têm sido estudadas há muitas décadas, mas sua utilização ainda é fonte de discussão por parte de nutricionistas que atuam na bovinocultura de leite (GENCOGLU et al., 2010). Isto tem levado a uma crescente atenção para pesquisas nesta área, entre os quais estudos que averiguaram a ação de celulases, xilanases, amilases e proteases (McALLISTER et al., 2003).

Em ambiente ruminal, as celulases, enzimas especializadas na degradação da parede celular vegetal, podem contribuir no processo digestivo da fibra pelo animal, aumentando a biodisponibilidade de nutrientes (KLINGERMAN et al., 2009). Já as xilanases têm ação direta na degradação da hemicelulose, um dos principais carboidratos constituintes da parede celular (SCHINGOETHE et al., 1999). Por sua vez, as proteases podem contribuir no metabolismo proteico quando suplementadas (EUN et al., 2005), enquanto que o amido da dieta pode ser melhor aproveitado com a utilização de amilases, constituindo-se um fator de elevada importância, uma vez que este carboidrato está presente em grandes quantidades nas dietas de vacas de alta produção (NOZIÈRE et al., 2014).

Todavia, os resultados obtidos em pesquisas nesta área ainda são muito inconsistentes, o que se deve em grande parte à incompreensão do modo de ação enzimática (ARRIOLA et al., 2011). Sendo assim, objetiva-se, a partir deste trabalho,

avaliar o efeito da suplementação de um complexo enzimático na dieta de vacas leiteiras de alta produção, analisando seus impactos na produção e composição do leite, bem como seus efeitos nos teores de amido fecal e na digestibilidade das dietas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da suplementação de um complexo enzimático, composto por celulases, xilanases, amilases e proteases sobre a produtividade de vacas leiteiras.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Mensurar a produção leiteira de vacas recebendo, ou não, o complexo enzimático;
- Determinar a composição do leite de animais suplementados ou não, com o complexo enzimático;
- Comparar o amido fecal dos animais recebendo, ou não, o complexo enzimático;
- Aferir a digestibilidade da dieta dos animais em ambas situações.

3 REVISÃO DE LITERATURA

Na alimentação de bovinos leiteiros, muitas estratégias são adotadas para aumentar a disponibilidade de nutrientes para os animais, melhorando o aproveitamento da dieta, por meio de tratamentos físicos, como picagem da fibra visando um tamanho ótimo de partículas, moagem de grãos, tratamento térmico, entre outros. Porém, além dos tratamentos físicos da dieta, uma das estratégias para sua otimização, é o emprego de enzimas digestivas na alimentação (BEAUCHEMIN et al., 2003).

O emprego de suplementação enzimática na alimentação animal tem sido verificado há décadas e sempre com o intuito de melhorar a utilização dos nutrientes da dieta (ADESOGAN, 2005). Contudo, os resultados de tal suplementação ainda são muito variados em rebanhos leiteiros devido a fatores que influenciam a efetividade da ação das enzimas, tais como estágio lactacional do animal, composição da dieta, taxa de passagem e condições ruminais, delineamento e tempo do ensaio experimental, modo de ação da enzima empregada, disponibilidade de substratos, sinergismo entre as enzimas e a própria regulação enzimática (ADESOGAN et al., 2014). No caso de bovinos leiteiros, o melhor aproveitamento dos nutrientes oriundos da fibra da forragem pode refletir em maior produção de leite. Neste sentido, a suplementação de enzimas fibrolíticas busca aumentar a degradabilidade da parede celular vegetal e, assim, otimizar o desempenho dos animais (LEE-RANGEL et al., 2010). Dentre as enzimas fibrolíticas, as mais estudadas pelos pesquisadores são as celulasas e as xilanases (BEAUCHEMIN et al., 2003).

Os microrganismos ruminais possuem uma vasta gama de enzimas capazes de hidrolisar os polissacarídeos estruturais das plantas, entretanto, as enzimas de fontes exógenas utilizadas como suplementação na dieta de ruminantes, são frequentemente extraídas do fungo aeróbico *Trichoderma*, que representa uma fonte comum de enzimas utilizadas na indústria alimentícia. Contudo, a ação das enzimas extraídas deste fungo é afetada diretamente pelo pH ruminal, o qual deve ser mais baixo para seu máximo funcionamento, diferindo das secretadas pelos microrganismos ruminais (MORGAVI et al., 2000).

3.1 CELULASE E XILANASE

A celulose e hemicelulose são os principais polissacarídeos estruturais das plantas, sendo que a hemicelulose é constituída por polissacarídeos capazes de serem degradados em meio ácido (BEAUCHEMIN et al., 2004). Já a celulose é o principal carboidrato constituinte da parede celular vegetal e se organiza estruturalmente em forma de cadeia linear de subunidades de glicose, conectadas por ligação β -1,4, conferindo grande estabilidade à molécula. Da mesma forma, a parede secundária das plantas é caracterizada por um polímero linear de xilanas, com unidades também interligadas por ligação β -1,4. Assim sendo, os componentes da parede celular podem ser classificados conforme sua degradabilidade em diferentes frações. Na análise química de alimentos, o valor de FDN (fibra em detergente neutro) refere-se à parcela do alimento que contém os componentes celulose, hemicelulose e lignina, e o valor de FDA (fibra em detergente ácido) à parcela do alimento que contém celulose e lignina (VAN SOEST, 1994).

Os elementos das paredes primária e secundária podem ser convertidos a carboidratos solúveis a partir da ação de celulases e xilanases (SCHINGOETHE et al., 1999). No processo de degradação da parede vegetal secundária, as principais enzimas envolvidas são as xilanases e β -1,4 xilosidases, e o produto resultante desta hidrólise são as xilanas (BHAT & HAZELWOOD, 2001), enquanto que as celulases participam de um complexo processo de degradação da celulose, e destacam-se principalmente as endocelulases, exocelulases e β -glicosidases (VAN SOEST, 1994). Desse modo, a inclusão de enzimas fibrolíticas diretamente na dieta consumida, tais como as recém-citadas, pode resultar na liberação de açúcares reduzidos e solubilização parcial da FDN e da FDA do alimento (HRISTOV et al., 1996).

A hidrólise da fibra é capaz de causar modificações na estrutura da parede celular da planta, o que pode indicar redução na efetividade física desta fibra em ambiente ruminal (BOWMAN et al., 2003). Ou seja, a suplementação de enzimas fibrolíticas tende a aumentar a digestibilidade da fração fibrosa, o que pode ocasionar em alguns casos a redução do pH ruminal (YANG et al., 1999), podendo levar a alterações no tempo de mastigação, ruminação e ócio. Contudo, em estudo realizado por Chung et al. (2012), a fermentação e o pH ruminal não sofreram alteração com a adição de enzimas fibrolíticas na dieta de vacas leiteiras. Além

disso, em experimento realizado por Bowman et al. (2003), o comportamento ingestivo, tempo de mastigação e ruminação também não foram alterados com a adição de enzimas fibrolíticas (celulases e xilanases).

Na produção de animais monogástricos, os aditivos enzimáticos são largamente empregados e conhecidos; em contrapartida, em ruminantes os mecanismos de ação destes produtos são ainda pouco compreendidos (MORGAVI et al., 2000). Outrossim, a maioria dos produtos comerciais contendo celulases e xilanases são empregados na indústria alimentícia, têxtil ou química (BHAT & HAZELWOOD, 2001). Neste cenário, a aplicação de enzimas fibrolíticas nas dietas de bovinos leiteiros tem sido estudada há anos com o intuito de melhorar a digestibilidade da forragem e, conseqüentemente, o desempenho produtivo (ARRIOLA et al., 2011), porém, a opinião sobre o uso destas enzimas na dieta de vacas leiteiras diverge entre autores. Por exemplo, de acordo com Chung et al. (2012), estes aditivos enzimáticos permitem a adoção de dietas com alta inclusão de forragem ou subprodutos fibrosos, sem comprometer a ingestão de energia e a produção de leite, mas para Rode et al. (1999), a atividade fibrolítica no ambiente ruminal é normalmente muito alta, presumindo-se que não haveria necessidade de suplementação de enzimas a fim de melhorar este processo.

Assim também, os resultados obtidos em diferentes estudos avaliando a ação da inclusão de enzimas fibrolíticas exógenas na alimentação de ruminantes, ainda divergem quanto à eficácia destas enzimas. Em alguns trabalhos não foi possível observar efeito algum nos parâmetros avaliados (BEAUCHEMIN et al., 2000; SUTTON et al., 2003). Em estudo realizado por Bernard et al. (2010), no qual houve a suplementação de celulase na dieta de vacas leiteiras, com alimentação em dieta total misturada a base de feno de alfafa ou silagem pré-secada de Tifton 85, não houve efeito na produção de leite. Porém, em outros estudos, observou-se a melhora na produção de leite ao empregar enzimas na alimentação (KUNG et al., 2000; YANG et al., 2000), como os resultados promissores obtidos em estudo realizado por Bowman et al. (2002), em que a adição de enzimas fibrolíticas na dieta aumentou a produção de leite devido ao aumento da digestibilidade da dieta, mas sem que houvesse aumento da ingestão de matéria seca pelos animais.

Da mesma forma, em estudo realizado por Lewis et al. (1999), a adição de enzimas fibrolíticas exógenas aumentou a produção leiteira e as quantidades de gordura e proteína no leite. Em contrapartida, os resultados obtidos por Rode et al.

(1999), demonstram aumento do volume de leite, mas com decréscimo no teor de gordura. À vista disso, com resultados tão distintos, o emprego de enzimas fibrolíticas nas dietas de vacas leiteiras ainda não é largamente adotado, mesmo com a sua importância comprovada em vários estudos (HOLSTENHAUSEN et al., 2011).

3.2 AMILASE

Nos últimos anos, devido aos elevados preços do milho como *commodity* agrícola, tem sido crescente o interesse em reduzir a inclusão de amido nas dietas de vacas leiteiras. Mas, é importante atentar-se a este fato, uma vez que a redução do amido na dieta pode acarretar em menor energia disponível para vacas em lactação e, conseqüentemente, comprometer a produção de leite e de proteína no leite. Diante destes fatos, pesquisas que visem o melhoramento da digestibilidade do amido dietético são importantes para a pecuária leiteira, uma vez que grande parte da alimentação dos animais constitui-se por elevadas quantidades deste nutriente (NOZIÈRE et al., 2014), particularmente nos sistemas confinados de criação.

Sistemas intensivos de produção de ruminantes comumente utilizam o amido oriundo de grãos de cereais como fonte primária de energia (DILorenzo et al., 2011). Neste sentido, frequentemente o teor de grãos fornecidos na dieta de vacas leiteiras de alta produção é aumentado, uma vez que estes animais possuem elevado requerimento de energia em suas dietas e, para atender esta demanda, utiliza-se o amido presente nestes ingredientes como a principal fonte da energia que lhes é requerida (ANDREAZZI et al., 2018). Contudo, a rápida e intensa degradação do amido abundante na dieta pode resultar em grande quantidade de ácidos produzidos no ambiente ruminal, podendo ocasionar um quadro de acidose subclínica, o que traria comprometimento à saúde do rúmen e, conseqüentemente, à produção leiteira (OWENS et al., 1998). Além disto, com o estabelecimento deste quadro, pode haver redução na síntese da microbiota ruminal, bem como na secreção de sólidos do leite, particularmente gordura do leite (OBA & ALLEN, 2003). Por outro lado, a potencial maior degradação da fração amilácea dietética com a inclusão da amilase exógena, pode resultar em maior síntese de proteína microbiana no rúmen e, por conseguinte, maior teor de proteína no leite (NRC, 2001).

O nível ótimo de amido na dieta de vacas leiteiras ainda não está bem definido, mas Staples et al. (2007) sugere uma faixa entre 24 a 26% da MS da dieta. Entretanto, em grandes rebanhos comerciais leiteiros nos estados do Michigan e Wisconsin, nos Estados Unidos (EUA), este nível variou entre 25 a 30% (SHAVER, 2006; BUCHOLTZ, 2006). Neste sentido, é importante salientar que muitos fatores podem afetar a disponibilidade de amido na dieta de vacas leiteiras, tais como tamanho de partícula do grão de milho, tipo do endosperma, colheita, método de processamento e armazenamento (FIRKINS et al., 2001). Assim também, o processo mais largamente utilizado para se maximizar a digestão do amido dietético e melhorar o desempenho animal, é o processamento físico do grão, particularmente a moagem (ZINN et al., 2002). Segundo Weiss et al. (2011) o tamanho de partícula do grão de cereal é o fator mais impactante na digestibilidade, quando a principal fonte de energia utilizada provém do grão de milho moído. Logo, percebe-se a importância de se atender as demandas energéticas de animais em lactação, mas evitando-se ao máximo o quadro de acidose ruminal.

Porém, mesmo com a possibilidade de queda do pH ruminal, o amido dietético é importante para maximizar a população microbiana no rúmen, uma vez que é uma relevante fonte de energia para as bactérias. Assim, a amilase pode auxiliar na hidrólise do amido do milho, provendo maior energia para o crescimento das bactérias degradadoras de celulose, ocasionando aumento da digestibilidade da fibra no rúmen (TÓTH & TÓTHI, 2016). Neste contexto, a adição de amilase na alimentação de vacas leiteiras pode vir a melhorar não somente a digestibilidade ruminal do amido, mas também a de carboidratos não-amiláceos (McCARTHY et al., 2013), pelo efeito de aumento da população microbiana. Além disso, a utilização de amilase exógena em dietas de vacas de alta produção, objetiva também a melhora no aproveitamento dos carboidratos presentes nos alimentos (VARGAS et al., 2012). Contudo, ainda assim, a grande maioria dos estudos realizados com suplementação de enzimas exógenas na alimentação de bovinos leiteiros tem como foco as enzimas fibrolíticas (BEAUCHEMIN et al., 2003), sendo que estudos com a utilização de amilase são poucos e não completamente explorados (NOZIÈRE et al., 2014).

Em estudo realizado por Andreazzi et al. (2018), no qual se avaliou a eficácia da suplementação de amilase exógena para vacas recebendo dietas com alto teor de amido (32% da MS), observou-se que as vacas do lote tratamento (recebendo enzima) tiveram a produção de leite aumentada (+0,7 kg/dia), com melhor ingestão

de matéria seca (-1,0 kg/dia), resultando em melhor eficiência leiteira (+0,12 unidades). Contudo, não foi constatada maior digestibilidade total dos nutrientes. Da mesma forma, em um grande estudo realizado por Harrison & Tricarico (2007), os animais suplementados com aditivo de atividade amilolítica produziram 1 kg de leite a mais por dia.

Corroborando ainda com estes resultados, em estudo realizado por Klingerman et al. (2009), testando adição de amilase na dieta de vacas leiteiras, os animais tratados com a enzima tiveram produção de leite aumentada em 3,9 kg/dia, em comparação aos animais do grupo controle, verificando também melhoria da eficiência leiteira. Outro estudo demonstrou ainda que vacas leiteiras alimentadas com dietas reduzidas em amido (20,7% da MS da dieta), porém suplementadas com amilase, tiveram menor ingestão de matéria seca, maior digestibilidade dos nutrientes, menor nitrogênio ureico no leite, maior produção de leite corrigida para gordura e para energia, quando comparadas a animais que receberam dieta com teor normal de amido (27,1% da MS da dieta) mas sem a suplementação enzimática (GENCOGLU et al., 2010).

A fim de avaliar o efeito da adição de amilase exógena sobre a digestibilidade da FDN dietética na dieta de vacas leiteiras, Weiss et al. (2011) conduziram um estudo nestas condições e constataram aumento na digestibilidade da FDN, tendo sido atribuído este resultado ao suposto aumento da disponibilidade de energia provinda do amido para as bactérias que degradam fibra. Entretanto, em experimento conduzido por DiLorenzo et al. (2011), suplementando amilase exógena associada ao milho laminado ou floculado para novilhos de corte confinados, os autores não observaram melhora na digestibilidade total dos nutrientes e no desempenho animal, concluindo que a relação entre suplemento amilolítico e a digestão do amido ainda precisa ser melhor investigada. Resultado semelhante foi constatado por Lee-Rangel et al. (2010) em pesquisa realizada com cordeiros em crescimento, alimentados com grande quantidade de concentrado na dieta, na qual o efeito da amilase foi nulo no desempenho dos animais.

Em contrapartida, em estudo realizado por McCarthy et al. (2013), a adição de amilase na dieta de vacas com baixo teor de amido resultou em piora no desempenho animal, diminuindo a produção de leite e aumentando a ingestão de matéria seca. Em outro trabalho (NOZIÈRE et al., 2014) o desempenho em produção de leite de vacas primíparas não foi alterado ao adicionar enzima

amilolítica na dieta, tendo sido aumentada a digestão ruminal do amido, mas sem alteração na digestão deste componente no trato total. A digestibilidade da FDN também não aumentou com a adição de amilase, contrastando com outros estudos realizados previamente (KLINGERMAN et al., 2009; GENCOGLU et al., 2010).

Uma maneira de avaliar a degradação do amido da dieta de ruminantes é a partir do teor de amido nas fezes, ou amido fecal. Com o intuito de avaliar este parâmetro, Oliveira et al. (2015) conduziram um experimento com bovinos em confinamento e averiguaram que a porcentagem de amido fecal não foi influenciada pela suplementação de enzimas amilolíticas, pois, segundo os autores, a excreção de amido pelas fezes é também afetada pelo tipo de cereal e pela forma como os grãos são processados.

De acordo com Huntington et al. (2006), em estudo avaliando o impacto da mudança de local de digestão do amido dietético ao longo do trato gastrointestinal (rúmen, intestino delgado e intestino grosso) sobre a eficiência energética de touros em período de terminação, foi possível concluir que as maiores taxas de eficiência energética ocorreram quando o amido foi degradado na porção ruminal e do intestino delgado destes animais, sendo que, quando o amido foi deslocado para ser degradado em sua maior parte no intestino grosso, ocorreu considerada redução na sua digestibilidade, com piora na disponibilidade de energia aos animais. Ainda, de acordo com tal estudo, a troca do local de degradação do amido do rúmen para o intestino delgado, somente se justificaria caso a digestibilidade do amido fosse igual ou superior a 75% nesta porção, e que isto poderia ser alcançado com baixas ingestões de amido ao longo do dia ou com alimentos altamente processados, como o milho floculado.

3.3 PROTEASE

A proteína dietética é frequentemente o componente mais caro da alimentação (MORGAVI et al., 2001) e, segundo Annison (1997), para dietas com forragens de baixa qualidade, este fator contribuiria como agravante na piora da utilização de proteína pelos animais, uma vez que os microrganismos ruminais passariam a utilizar a proteína dietética como fonte de energia. Este é um dos motivos pelos quais a utilização de enzimas proteolíticas exógenas na alimentação de ruminantes tem sido ignorada, pois assumia-se que poderia causar uma

excessiva degradação de proteína no rúmen, resultando em um ineficiente aproveitamento do nitrogênio (EUN et al., 2005).

Contudo, recentemente, em estudo realizado por Sucu et al. (2014), as concentrações de nitrogênio ureico no sangue e na urina diminuíram em vacas suplementadas com proteases, sendo que os autores atribuíram isto a melhora na síntese de proteína microbiana no rúmen e na utilização do nitrogênio. Já Colombatto et al. (2003), obtiveram como resultado, em estudo realizado com vacas leiteiras, aumento na degradabilidade da matéria seca e da FDN do feno de alfafa e da dieta total misturada fornecida aos animais.

Estes resultados apontam possíveis melhorias na eficiência da utilização dos componentes nutricionais da dieta de ruminantes quando enzimas exógenas são fornecidas na dieta dos animais, porém, devido aos inúmeros resultados divergentes entre trabalhos e autores, fica evidente a necessidade de estudos que possam explorar mais os efeitos destas enzimas sobre as variáveis produtivas em rebanhos leiteiros.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COMISSÃO DE ÉTICA

Este experimento, de protocolo número 010/2018, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

4.2 LOCAL

O experimento foi realizado na Chácara Condessa, rebanho leiteiro comercial localizado no município de Arapoti-PR (24°09'28" S, 49° 49'36" W, 860 m de altitude). O clima da região, de acordo com a classificação de Koppen, é o Cfa, descrito como subtropical, sem estação seca definida e verões com temperaturas acima 22° C nos dias mais quentes (IAPAR, 2017).

4.3 PERÍODO EXPERIMENTAL

O experimento teve duração total de 33 dias, sendo que houve um período pré-experimental de 5 dias (covariável), no qual foram acompanhadas seis ordenhas em sequência para mensurar a produção de leite para a blocagem dos animais, bem como para coletar amostras de leite para determinação da composição de leite inicial dos animais experimentais, seguido do período experimental propriamente dito de 28 dias, com início em 11 de abril e término em 8 de maio de 2018.

4.4 ANIMAIS AVALIADOS

O rebanho possuía cerca de 300 animais em lactação, todos da raça Holandesa, produzindo em média 30 litros por dia, totalizando 9.000 litros/dia. O lote experimental foi o grupo de vacas multíparas de alta produção, e 94 animais foram incluídos no experimento. Ao longo dos 33 dias experimentais, nenhuma vaca morreu ou deixou o experimento.

No período pré-experimental, a produção média de leite dos animais experimentais foi de 39 litros/dia e composição de 3,52% de gordura, 3,11% de

proteína, 229.000 células/mL de CCS (contagem de células somáticas) e 12,03 mg/dL de nitrogênio ureico no leite, dias em lactação médio de 132 ± 108 , número de partições médio de $2,85 \pm 0,97$, o peso corporal médio foi 644 ± 58 kg e o escore de condição corporal (ECC) médio foi $3,12 \pm 0,38$ em escala de 1 a 5 (WILDMAN et al., 1982).

As duas ordenhas diárias eram realizadas sempre às 02h30 e 14h30 e a dieta era fornecida aos animais em forma de dieta total misturada, diariamente, às 08h30 e 14h30. Os animais foram mantidos em barracão do tipo *free-stall*, equipados com ventiladores e camas de colchão de borracha para o descanso.

4.5 TRATAMENTOS

Foram avaliados dois tratamentos (Controle e Precizyon), em que os animais receberam dietas isoproteicas e isoenergéticas (Tabela 1), elaboradas e balanceadas para atender os requerimentos nutricionais de acordo com o NRC *Dairy Cattle* (2001) e oriundas da mesma “batida” do vagão misturador, mas contendo ou não o aditivo enzimático (Tabela 2), o qual foi incluído individualmente e *top-dressed* à dieta dos animais, sendo:

- Controle (CON) - grupo de animais que não recebeu suplementação enzimática na dieta e para o qual foi fornecido apenas grão de milho moído, como placebo, na quantidade de 30 g/vaca/dia;
- Precizyon (ENZ) - grupo de animais que recebeu suplementação enzimática na dieta, sendo fornecidos 24 g/vaca/dia de milho grão moído, homogeneizados com o complexo enzimático Precizyon[®] X 200, na quantidade de 6 g/vaca/dia.

TABELA 1- COMPOSIÇÃO DA DIETA TOTAL¹ FORNECIDA AOS LOTES DO GRUPO CONTROLE E PRECIZYON, AO LONGO DE TODO O PERÍODO EXPERIMENTAL, EM PORCENTAGEM DA MATÉRIA SECA (%MS)

Ingredientes	Proporção MS (%)
Silagem de milho	37,28
Silagem pré-secada de aveia branca	7,95
Feno de aveia	3,34
Concentrado proteico-energético ²	34,62
Farelo de soja	6,26
Caroço de algodão	8,43
Bicarbonato de sódio	1,20
Mistura mineral-vitamínica ³	0,92

¹Níveis nutricionais estimados: 46,92 %MS; 1,50 Mcal/kg EL_{lac}; 71,36% NDT; 16,17% PB; 10,88% PDR; 36,42% FDN; 19,95% FDA; 23,85% FDNfe; 25,33% Amido; 4,36% EE; 0,82% Ca; 0,46% P;

²Ração comercial Capal B18 Alta Energia Peletizada (composição em %MS: milho grão moído (53,15%), farelo de soja (24,38%), farelo de trigo (14,04%), calcário (3,49%), farelo de glúten de milho (2,52%), sal comum (0,90%), premix mineral-vitamínico (0,38%), óxido de magnésio (0,34%), fosfato bicálcico (0,29%), adsorvente (0,28%), flor de enxofre (0,23%));

³Nutri Melk ADE, mistura mineral-vitamínica Capal (Níveis de garantia por quilograma de produto: Vitamina A (min): 100.000 UI/kg; Vitamina D3 (min): 25.000 UI/kg; Vitamina E (min): 850 UI/kg; Cálcio (min-max): 160-200 g/kg; Fósforo (min): 65 g/kg; Sódio (min): 100 g/kg; Magnésio (min): 30 g/kg; Enxofre (min): 20 g/kg; Manganês (min): 1.300 mg/kg; Zinco (min): 1.540 mg/kg; Cobre (min): 345 mg/kg; Iodo (min): 30 mg/kg; Selênio (min): 5.5 mg/kg; Cobalto (min): 20 mg/kg; Flúor (max): 650 mg/kg; Biotina (min): 135 mg/kg; Cobre orgânico (min): 170 mg/kg; Zinco orgânico (min): 860 mg/kg; Selênio orgânico (min): 5.5 mg/kg; Cromo orgânico (min): 6.5 mg/kg).

FONTE: O autor.

TABELA 2 - NÍVEIS DE GARANTIA DO COMPLEXO ENZIMÁTICO¹ PRECIZYON® X 200.

Enzima	Níveis de garantia ²
Amilase	40.000 u/g
Celulase	28.000 u/g
Xilanase	3.000 u/g
Protease	230 u/g

¹Produto da fermentação do fungo *Trichoderma longibrachiatum*;

²Nível mínimo de garantia por quilograma de produto.

FONTE: Quimtia (2017).

4.6 DELINEAMENTO

Os animais foram distribuídos em um delineamento em blocos casualizados, considerando-se produção média de leite nos três dias do período pré-experimental (CON: 39,1 e ENZ: 38,8 kg/d), estágio de lactação (CON: 131 e ENZ: 133 dias em leite) e ordem de parição (CON: 2,83 e ENZ: 2,87 partos) como critérios de blocagem, posteriormente alocando-se os tratamentos aleatoriamente aos grupos formados, sendo os animais identificados e marcados com corda de nylon de cores distintas no pescoço.

Os dados coletados foram tabulados pelo editor de planilhas Microsoft Excel 2016 e analisados a partir do software estatístico Statistical Analysis System® (SAS, v.9.4), sendo utilizado os procedimentos GLM e MIXED. No modelo estatístico foram incluídos os efeitos da covariável (valor médio da variável coletada nos três dias do período pré-experimental), bloco (47 blocos), tratamento (2 tratamentos, CON e ENZ), tempo (3 dias) e a interação tratamento*tempo. Para cada variável analisada, a melhor estrutura de covariância foi escolhida. Foi realizada a análise de variância (ANOVA), a 5% de probabilidade. Para as variáveis significativas, foi realizado o teste Tukey-Kramer, a 5% de probabilidade, para comparação das médias.

4.7 ANÁLISES

O efeito da suplementação do aditivo enzimático no desempenho produtivo dos animais foi analisado por meio da mensuração do volume de leite produzido, da composição do leite, do amido fecal e da digestibilidade da dieta.

No período pré-experimental, foram coletadas amostras de leite em frascos de 50 mL, com conservante bronopol, durante três dias seguidos, totalizando seis ordenhas. Nos últimos três dias de experimento, novamente foram coletadas amostras de leite durante seis ordenhas seguidas. Desta forma, ao final do experimento obteve-se um total de 12 ordenhas amostradas, por animal. A produção individual de cada animal foi mensurada e as amostras de leite foram enviadas à Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa (APCBRH), localizada no município de Curitiba-PR, onde foram analisados os parâmetros de composição do leite, como gordura, proteína, lactose, sólidos totais, caseína, nitrogênio ureico no leite (NUL) e extrato seco desengordurado (ESD) por meio da

metodologia de absorção infravermelho, utilizando-se o equipamento Bentley 2000® (Bentley Instruments) e contagem de células somáticas (CCS) por meio da metodologia de citometria de fluxo, a qual realiza medições de características celulares quando estas se encontram suspensas em meio líquido, utilizando-se o equipamento Somacount 300® (Bentley Instruments).

As produções de todos componentes do leite foram calculadas multiplicando-se o volume de leite pela sua respectiva composição obtidos na mesma ordenha. Desta forma, os resultados obtidos foram calculados por ponderação, não utilizando-se amostras compostas. Durante os 28 dias experimentais foram coletados os dados de produção leiteira individual dos animais, por meio do software de gerenciamento de rebanho DairyPlan C1® (GEA Farm Technologies).

Para determinação do amido fecal e da digestibilidade da dieta, foram realizadas amostragem de fezes duas vezes por semana. Para tanto, coletou-se de 15 a 20 sub-amostras de bolos fecais íntegros e recém-defecados no piso do curral que, posteriormente, foram homogeneizadas (FERRARETO et al., 2011). A partir do material fecal coletado, duas amostras compostas foram formadas, armazenadas em potes plásticos devidamente fechados e congelados. Estas amostras foram enviadas ao Laboratório de Análises Físico-Químicas da Fundação ABC, localizado no município de Castro-PR, para análise de amido fecal por metodologia enzimática.

Para mensurar a digestibilidade da dieta também foram realizadas amostragens da dieta a fim de se determinar o seu teor de Fibra em Detergente Neutro Indigestível (FDNi), que foi considerado como indicador interno e utilizado para o cálculo do coeficiente de digestibilidade. Para tal, amostras foram coletadas semanalmente, sendo 4 amostras de dieta por grupo e 8 amostras compostas de fezes por grupo, totalizando ao final do experimento, 8 amostragens de dieta total e 16 de fezes. Essas amostras foram enviadas para o Laboratório de Bromatologia e Nutrição de Ruminantes (LABRUMEN) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Rio Grande do Sul, onde foram pré-secadas em estufa a 55°C e, posteriormente secas a 105°C, moídas em moinho tipo Willey, alocadas em triplicata em sacos de poliéster (10 x 5 cm) com porosidade de 16 µm e incubadas por 288 horas no rúmen de bovino fistulado. Após o período de 12 dias, os sacos de poliéster foram retirados, lavados e se realizou a análise de Fibra em Detergente Neutro nos resíduos com a utilização de autoclave, a fim de se mensurar os componentes

indigestíveis da dieta. O coeficiente de digestibilidade foi calculado de acordo com o proposto por Huhtanen (1994) e conforme demonstrado:

$$\text{Coeficiente de digestibilidade} = 1 - (\% \text{ de FDNi da dieta} / \% \text{ de FDNi das fezes}) \times 100$$

Semanalmente os alimentos volumosos fornecidos aos animais (silagem de milho, silagem pré-secada de aveia branca e feno de aveia), bem como a dieta total misturada (TMR) de ambos os grupos experimentais, foram amostrados. Para tal, foram coletadas amostras de cada alimento volumoso e amostras da TMR recém-colocada no cocho, totalizando cinco amostras coletadas por semana. Os materiais foram armazenados em sacos plásticos, congelados e enviados ao Laboratório de Nutrição Animal da UFPR para análise química completa: matéria seca, proteína bruta, extrato etéreo, resíduo mineral, fibra em detergente neutro, fibra em detergente ácido, lignina, cálcio e fósforo (VAN SOEST, 1991; WILLES et al., 1998) (Tabela 3).

TABELA 3 - COMPOSIÇÃO MÉDIA DOS ALIMENTOS VOLUMOSOS E DIETA TOTAL¹ DOS GRUPOS CONTROLE (CON) E PRECIZYON (ENZ) AO LONGO DAS 4 SEMANAS EXPERIMENTAIS.

Parâmetro	FA	PS	SM	TMR CON	TMR ENZ
Matéria seca (%)	85,04	34,15	29,03	44,29	44,68
Proteína bruta (%)	7,77	10,20	7,94	16,38	15,72
Extrato etéreo (%)	1,78	2,81	3,11	4,56	4,58
Resíduo mineral (%)	5,94	5,89	3,56	6,64	6,77
FDN (%) ²	69,90	68,31	46,82	39,59	39,54
FDA (%) ²	40,45	35,97	24,99	19,98	20,20
Lignina (%)	4,74	3,07	2,56	2,25	2,31
Cálcio (%)	0,38	0,45	0,23	0,96	0,97
Fósforo (%)	0,22	0,31	0,20	0,41	0,42
NDT (%) ²	57,36	62,00	69,27	73,25	73,05
EL _L (Mcal/kg) ²	1,29	1,40	1,58	1,67	1,67

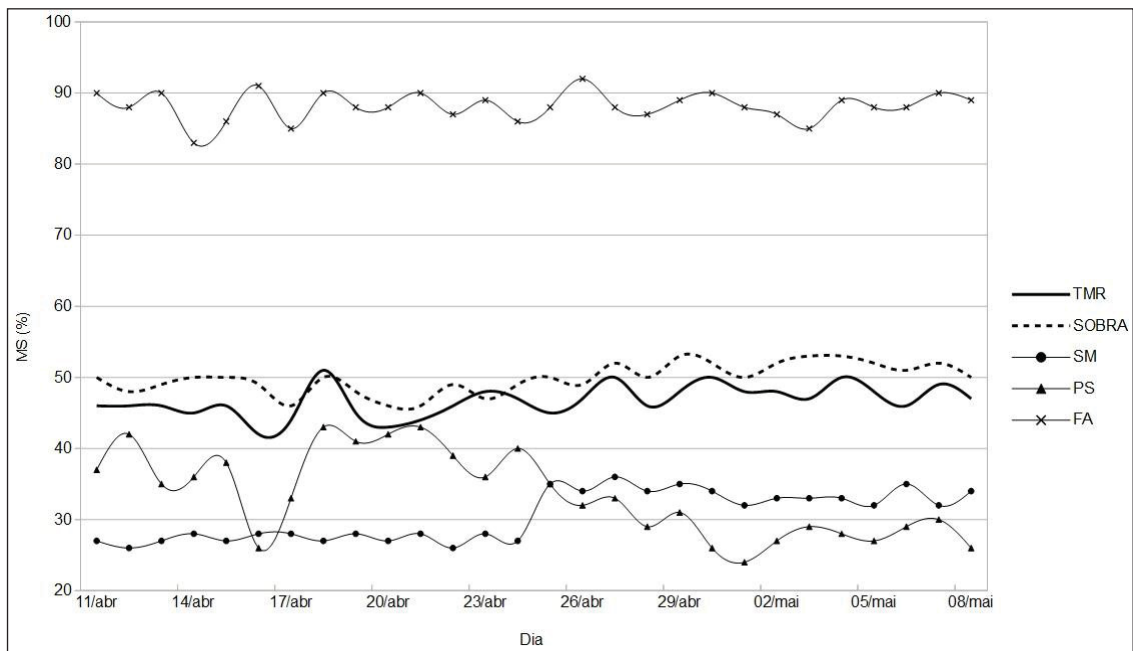
¹FA: feno de aveia; PS: pré-secado de aveia; SM: silagem de milho; TMR (Total Mixed Ration): dieta total misturada

²FDN: fibra em detergente neutro; FDA: fibra em detergente ácido; NDT: nutrientes digestíveis totais; EL_L: energia líquida de lactação

FONTE: O autor

A matéria seca dos alimentos volumosos e da TMR foi monitorada diariamente (Gráfico 1) com o auxílio de um equipamento medidor de umidade (*Koster*[®]).

GRÁFICO 1 - VARIAÇÃO DA MATÉRIA SECA (MS %) DOS ALIMENTOS VOLUMOSOS, DIETA TOTAL MISTURADA (TMR) E SOBRAS DA DIETA (FA: FENO DE AVEIA; PS: PRÉ-SECADO DE AVEIA; SM: SILAGEM DE MILHO; TMR (TOTAL MIXED RATION): DIETA TOTAL MISTURADA), AO LONGO DOS 28 DIAS EXPERIMENTAIS



FONTE: O autor.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

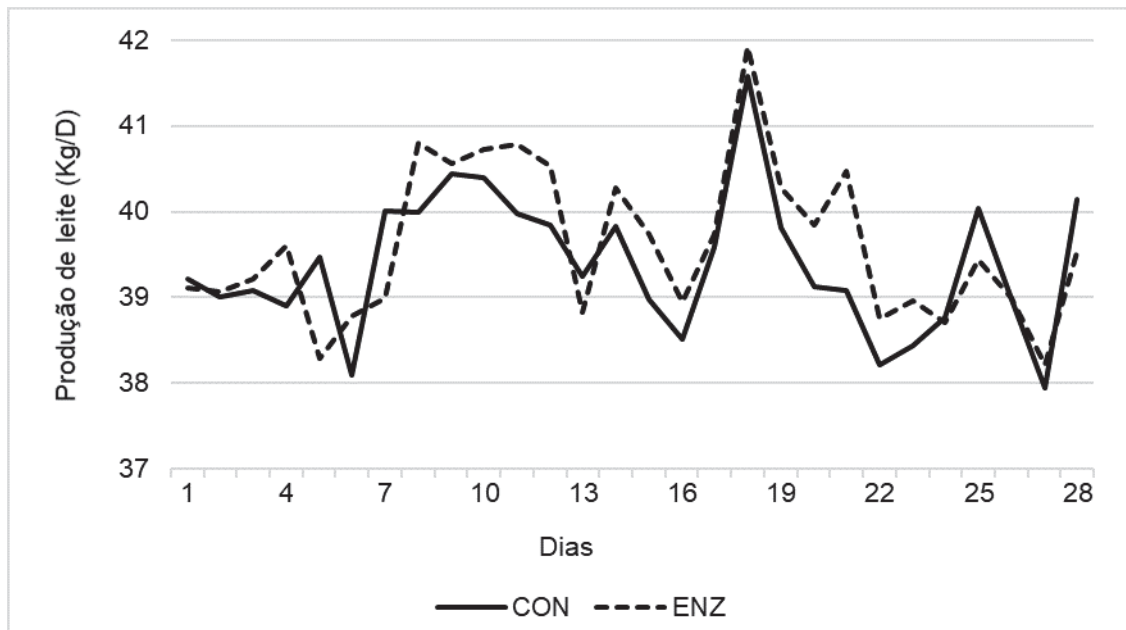
Os resultados obtidos a partir da utilização do complexo enzimático, contendo amilase em maior concentração, seguida por celulase e, finalmente, por concentrações menores de xilanase e protease, estão apresentados a seguir. A fim de facilitar a discussão, os temas foram divididos em: produção de leite, composição do leite, amido fecal e digestibilidade aparente da dieta.

5.1 PRODUÇÃO DE LEITE

A produção de leite média ao longo dos 28 dias experimentais não diferiu ($P=0,20$) entre as vacas do grupo Controle (CON) e Precizyon (ENZ), sendo que as médias ajustadas foram respectivamente de 39,29 e 39,71 kg/d, respectivamente. Logo, mesmo com a produção média de leite de 0,42 kg/d a mais no grupo ENZ, como visto no Gráfico 2, a análise estatística não apontou diferença entre os grupos para esta característica.

Na análise do parâmetro produção de leite corrigida para 3,5% de gordura, vacas suplementadas (39,66 kg/d) produziram numericamente 0,97 kg/d de leite a mais em relação ao controle (38,69 kg/d), mas novamente não houve ($P=0,34$) diferença entre os grupos. Da mesma forma, a produção de leite corrigida para energia foi semelhante ($P=0,23$) entre os grupos, sendo que as médias ajustadas foram de 26,26 Mcal/d para o CON, e 27,07 Mcal/d para o ENZ. Os valores das médias ajustadas de produção de leite, produção de leite corrigida (PLC) para 3,5% de gordura e energia, assim como porcentagens e produções de componentes do leite dos grupos CON e ENZ, estão descritos na Tabela 4.

GRÁFICO 2 - PRODUÇÃO MÉDIA DIÁRIA DE LEITE, EM KG DE LEITE POR DIA (KG/D), MENSURADA PARA OS GRUPOS CONTROLE (CON) E PRECIZYON (ENZ), AO LONGO DO PERÍODO EXPERIMENTAL (DE 11/04/2018 A 08/05/2018).



FONTE: O autor.

Alguns trabalhos avaliando os efeitos da suplementação de enzimas na dieta de vacas também não encontraram aumento na produção de leite (GENCOGLU et al., 2010; WEISS et al., 2011; NOZIÈRE et al., 2014). Contudo, McCarthy et al. (2013), Tóth & Tóthi (2016) e Andreatzi et al. (2018) observaram maior produção de leite em vacas suplementadas com amilase. Assim também, estudos realizados com suplementação de enzimas fibrolíticas constataram aumento na produção leiteira (RODE et al., 1999; YANG et al., 1999; LEWIS et al., 1999). Em contrapartida, outros trabalhos feitos com estas mesmas enzimas não obtiveram tal diferença nos resultados (ARRIOLA et al., 2011; HOLTSHAUSEN et al., 2011; CHUNG et al., 2012), demonstrando a heterogeneidade das respostas em produção de leite à suplementação com enzimas exógenas.

Os pesquisadores atribuem a maior produção de leite à ação da amilase, a qual atua diretamente na disponibilidade do amido em ambiente ruminal, e também à ação das enzimas fibrolíticas na degradação da fibra dietética, as quais disponibilizam maior quantidade de nutrientes, influenciando diretamente na utilização de energia destinada à produção de leite. Todavia, não houve efeito da suplementação de enzimas nos parâmetros de produção de leite dos animais do grupo ENZ avaliados neste experimento.

TABELA 4 - MÉDIAS AJUSTADAS E ERROS PADRÕES MÉDIOS (EPM) DA PRODUÇÃO DE LEITE E PRODUÇÕES DE LEITE CORRIGIDA (PLC) PARA 3,5% DE GORDURA E ENERGIA, TEORES (%) E PRODUÇÕES DE COMPONENTES DO LEITE (KG/D), ESCORE LINEAR DE CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS E NITROGÊNIO UREICO NO LEITE (NUL), DOS GRUPOS CONTROLE (CON) E PRECIZYON (ENZ).

Variáveis	CON	ENZ	EPM	P
Produção leite 28d (kg/dia)	39,29	39,71	0,23	0,20
Produção leite 3d (kg/dia)	38,97	38,96	0,73	0,99
PLC 3,5% gordura ¹ (kg/dia)	38,69	39,66	0,71	0,34
PLC energia ² (Mcal/dia)	26,26	27,07	0,46	0,23
Gordura (%)	3,54	3,68	0,06	0,14
Gordura (kg/d)	1,34	1,41	0,03	0,14
Proteína (%)	3,23	3,29	0,03	0,21
Proteína (kg/d)	1,23	1,27	0,02	0,18
Caseína (%)	2,53	2,57	0,02	0,22
Caseína (kg/d)	0,97	1,00	0,02	0,19
Lactose (%)	4,52	4,58	0,02	0,02
Lactose (kg/d)	1,76	1,79	0,04	0,57
Sólidos totais (%)	12,26	12,49	0,07	0,02
Sólidos totais (kg/d)	4,72	4,84	0,08	0,32
ESD ³ (%)	8,70	8,83	0,03	<0,01
ESD ³ (kg/d)	3,37	3,44	0,06	0,42
EL_CCS ⁴	2,85	2,96	0,18	0,69
NUL ⁵ (mg/dL)	13,31	14,52	0,27	<0,01

¹PLC 3,5% gordura = (0,4255 x kg leite) + [16,425 x (% gordura/100) x kg leite] (GAINES, 1928)

²PLC energia = [(0,0929 x % gordura) + (0,0547 x % proteína) + (0,0395 x % lactose)] x kg leite (TYRREL & REID, 1965)

³ESD = extrato seco desengordurado

⁴EL_CCS = escore linear de contagem de células somáticas (log₂ (CCS/100) + 3) (SHOOK & SHUTZ, 1994)

⁵NUL = nitrogênio ureico no leite

FONTE: O autor.

5.2 GORDURA

Não foram encontradas diferenças significativas para os teores de gordura (3,54% CON vs. 3,68% ENZ; $P=0,14$) e produção total de gordura (1,34 kg/d CON vs. 1,41 kg/d ENZ; $P=0,14$) nos grupos Controle e Precizyon. O parâmetro porcentagem de gordura, mesmo não apresentando diferença entre os grupos, pode ter influenciado o teor de sólidos totais do leite do grupo ENZ ($P=0,02$).

Grande parte dos trabalhos encontrados na literatura com suplementação de enzimas para vacas leiteiras, não obtiveram diferenças nos teores de gordura

(BERNARD et al., 2010; NOZIÈRE et al., 2014). Já para a quantidade total de gordura produzida, muitos trabalhos citam haver aumento deste parâmetro e atribuem isto ao acréscimo na produção de leite advindo da suplementação enzimática (ARRIOLA et al., 2017).

De acordo com Klingerman et al. (2009), a maior digestibilidade ruminal do amido proporcionado pela adição de amilase, poderia reduzir o pH ruminal, resultando em menores teores de gordura no leite por conta da teoria hoje aceita da biohidrogenação parcial dos ácidos graxos no rúmen (BAUMAN & GRIINARI, 2003). Gencoglu et al. (2010) não encontraram diferenças nos teores de gordura com a suplementação de amilase, e segundo os autores isso se deve, contudo, ao aumento na produção de acetato e butirato no rúmen em decorrência das maltodextrinas produzidas pela hidrólise do amido dietético, as quais seriam potencialmente utilizadas como fonte de energia para bactérias fibrolíticas endógenas, em uma alimentação cruzada.

5.3 PROTEÍNA

As médias para teores de proteína foram de 3,23 e 3,29% ($P=0,21$), respectivamente para os grupos CON e ENZ, e as médias de quilogramas de proteína para estes grupos foram de 1,23 e 1,27 kg/d ($P=0,18$), respectivamente, não havendo diferença entre os grupos, para ambos os parâmetros. A adição de amilase em dietas com níveis normais de amido não alterou o teor de proteína nos trabalhos de Tricarico et al. (2005) e Klingerman et al. (2009), mas Gencoglu et al. (2010) encontraram diferença significativa nos teores de proteína, justificando este efeito a um aumento na produção de proteína microbiana, devido a maior disponibilidade de energia, em função do incremento na digestibilidade do amido proporcionada pela amilase em ambiente ruminal.

5.4 CASEÍNA

Os teores e quantidades totais de caseína não diferiram entre os grupos CON e ENZ, sendo observadas as médias de 2,53 e 2,57% ($P=0,22$) e de 0,97 e 1,00 kg/d ($P=0,19$), respectivamente. A caseína corresponde a aproximadamente 77-

78% da proteína do leite bovino (LINN, 1988) e, como não houve variações significativas na proteína do leite, este parâmetro também não foi alterado.

5.5 LACTOSE

Vacas suplementadas com enzimas exógenas (ENZ) produziram leite com maior ($P=0,02$) teor de lactose do que vacas do grupo controle (CON); 4,58 e 4,52%, respectivamente. Já as médias para quilogramas de lactose, 1,79 e 1,76 kg/d, respectivamente para os grupos ENZ e CON, foram similares ($P=0,57$) entre os grupos. A lactose está altamente correlacionada à produção de leite, pois a quantidade de água que adentra a glândula mamária está diretamente ligada à quantidade de lactose sintetizada. Apesar de o volume de leite não ter aumentado significativamente com a suplementação de enzimas, o teor de lactose foi maior no grupo tratado.

O aumento no teor de lactose das vacas tratadas pode estar associado com aumento na concentração de glicose sanguínea, e isto pode ser resultado de maior fermentação ruminal do amido e absorção de propionato para a gliconeogênese no fígado (ANDREAZZI et al., 2018). Segundo Barry et al. (1964), a glicose sanguínea é o principal precursor da lactose na glândula mamária. Porém, em estudos realizados por McCarthy et al. (2013), Gencoglu et al. (2010) e Ferraretto et al. (2011) não foram encontradas diferenças nos teores e quantidades de lactose no leite de animais suplementados com amilase.

Ainda, a hidrólise do amido pode ter contribuído para diminuir a taxa acetato:propionato, pois o propionato é o ácido graxo volátil (AGV) formado em maior quantidade pela fermentação microbiana de carboidratos no rúmen, e o principal precursor da gliconeogênese em ruminantes. Segundo Aschenbach et al. (2010), a produção e absorção de propionato são altas após a alimentação e em períodos de alta ingestão de energia. Logo, a fermentação de elevados níveis de amido, como os vistos em dietas com alto concentrado, leva a um aumento na proporção de propionato (MILLS et al., 1999). Portanto, a presença do amido em maior quantidade ocasiona decréscimo do pH ruminal, devido a este aumento na produção de propionato pelos microrganismos ruminais, e sendo este o único precursor gliconeogênico dentre os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) produzidos no rúmen (KOZLOSKI, 2011).

Ainda em relação à ação da amilase na degradação do amido dietético, o local de digestão do amido determina a forma do combustível metabólico absorvido, seja ele na forma de glicose ou propionato, o que irá influenciar diretamente a ingestão de matéria seca (IMS), uma vez que o propionato é mais hipofágico quando comparado à glicose. Outros estudos, porém, observaram pequena ou nenhuma influência da amilase na IMS. Infelizmente no presente trabalho, conduzido num grande rebanho comercial, a estimativa do consumo de MS individual dos animais experimentais era impossível. Assim, o aumento da glicose sanguínea pode se dar pela melhora na disponibilidade de nutrientes devido ao aumento na digestibilidade dos alimentos ou da capacidade de absorção ruminal (DEFRAIN et al., 2005).

Em estudo feito por Eun e Beauchemin (2005), o teor de lactose do leite apresentou tendência de aumento nas vacas alimentadas com proteases e isto é presumivelmente o resultado do aumento da digestão da matéria orgânica, uma vez que, embora o produto enzimático utilizado no estudo não contivesse atividade fibrolítica mensurável, houve aumento da digestibilidade da fibra em detergente neutro e ácido da dieta das vacas avaliadas. Uma possibilidade para que isso tenha ocorrido, é que as proteases contribuíram na remoção de proteínas estruturais da parede celular e permitiram um acesso microbiano mais extenso à fibra degradável (Nsereko et al., 2000; Colombatto et al., 2003a). Embora normalmente associado à produção de acetato e butirato, o aumento da fibra digestível no rúmen também pode proporcionar aumento da liberação de precursores glicogênicos para o fígado e, eventualmente, melhorar a disponibilidade dos carboidratos dietéticos.

5.6 SÓLIDOS TOTAIS

O teor de sólidos totais foi de 12,26% para o grupo CON e de 12,49% ($P=0,02$) para o grupo ENZ; já a quantidade total foi de 4,72 kg/d e de 4,84 kg/d, respectivamente, para os mesmos grupos ($P=0,32$). A água corresponde por 87,5% da composição do leite e, retirando-a, todos os outros componentes restantes (gordura, proteína, lactose e minerais) constituem a fração denominada sólidos totais (GRANT, 1997).

Os animais suplementados obtiveram teores e quantidades numericamente superiores (significativamente ou não) para gordura, proteína e lactose. Portanto, a maior porcentagem de sólidos totais no grupo ENZ, em relação aos animais do

grupo CON, se deve ao maior teor de lactose, bem como aos numericamente maiores teores de gordura e proteína. Por fim, esta diferença de 0,23% entre os lotes experimentais, além de estatisticamente significativa, não deveria ser ignorada ou considerada irrelevante, particularmente em rebanhos com sistema de pagamento do leite por qualidade.

5.7 EXTRATO SECO DESENGORDURADO (ESD)

O teor de extrato seco desengordurado foi maior no grupo ENZ ($P < 0,01$), sendo em média 8,83%, enquanto que para o grupo CON o valor médio foi de 8,70%. A fração do leite que excetua água e gordura é denominada extrato seco desengordurado (ESD). Alterações nos teores de ESD são primariamente ligadas a mudanças nos teores de proteína e, ocasionalmente, nos teores de lactose do leite.

A restrição de energia a níveis inferiores às exigências recomendadas, causam grande redução no ESD (HUBER et al., 1966). Em contrapartida, o fornecimento de energia extra às vacas de alta produção, desde que no início da lactação, pode aumentar o ESD em cerca de 0,2%, pois a proteína no leite tende a aumentar em dietas com maior disponibilidade de energia (HARRIS & BACHMAN, 1988). No presente estudo, como o teor de proteína do leite não apresentou diferença entre os tratamentos, pode-se atribuir o maior teor de ESD no grupo ENZ principalmente ao aumento do teor de lactose do leite.

5.8 ESCORE LINEAR DE CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS

O escore linear de contagem de células somáticas não foi alterado com a suplementação enzimática, sendo que as médias ajustadas para o grupo CON e ENZ foram de 2,85 e de 2,96 ($P = 0,69$), respectivamente. A média geométrica obtida com o uso da escala logarítmica para CCS (variando de 0 a 9) tem por finalidade aumentar a detecção de diferenças estatísticas entre grupos de vacas e diminuir a influência de valores muito baixos ou muito altos que interferem na média aritmética, pois o escore linear apresenta distribuição normal, permitindo uma comparação mais consistente entre grupos e rebanhos (CARLÉN et al., 2004).

A maioria das células somáticas são glóbulos brancos, como macrófagos e neutrófilos, que agem contra infecções presentes no úbere e no reparo de tecidos

danificados (BRADLEY & GREEN, 2005). Tais células podem variar grandemente de acordo com o estágio de lactação e ordem de parição, independentemente de os animais estarem infectados ou não (SHARMA et al., 2011).

Tewoldebrhan et al. (2017), utilizando uma enzima comercial com ação fibrolítica, encontraram redução na contagem de células somáticas no grupo tratado com mananase. Os autores relacionaram este efeito à maior ação de moléculas intermediárias, liberadas por macrófagos e neutrófilos, que se beneficiam dos açúcares oriundos da quebra da manose como substrato energético, resultando em melhora na resposta imunitária dos animais infectados. Todavia, os resultados deste presente estudo vão ao encontro de outros trabalhos realizados com suplementação de enzimas fibrolíticas (ARRIOLA et al., 2011; ROMERO et al., 2016) ou amilolíticas (NOZIÈRE et al., 2014; VARGAS-RODRIGUEZ et al., 2014), nos quais não foram encontrados efeitos da suplementação enzimática na contagem de células somáticas. Por último, cabe destacar as baixas contagens de células somáticas de ambos os grupos experimentais, mostrando quão prioritário e efetivo é o manejo sanitário da glândula mamária neste rebanho.

5.9 NITROGÊNIO UREICO DO LEITE

O nitrogênio ureico do leite (NUL) do grupo CON foi de 13,31 mg/dL e, pelo grupo ENZ, foi de 14,52 mg/dL, uma diferença considerada significativa ($P < 0,01$). Segundo Kauffman et al. (2001), os valores de NUL considerados ideais estão entre 10 e 14 mg/dL, mas com valores de até 16 mg/dL sendo comumente encontrados em rebanhos leiteiros de alta produção. Logo, os animais do presente estudo estão em uma faixa considerada normal para rebanhos especializados. Segundo Baker et al. (1993), o NUL pode ser utilizado como monitor de eficiência na utilização do nitrogênio dietético pelas vacas leiteiras. O NUL pode ser afetado não apenas por fatores nutricionais, como teor de proteína bruta na dieta, equilíbrio entre proteína e energia dietética, quantidade de proteína degradável no rúmen, mas também por fatores não nutricionais como dias em leite (DEL), ordem de parição e estação do ano (DOSKA et al., 2012; FATEHI et al., 2012).

Fatehi et al. (2012) encontraram os níveis mais baixos de NUL até o quarto mês em lactação, atingindo o pico entre o quinto e sexto mês, sendo atribuída esta alta ao incremento na ingestão de matéria seca e, conseqüentemente, ao excesso

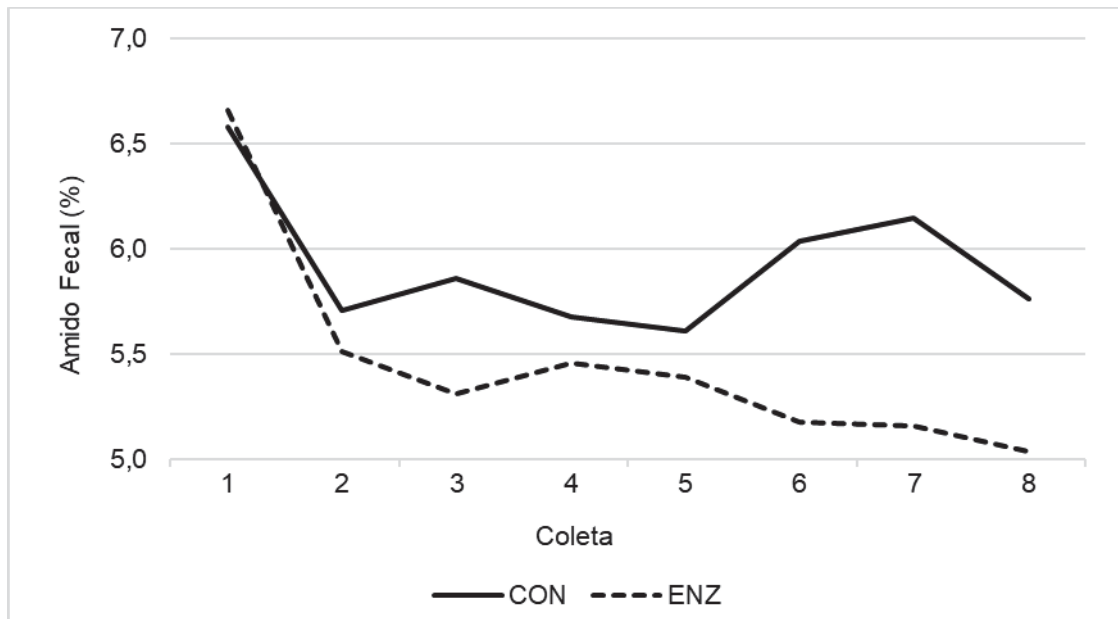
de proteína na dieta consumida pelos animais nesta fase da lactação. Salienta-se que os animais dos grupos CON e ENZ utilizados no presente estudo, estavam com 132 dias em lactação no início do período experimental, em média. Em relação a variação do NUL em função da estação do ano, Fatehi et al. (2012) encontraram que a concentração desta variável foi positivamente correlacionada às temperaturas médias mensais, ao passo que Doska et al. (2012) encontraram maiores valores de NUL durante os meses mais frios, atribuindo isto ao fato de haver maior concentração de proteína nos volumosos utilizados para alimentação de rebanhos na região dos Campos Gerais, no Estado do Paraná.

Portanto, apesar dos animais do grupo ENZ terem apresentado maiores concentrações de NUL, quando comparados aos animais do grupo CON, os valores para esta variável ainda estão dentro dos considerados normais para vacas de alta produção, e podem estar relacionados ao consumo ligeiramente maior de proteína na dieta.

5.10 AMIDO FECAL

Os animais suplementados com aditivo enzimático tiveram menor ($P=0,03$) excreção de amido fecal, em média 5,46%, enquanto que o grupo CON apresentou excreção média de 5,92% de amido fecal, como exposto no Gráfico 3. Tal efeito é atribuído à atuação da amilase e, portanto, está de acordo com o resultado esperado, uma vez que a amilase corresponde à enzima de maior concentração no complexo enzimático fornecido aos animais, neste estudo.

GRÁFICO 3 - TEOR DE AMIDO FECAL MÉDIO (%) OBTIDO PARA OS GRUPOS CONTROLE (CON) E PRECIZYON (ENZ) AO LONGO DO PERÍODO EXPERIMENTAL (COLETAS DE 1 A 8).



FONTE: O autor

Zinn et al. (2007) encontraram uma alta correlação ($R^2=0,96$) entre o amido presente nas fezes e a digestão do amido no trato total de bovinos de corte confinados e sugerem que o amido fecal pode explicar 96% da variação da digestibilidade no trato total. Da mesma forma, essa alta correlação também foi encontrada em estudo realizado por Fredin et al. (2014), em que R^2 foi de 0,94, obtendo uma variação de 0 a 5% de amido fecal, com média de 3%. Para Firkins et al. (2001), a digestibilidade do amido no trato total pode oscilar entre 70 e 100%, variando conforme o local onde ocorre a digestão, podendo ser no rúmen, intestino delgado ou intestino grosso.

Portanto, a digestão do amido está intimamente relacionada à quantidade de amido presente nas fezes, podendo ser utilizado diretamente como um indicador de digestibilidade do amido no trato total de vacas leiteiras (FIRKINS et al., 2001). Ainda, conforme Corona et al. (2005), como os métodos de processamento do grão de milho têm por finalidade aumentar a digestibilidade do amido dietético, a mensuração do amido fecal é uma ferramenta confiável para avaliar os efeitos do processamento do milho sobre a digestão do amido.

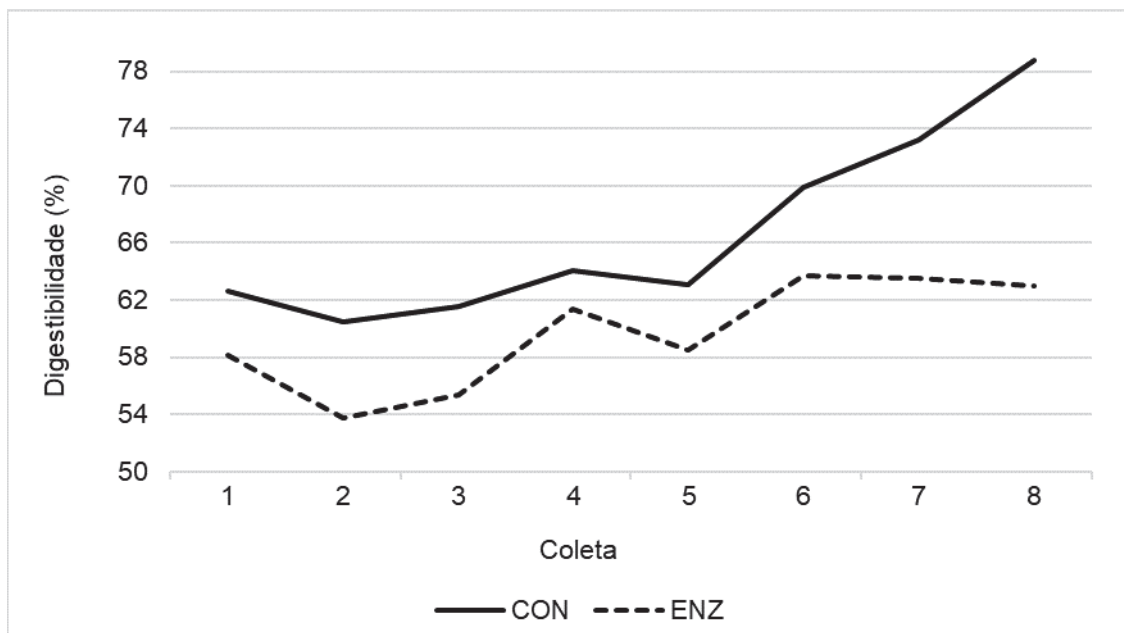
Neste contexto, de acordo com Ferguson (2003), pode-se afirmar que a presença de 5% de amido nas fezes indica que, pelo menos, 90% da digestão ocorreu no trato total. Para vacas de alta produção, o valor limite deste indicador é

de 5%, sendo considerado ótimo quando varia de 3% a menos. Para cada 1% de diminuição no amido fecal, estima-se um incremento de 450 ml na produção leiteira. Sendo assim, mesmo com os valores de amido fecal terem sido ligeiramente superiores a 5%, variando entre 5,46% para o grupo ENZ, e 5,92% para o grupo CON, pode-se afirmar que a digestão do amido no trato total dos animais suplementados foi satisfatória.

5.11 DIGESTIBILIDADE

O coeficiente de digestibilidade da dieta foi maior ($P=0,02$) para o grupo CON (66,7%), em relação ao grupo ENZ (59,7%), como pode ser observado no Gráfico 4. A princípio, este resultado parece controverso, uma vez que os animais suplementados tiveram uma menor excreção de amido fecal. Uma possível explicação pode estar no fato de a ação da amilase ter sido intensa, havendo uma queda do pH ruminal e, conseqüentemente, afetando a digestibilidade da dieta como um todo. Segundo Simas et al. (1997), a digestibilidade da FDN e da FDA é diminuída conforme ocorre a queda do pH ruminal.

GRÁFICO 4 - COEFICIENTE MÉDIO DE DIGESTIBILIDADE (%) DOS GRUPOS CONTROLE (CON) E PRECIZYON (ENZ), AO LONGO DO PERÍODO EXPERIMENTAL (COLETAS DE 1 A 8).



FONTE: O autor

Em experimento realizado por Weiss et al. (2011), avaliando a adição de amilase com milho moído na dieta de vacas leiteiras, a enzima suplementada não teve efeito sobre a digestibilidade da dieta. Já em estudo realizado por McCarthy et al. (2011), no qual os grupos foram alimentados com dietas com baixo teor de amido (23% da MS), o grupo suplementado com amilase teve maior digestibilidade da dieta e os autores atribuíram isto ao fato da amilase ter estimulado a alimentação cruzada no rúmen, uma vez que os microrganismos não-amilolíticos foram beneficiados pelo substrato energético oriundo da hidrólise do amido. Resultado semelhante foi obtido por Gencoglu et al. (2010), que também encontraram aumento na digestibilidade da dieta em animais tratados com amilase. Arriola et al. (2011), testaram o efeito de um produto enzimático fibrolítico, composto por celulase e xilanase, na alimentação de vacas em lactação e encontraram um efeito significativo na digestibilidade da dieta. Em contrapartida, Bernard et al. (2010), não encontraram efeitos da suplementação de celulase na ingestão de matéria seca, produção de leite e digestibilidade da dieta.

Os resultados encontrados na literatura ainda são muito controversos a respeito da utilização de marcadores internos para estimativa da digestibilidade da dieta, pois estimativas não muito acuradas podem levar a resultados subestimados de digestibilidade, sugerindo perdas do marcador através do trato digestório do animal (HUHTANEN, 1994). Outros fatores como tempo de incubação ruminal, porosidade dos sacos utilizados para incubação e estrutura da fração fibrosa do volumoso utilizado, podem afetar a mensuração da digestibilidade da dieta por meio de marcadores internos (BERCHIELLI et al., 2005). Segundo Lippke et al. (1986), os maiores problemas, neste sentido, são os erros de metodologia de análise, ocasionando heterogeneidade dos dados obtidos pela falta de padronização no método de determinação.

O tempo de incubação ruminal, entre os estudos encontrados na literatura, tem variado de 72 a 288 horas. Em estudo feito por Huhtanen (1994), comparando componentes indigestíveis da fração fibrosa como marcadores internos, a FDNi (FDN indigestível) indicou a melhor estimativa de digestibilidade, sendo que os teores de FDNi encontrados em incubação *in vitro* por 96 horas foram maiores em relação àqueles encontrados no período de 288 horas. Desta forma, a FDNi determinada por incubação ruminal de 288 horas torna-se o indicador interno mais preciso para se estimar a digestibilidade da dieta. A utilização de sacos de náilon com porosidade de 41 μm resultam em baixa recuperação fecal do marcador em

relação aos sacos com 6 μm de porosidade, provavelmente por causa da maior perda de partículas oriundas das amostras de alimento e fezes. Por isso, a fim de se evitar perdas, amostras de alimentos devem ser picadas grosseiramente e amostras de fezes não devem ser moídas (HUHTANEN, 1994).

Em estudo realizado por Morgavi et al. (2000), os pesquisadores relataram que baixas concentrações de enzimas de *Trichoderma longibrachiatum* aumentaram a adesão da bactéria *Fibrobacter succinogenes* à silagem de milho e ao feno de alfafa, porém altas concentrações da enzima diminuíram a adesão da bactéria ao substrato. Uma possível explicação para tal efeito, é que as enzimas exógenas podem competir com os microrganismos ruminais pelos sítios ativos da celulose, disponíveis nos alimentos. Tanaka et al. (1988) sugeriram que os efeitos negativos dos altos níveis de celulase podem ser devidos ao baixo peso molecular destas enzimas, que irão se deslocar para poros pequenos na superfície da fibra, tornando-os inacessíveis a moléculas maiores de enzima, reduzindo a ação como um todo das enzimas do complexo celulase.

Em resumo, pelo exposto acima, pode-se hipotetizar alguns cenários que poderiam justificar a menor digestibilidade da dieta obtida no grupo tratado com enzimas (ENZ), sendo: 1) intensa ação da amilase, havendo queda do pH ruminal e, conseqüentemente, menor digestibilidade da porção fibrosa da dieta; 2) perdas do marcador ao longo do trato digestório do animal, ocasionando subestimativa da digestibilidade 3) competição das enzimas exógenas com os microrganismos ruminais, devido à dosagem inadequada.

6 CONCLUSÃO

O complexo enzimático Precizyon® X 200, composto por amilase, celulase, xilanase e protease, não alterou a produção de leite dos animais suplementados durante o período experimental. Contudo, houve um aumento nos teores de lactose, sólidos totais, extrato seco desengordurado e nitrogênio ureico no leite dos animais neste grupo.

Como já esperado, a amilase teve efeito direto na digestibilidade do amido, refletindo no menor teor de amido fecal dos animais suplementados. Por outro lado, e por razões ainda não identificadas, os animais do grupo Controle tiveram maior coeficiente de digestibilidade. Com os resultados obtidos neste estudo, fica claro que a utilização de enzimas na alimentação de vacas leiteiras ainda é um tanto quanto complexa, uma vez que as interferências causadas nos parâmetros produtivos são multifatoriais, necessitando de mais estudos para melhor ser elucidada.

REFERÊNCIAS

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

ADESOGAN, A.T. Improving forage quality and animal performance with fibrolytic enzymes. **Proceedings... Florida Ruminant Nutrition Symposium**. University of Florida, Gainesville, v.91, p.109, 2005.

ANDREAZZI, A. S. R., M. N. PEREIRA, R. B. REIS, R. A. N. PEREIRA, N. N. MORAIS JÚNIOR, T. S. ACEDO, R. G. HERMES, AND C. S. CORTINHAS. Effect of exogenous amylase on lactation performance of dairy cows fed a high-starch diet. **Journal of Dairy Science**. 101:7199–7207. 2018.

ANNISON, G. The use of enzymes in ruminant diets. In: Biotechnology in the Feed Industry, **Proceedings... 13th Annual Symposium**. (T. P. Lyons and K. A. Jacques, eds.). Nottingham University Press, Nottingham, Leics., UK. p.115, 1997.

ARRIOLA, K.G., KIM, S.C., STAPLES, C.R. AND ADESOGAN, A.T. Effect of fibrolytic enzyme application to low- and high-concentrate diets on the performance of lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.94, p.832-841, 2011.

ASCHENBACH, J.R., KRISTENSEN, N.B., DONKIN, S.S., HAMMON, H.M., PENNER, G.B. Gluconeogenesis in dairy cows: the secret of making sweet milk from sour dough. **IUBMB Life**, v.62, p.869–877, 2010.

BAKER, L. D., FERGUSON, F. D. AND CHALUPA W. Responses in urea and true protein of milk to different protein feeding schemes for dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.78, p.2424-2434, 1995.

BARRY, R. J. C., DIKSTEIN, S., MATTHEWS, J., SMYTH, D. H. & WRIGHT, E. M. Electrical potentials associated with intestinal sugar transfer. **Journal of Physiology**, v.171, p.316-338, 1964.

BAUMAN, D.E. & J.M. GRIINARI. Nutritional regulation of milk fat synthesis. **Annual Review of Nutrition**. p.203-227. 2003.

BEAUCHEMIN K.A., COLOMBATTO D., MORGAVI D.P., YANG W.Z. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve animal feed utilization by ruminants. **Journal of Animal Science**. v.81(E.Suppl.2), p. E37-E47, 2003.

BEAUCHEMIN, K. A., D. COLOMBATTO, D. P MORGAVI. A rationale for the development of feed enzyme products for ruminants. **Canadian Journal of Animal Science**. v.84, p.23-36, 2004.

BEAUCHEMIN, K. A., L. M. RODE, M. MAEKAWA, D. P. MORGAVI, AND R. KAMPEN. Evaluation of a non-starch polysaccharidase feed enzyme in dairy cow diets. **Journal of Dairy Science**. v.83, p.543-553, 2000.

BERCHIELLI, T.T.; OLIVEIRA, S.G.; CARRILHO, E.N.V.M. et al. Comparação de marcadores para estimativas de produção fecal e de fluxo de digesta em bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.3, p.987-996, 2005.

BERNARD, J. K., J. J. CASTRO, N. A. MULLIS, A. T. ADESOGAN, J. W. WEST, AND G. MORANTES. Effect of feeding alfalfa hay or Tifton 85 bermudagrass haylage with or without a cellulase enzyme on performance of Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v.93, p.5280-5285, 2010.

BHAT, M.K., HAZELWOOD, G.P. Enzymology and other characteristics of cellulases and xylanases. **Enzymes in Farm Animal Nutrition**. CABI Publishing; Oxon, UK: 2001.

BOWMAN, G. R., K. A. BEAUCHEMIN, AND J. A. SHELFORD. Fibrolytic enzymes and parity effects on feeding behavior, salivation, and ruminal pH of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v.86, p.565-575, 2003.

BOWMAN, G.R., BEAUCHEMIN, K.A., SHELFORD, J. The proportion of the diet to which fibrolytic enzymes are added affects nutrient digestion by lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v.85, p.3420-3429, 2002.

BRADLEY, A. J. AND GREEN, M. J. Use and interpretation of somatic cell count data in dairy cows. **In Practice**. 27. p.310-315. 2005.

BUCHOLTZ, H. Feeding practices of high-producing herds: What can we learn? **Proceedings... Western Canadian Dairy Seminar**. Red Deer, Alberta, Canada, v.18, p.157-177, 2006.

CARLÉN, E., STRANDBERG, E., ROTH, A. Genetic parameters for clinical mastitis, somatic cell score, and production in the first three lactations of Swedish Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v.87, p.3062–3070, 2004.

CHUNG Y.H., ZHOU M., HOLTSHAUSEN L., ALEXANDER T.W., MCALLISTER T.A., GUAN L.L., OBA M., BEAUCHEMIN K.A. A fibrolytic enzyme additive for lactating Holstein cow diets: ruminal fermentation, rumen microbial populations, and enteric methane emissions. **Journal of Dairy Science**. v.95, p.1419-1427, 2012.

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

CORONA, L.; RODRIGUEZ, S.; WARE, R.A.; ZINN, R.A. Comparative effects of whole, ground, dry-rolled and steam-flaked corn on digestion and growth performance in feedlot cattle. **Professional Animal Scientist**, v.21, p.200-206, 2005.

DEFRAIN, J. M., HIPPEN A. R., KALSCHEUR K. F., TRICARICO J. M. Feeding alpha-amylase improves the glycemic status and performance of transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.88, p.4405-4413, 2005.

DILORENZO, N., D. R. SMITH, M. J. QUINN, M. L. MAY, C. H. PONCE, W. STEINBERG, M. A. ENGSTROM, AND M. L. GALYEAN. Effects of grain processing and supplementation with exogenous amylase on nutrient digestibility in feedlot diets. **Livestock Science**. v.137, p.178-184, 2011.

DOSKA, M.C., SILVA, D.F.F., HORST, J.A., VALLOTO, A.A., ROSSI, P. AND DE ALMEIDA, R. Sources of variation in milk urea nitrogen in Paraná dairy cows. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.41, p.692–697, 2012.

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.

FATEHI, F., ZALI, A., HONARVAR, M., DEHGHAN-BANADAKY, M., YOUNG, A.J., GHIASVAND, M., EFEKHARI, M. Review of the relationship between milk urea nitrogen and days in milk, parity, and monthly temperature mean in Iranian Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v.95, p.5156-5163, 2012.

FERGUSON, J. D. Monitoring feeding programs on dairy farms. **Proceedings of Nutrition and Management of Dairy Cattle**. Consorzio Ricerca Fileria Lattiero-Casearia Regione Siciliana. p.3-7, 2003.

FERRARETTO, L. F., R. D. SHAVER, M. ESPINEIRA, H. GENCOGLU, AND S. J. BERTICS. Influence of a reduced-starch diet with or without exogenous amylase on lactation performance by dairy cows. **Journal of Dairy Science**. p.1490-1499, 2011.

FIRKINS, J.L., M.L. EASTRIDGE, N.R. ST-PIERRE, S.M. NOFTSGER. Effects of grain variability and processing on starch utilization by lactating dairy cattle. **Journal of Animal Science**. v.79 (E. Suppl.), p.E218-E238, 2001.

FREDIN, S. M., L. F. FERRARETTO, M. S. AKINS, P. C. HOFFMAN, AND R. D. SHAVER. Fecal starch as an indicator of total-tract starch digestibility by lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.97, p.1862-1871, 2014.

GAINES, W.L. The energy basis of measuring milk yield in dairy cows. **Illinois Agricultural Experiment Station Bulletin**, v.308, 40p, 1928.

GENCOGLU, H., SHAVER, R. D., STEINBERG, W., ENSINK, J., FERRARETTO, L. F., BERTICS, S. J., AKINS, M. S. Effect of feeding a reduced-starch diet with or without amylase addition on lactation performance in dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v.93, p.723-732, 2010.

GRANT, R. J. Feeding to maximize milk solids. Historical Materials from University of Nebraska-Lincoln Extension. 1997. Disponível em: <http://digitalcommons.unl.edu/extensionhist/457>. Acesso em: 10/01/2019.

HARRIS Jr., B.; BACHAMAN, K.C. Nutritional and management factors affecting solid-non-fat, acidity and freezing point of milk. Gainesville, **Institute of Food and Agricultural Sciences**, 1988.

HARRISON, G. A., J. M. TRICARICO. Effects of an *Aspergillus oryzae* extract containing α -amylase activity on lactational performance in commercial dairy herds. **The Professional Animal Scientist**. v.23, p.291-294, 2007.

HOLSTSHAUSEN, L., Y.H. CHUNG, H. GERARDO CUERVO, M. OBA, K. A. BEAUCHEMIN. Improved milk production efficiency in early lactation dairy cattle with dietary addition of a developmental fibrolytic enzyme additive. **Journal of Dairy Science**. v.94, p.899-907, 2011.

HRISTOV, A. N., RODE, L. M., BEAUCHEMIN, K. A., WUERFEL, R. L. Effect of a commercial enzyme preparation on barley silage *in vitro* and *in sacco* dry matter degradability. **Proceedings... Western Section, American Society of Animal Science**, v.47, p.282-284, 1996.

HUBER, J. T., BOMAN, B. L. Nutritional factors affecting the solids-not-fat content of milk. **Journal of Dairy Science**, 1966.

HUHTANEN, P.; KAUSTELL, K.; JAAKKOLA, S. The use of internal markers to predict total digestibility and duodenal flow of nutrients in cattle given six different diets. **Animal Feed Science and Technology**, v.48, p.211-227, 1994.

HUNTINGTON, G.B.; HARMON, D.L.; RICHARDS, C.J. Sites, rates, and limits of starch digestion and glucose metabolism in growing cattle. **Journal of Animal Science**. v.84, E14-E24, 2006.

IAPAR – Instituto Agronômico do Paraná. **Boletim Técnico**, v.23, 2017.

KAISER, R., SHAVER, R. Benchmarking high producing herds. **Proceedings... Western Canadian Dairy Seminar**. Red Deer, Alberta, Canada, v.18, p.179-190, 2006.

KAUFFMAN, A.J.; St-PIERRE, N.R. The relationship of milk urea nitrogen to urine nitrogen excretion in Holstein and Jersey Cows. **Journal of Dairy Science**, v.84, p.2284-2294, 2001.

KLINGERMAN, C. M., W. HU, E. E. MCDONELL, M. C. DER BEDROSIAN, L. KUNG JR. An evaluation of exogenous enzymes with amylase activity for dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v.92, p.1050-1059, 2009.

KOZLOSKI, G. V. **Bioquímica dos ruminantes**. 3.ed. Santa Maria: UFSM, 216p, 2011.

KUNG, L., JR., R. J. TREACHER, G. A. NAUMAN, A. M. SMAGALA, K. M. ENDRES, M. A. COHEN. The effect of treating forages with fibrolytic enzymes on its nutritive value and lactation performance of dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v.83, p.115-122, 2000.

LEE-RANGEL H.A., J.M. PINOS-RODRÍGUEZ, G.D. MENDOZA, S.S. GONZÁLEZ, M.A. MONTES, A.S. TREJO, Y. JASSO-PINEDA. Effect of a ruminal buffer and exogenous amylolytic enzymes on growth and digestion in lambs fed high concentrate diets. **Journal of Applied Animal Science Res.**, v.37, p.117-120, 2010.

LEWIS, G.E., W. K. SANCHEZ, C. W. HUNT, M. A. GUY, G. T. PRITCHARD, B. I. SWANSON, R. J. TREACHER. Effect of direct-fed fibrolytic enzymes on the lactational performance of dairy cows. **Journal of Dairy Science.** v.82, p.611-617, 1999.

LINN, J. G. Factors affecting the composition of milk from dairy cows. Designing Foods: Animal Product Options in the Marketplace, National Research Council, **National Academy Press**, p.224-241, 1988.

MCALLISTER, T.A., A.N. HRISTOV, K.A. BEAUCHEMIN, L.M. RODE, K.J. CHENG. Enzymes in ruminant diets. **Agriculture and Agri-Food Canada (AAFC)**, Department of Animal Science, University of British Columbia, Lethbridge, Canada, 2003.

MCCARTHY, M. M., M. A. ENGSTROM, E. AZEM, T. F. GRESSLEY. 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.

MILLS, J. A. N., FRANCE, J., DIJKSTRA, J. A review of starch digestion in the lactating dairy cow and proposals for a mechanistic model: 1. Dietary starch characterisation and ruminal starch digestion. **Animal Feed Science and Technology.** v.8, p.291-340, 1999.

MORGAVI, D. P., K. A. BEAUCHEMIN, V. L. NSEREKO, L. M. RODE, A. D. IWAASA, W. Z. YANG, T. A. MCALLISTER, Y. WANG. Synergy between ruminal fibrolytic enzymes and enzymes from *Trichoderma longibrachiatum*. **Journal of Dairy Science.** v.83, p1310-1321, 2000.

MORGAVI, D.P., BEAUCHEMIN, K.A., NSEREKO, V.L., RODE, L.M., MCALLISTER, T.A., IWAASA, A.D. et al. Resistance of feed enzymes to proteolytic inactivation by rumen microorganisms and gastrointestinal proteases. **Journal of Animal Science.** v.79, p.1621-1630, 2001.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Pages 65–67 in Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7th rev. ed. **National Academy of Sciences**, Washington, DC. 2001.

NOZIÈRE, P., STEINBERG, W., SILBERBERG, M., MORGAVI, D. P. Amylase addition increases starch ruminal digestion in first-lactation cows fed high and low starch diets. **Journal of Dairy Science**. v.97, p.2319-2328, 2014.

NSEREKO, V.L., MORGAVI, D.P., BEAUCHEMIN, K.A., RODE, L.M. Inhibition of ruminant feed enzyme polysaccharidase activities by extracts from silages. **Canadian Journal of Animal Science**, v.80, p.523–526, 2000.

OBA, M., M. S. ALLEN. Effects of corn grain conservation method on feeding behavior and productivity of lactating dairy cows at two dietary starch concentrations. **Journal of Dairy Science**. v.86, p.174-183, 2003.

OLIVEIRA, L. G., FERREIRA, R. N., PADUA, J. T., ULHOA, C. J., CYSNEIROS, C. D. S. S., ARNHOLD, E. Performance of beef cattle bulls in feedlots and fed on diets containing enzymatic complex. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v.37, p.181-186, 2015.

OWENS F.N., SECRIST D.S., HILL W.J., GILL D.R. Acidosis in cattle: A review. **Journal of Animal Science**. v.76, p.275-86, 1998.

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

ROMERO, J. J., E. G. MACIAS, Z. X. MA, R. M. MARTINS, C. R. STAPLES, K. A. BEAUCHEMIN, AND A. T. ADESOGAN. Improving the performance of dairy cattle with a xylanase-rich exogenous enzyme preparation. **Journal of Dairy Science**, v.99, p.3486–3496, 2016.

SCHINGOETHE, D. J., G. A. STEGEMAN, R. J. TREACHER. 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, p.996-1003, 1999.

SHARMA, N; SINGH, N.K.; BHADWAL, M.S. Relationship of somatic cell count and mastitis: an overview. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v.24, p.429–438, 2011.

SHOOK, G.E. AND SCHUTZ, M.M. Selection on somatic cell score to improve resistance to mastitis in the United States. **Journal of Dairy Science**, v.77, p.648-658, 1994.

SIMAS, J.M. Processamento de grãos para rações de vacas leiteiras. In: **SIMPÓSIO SOBRE PRODUÇÃO ANIMAL: CONFINAMENTO DE BOVINOS**, 9., 1997, Piracicaba. Anais... Piracicaba: FEALQ, p.7-32, 1997.

STAPLES, C.R. Feeding dairy cows when corn prices are high. **Proceedings... 44th Florida Dairy Production Conference**. Gainesville, FL, 2007.

SUCU, E.; NAYERI, A.; SANZ-FERNANDEZ, M. V.; UPAH, N. C.; BAUMGARDI, L. H. The effects of supplemental protease enzymes on production variables in lactating holstein cows. **Italian Journal of Animal Science**. v.13, p.348-351, 2014.

SUTTON, J. D., PHIPPS, R. H., BEEVER, D. E., HUMPHRIES, D. J., HARTNELL, G. F., VICINI, J. L., HARD, D. L. Effect of method of application of a fibrolytic enzyme product on digestive processes and milk production in Holstein-Friesian cows. **Journal of Dairy Science**. v.88, p.546-556, 2003.

TANAKA, M., M. TANIGUCHI, R. MATSUNO AND T. KAMIKUBO. Cellulases from *Eupenicillium javanicum*. **Methods in Enzymology**, v.160 p.251-259, 1988.

TEWOLDEBRHAN TA, APPUHAMY JA, LEE DRN, NIU JJ, SEO M, JEONG S. Exogenous β -mannanase improves feed conversion efficiency and reduces somatic cell count in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.100, p.244-252, 2017.

TÓTH, T.; TÓTHI, R. Effect of feeding supplemental exogenous amylase on the performance of high yielding dairy cows. **Acta Agriculturae Slovenica**, Supplement 5, p.80-83, 2016.

TRICARICO, J. M., J. D. JOHNSTON, K. A. DAWSON, K. C. HANSON, K. R. MCLEOD, AND D. L. HARMON. The effects of an *Aspergillus oryzae* extract containing alpha-amylase activity on ruminal fermentation and milk production in lactating Holstein cows. **British Society of Animal Science**. v.81, p.365–374, 2005.

TYRREL, H.F.; REID, J.T. Prediction of the energy value of cow's milk. **Journal of Dairy Science**, v.48, n.9, p.1215-1223, 1965.

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

VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B.; LEWIS, B.A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, v.74, n.10, p.3583-3597, 1991.

VARGAS, C. F., M. ENGSTROM, B. J. BRADFORD. Effects of dietary amylase and sucrose on productivity of cows fed low starch diets. **Journal of Dairy Science**. v.95 (Suppl. 2), p.116, 2012.

VARGAS-RODRIGUEZ, C.F., M. ENGSTROM, E. AZEM, AND B.J. BRADFORD. 2014. Effects of dietary amylase and sucrose on productivity of cows fed low-starch diets. **Journal of Dairy Science**, v.97, p.4464–4470, 2014.

WEISS, W. P., W. STEINBERG, M. A. ENGSTROM. Milk production and nutrient digestibility by dairy cows when fed exogenous amylase with coarsely ground dry corn. **Journal of Dairy Science**. v.94, p.2492-2499, 2011.

WILDMAN, E.E., JONES, G.M., WAGNER, P.E. A dairy body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. **Journal of Dairy Science**. p.495-501, 1982.

WILES, P.G.; GRAY, I.K.; KISSLING, R.C. Routine analysis of proteins by Kjeldahl and Dumas methods: review and interlaboratory study using dairy products. **Journal of AOAC International**, v.81, p.620-632, 1998.

YANG, W. Z., K. A. BEAUCHEMIN, L. M. RODE. Effects of enzyme feed additives on extent of digestion and milk production of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v.82, p.391-403, 1999.

YANG, W. Z., K. A. BEAUCHEMIN, L. M. RODE. A comparison of methods of adding fibrolytic enzymes to lactating cow diets. **Journal of Dairy Science**. v.83, p.2512-2520, 2000.

ZINN, R. A., F. N. OWENS, R. A. WARE. Flaking corn: Processing mechanics, quality standards, and impacts on energy availability and performance of feedlot cattle. **Journal of Animal Science**. v.80, p.1145-1156, 2002.

ZINN, R.A.; BARRERAS, A.; CORONA, L.; OWENS, F.N.; WARE, R.A. Starch digestion by feedlot cattle: predictions from analysis of feed and fecal starch and nitrogen. **Journal of Animal Science**, v.85, p.1727-1730, 2007.