

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**UTILIZAÇÃO DE EXTRATO DE *Aspergillus oryzae*
CONTENDO ALFA - AMILASE EM DIETAS DE
CONFINAMENTO PARA BOVINOS NELORE**

Cleisy Ferreira do Nascimento
Zootecnista

2018

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**UTILIZAÇÃO DE EXTRATO DE *Aspergillus oryzae*
CONTENDO ALFA - AMILASE EM DIETAS DE
CONFINAMENTO PARA BOVINOS NELORE**

**Cleisy Ferreira do Nascimento
Orientador: Prof. Dr. Flávio Dutra de Resende**

**Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias –
Unesp, Campus de Jaboticabal, como
parte das exigências para a obtenção do
título de Doutor em Zootecnia.**

2018

N244u Nascimento, Cleisy Ferreira do
Utilização de extrato de *Aspergillus oryzae* contendo alfa-amilase em dietas de confinamento para bovinos Nelore / Cleisy Ferreira do Nascimento. -- Jaboticabal, 2018
xi, 68 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2018
Orientador: Flávio Dutra de Resende
Banca examinadora: João Marcos Beltrame Benatti, Suélen Capa de Ávila, Laura Franco Prados, Marcia Helena Machado da Rocha Fernandes
Bibliografia

1. Aditivos. 2. Amido. 3. Enzimas. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 636.087:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: UTILIZAÇÃO DE EXTRATO DE *Aspergillus oryzae* CONTENDO ALFA-AMILASE EM DIETAS DE CONFINAMENTO PARA BOVINOS NELORE

AUTORA: CLEISY FERREIRA DO NASCIMENTO

ORIENTADOR: FLÁVIO DUTRA DE RESENDE

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em ZOOTECNIA, pela Comissão Examinadora:

Pesquisador Dr. FLÁVIO DUTRA DE RESENDE
Departamento de Descentralização do Desenvolvimento / APTA - Colina/SP

Supervisor de Treinamento Técnico - Dr. JOÃO MARCOS BELTRAME BENATTI
Nutrição Animal / TROUW NUTRITION - Campinas/SP

Pós-doutoranda SUÉLEN CAPA DE ÁVILA (Participação por Videoconferência)
Departamento de Animal Science / UK

Pós-doutoranda LAURA FRANCO PRADOS
Departamento de Zootecnia / APTA - Colina/SP

Pesquisadora Dra MARCIA HELENA MACHADO DA ROCHA FERNANDES
Departamento de Zootecnia / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 23 de fevereiro de 2018

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Cleisy Ferreira do Nascimento, nascida em 18 de março de 1987, em Jandira, São Paulo, filha de João Bosco do Nascimento e Luzinete Ferreira do Nascimento. Graduada em Zootecnia pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – FEIS – UNESP- Ilha Solteira - SP – (2006-2011). Mestrado em Produção Animal Sustentável pelo Instituto de Zootecnia-SP (2011-2013) na área de Nutrição de Ruminantes, com ênfase no metabolismo da eficiência alimentar. Bolsista pelo CNPq em Desenvolvimento Tecnológico Industrial (DTI -C) (2011-2013) auxiliando nas pesquisas desenvolvidas pelo Instituto de Zootecnia de Sertãozinho, onde atuou nas linhas de pesquisa com ênfase na relação entre emissão de metano, metabolismo nutricional, comportamento ingestivo, desempenho e eficiência alimentar de bovinos Nelore. Em 2014 iniciou o doutorado na UNESP – Jaboticabal, sob orientação do Professor Dr. Flavio Dutra de Resende. De agosto de 2016 a agosto de 2017 integrou a equipe de pesquisa do Dr. David L, Harmon em Lexington no estado do Kentucky – EUA, na qual participou de projetos relacionados a impacto da micotoxinas sobre a motilidade ruminal de bovinos leiteiros (Bolsa de Estudos e Pesquisa no Exterior – BEPE). Doutorado em Zootecnia pela Unesp – FCAV – Jaboticabal, atualmente bolsista FAPESP.

“O inverno nunca falha em se tornar primavera”
Nitiren Daishonin

“A abundância entra na minha vida de maneiras surpreendentes e milagrosas”
Gio Antonelli

A minha família, em especial ao meu pai João Bosco do Nascimento (*in memoriam*), que foi e é um exemplo de amor, generosidade, bondade e honestidade para mim e que me acompanha dia a dia da minha vida! A minha mãe querida, que tem uma alma sábia e especial, que espera com amor e bondade os propósitos de uma vida, e com muita resignação e resiliência aprende e ensina o caminho.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família por me dar todo o suporte necessário para que eu continue alcançando os meus objetivos. Sem eles nada faria sentido! Minha mãe Luzinete, minha irmã Cláudia, meu irmão Claudio, meus cunhados Carlos e Marcia, meus sobrinhos queridos Cauã, Eduardo e Lívia que fazem dos meus dias mais felizes e renovam meus motivos para sempre querer voltar para casa. A minha madrinha querida Tia Maria que me apoia incansavelmente e me transmite todo o amor por meio do sacramento, ao meu padrinho Robson que é muito querido e bem-humorado e que torna tudo a sua volta mais agradável, a minha prima Verônica que é o meu primeiro exemplo de estudos e que me inspiro a cada dia! Ao Anselmo e Patrícia, por toda a torcida e apoio! A todos os meus primos, em especial Vinícius, Bianca, João Pedro, Fátima, Natália, Letícia, Cris, Clodes, Clóves e a querida Tia Geralda por todo apoio e torcida!

As minhas amigas de infância, Carina e Camila que fazem meu coração tranbordar de amor a cada reencontro. Quero estar com vocês para sempre! Agradeço a família de vocês que se mistura com a minha em prol da vida em comunhão.

Aos meus queridos Beto, Karla, Erica, Amanda, Silvana, Zé, Renata, Paty, Douglas, Evelin, Li, Nena, Lisandra, Jonas, Noemi, Edclécia, Andréia, Simone, Silvia, Rê, Dona Albertina, Senhor Geraldo, Jacinta, Gi, Nego, Gê, Gil, Gilson, Roger, Cícero e as respectivas famílias que fazem a minha dobrar de tamanho, sempre com muito amor e alegria em cada reunião.

Aos meus amigos ideológicos Fábio, Angelita, Fernanda, Fernando e Martha, por acreditarem no mesmo mundo que eu!

As minhas amigas da Faculdade, Jaque, Mika, Ju, Tammy, Val, Pê, Thaís, Poli, Yane, Bim, Aveia, Dani, Angelão que continuam diariamente compartilhando suas rotinas comigo.

As meninas lindas do Sertão, Marcela, Thaís, Carol, Maranhão, Juh e Suzan, que são o presente mais rico que adquiri no mestrado. Em especial a Bianca e Laine que são flores queridas e muito presentes na minha vida!

Aos meus companheiros da APTA de Colina, que me ajudaram sempre, tanto profissional como pessoalmente, em especial Renan, Felipe, Vinícius, João Marcos,

Paraíba, Rodolfo, Gabriel, Flávio, Rogério, Alexandre, Marco, Max, Iorrano, Wendel, Mexicano, Dario, Kyone, Marcão, Layles.

A Naiara por todo o apoio em todos os momentos do meu experimento e vida na hospedaria, vibrando e sofrendo com cada etapa e a qual levarei como uma grande amiga para a vida. A Browzinha que é minha cúmplice e companheira nos pensamentos e ações mais loucos que se possa pensar e mencionar e que mesmo longe é tão companheira e tímida. A Aline pelo companheirismo e amizade e pelos gostos semelhantes de tudo o que é bom na vida...Redes sociais, novelas...Os nossos dias são mais leves! A Ivanna por toda a lealdade, amizade e generosidade e por demonstrar em inúmeros momentos que sou importante em sua vida! A Danúbia miga loka que tem um coração gigante e que me ajuda em tudo o que preciso sempre! A Letícia minha florzinha querida que com toda a meiguice faz eu derreter! A Laura querida que fez o time das meninas de Colina se tornar melhor e que é um presente a convivência diária com um ser tão bacana e inspirador! A Val por toda a ajuda de sempre! Amo todas vocês!

A Ana Paula, minha florzinha querida e sempre presente na minha vida, assim como a Beatriz querida e autêntica que entrou de vez na minha vida! Lindas! Muito obrigada pela amizade! Amo vocês!

Aos funcionários da APTA – Colina, em especial, Miltinho, Subio, Tonhozinho, Toga, Lori, Sr. João, Luizinho, Roberto, Nandi, Alcino, Edmilson, Regina, Sueli, Flora, Néia, José Vitor, Chica, Alessandra e Chico por todo apoio e ajuda no experimento e na vida. Muito obrigada!

Aos estagiários da APTA - Colina, em especial, Letícia pela amizade e companheirismo no experimento. As florzinhas Fernandinha, Paloma que agora é minha companheira de pós, Michele, Duda, Jaque e Rebeca, assim como Luiz Fernando, Willian, Diego, Weber, Hugo, por toda a ajuda de sempre!

Ao grupo de pesquisa da UK Dr. Harmon, Dr. McLoud, Dr. Vanzant por toda a paciência e ensinamentos. Em especial Kara, Taylor, Laurene Mirian!

Agradeço a Suélen por ter sido o anjo que me acolheu e fez tudo o que estava a seu alcance para que minha estadia fosse a melhor possível e que a partir disso surgiu uma linda amizade! A qual me proporcionou vivenciar momentos inesquecíveis e especiais! Agradeço a Amanda que permitiu que eu fizesse parte de momentos tão importantes e reservados do seu dia a dia e que me mostrou que pessoas das agrárias

podem fazer crossfit e serem quase deuses!!!hahaha. Suka e Amanda vocês somaram mais um sentido a palavra amizade para mim!

Agradeço as meninas do Rugby Shannon, Alina e Ali que me ensinaram o quão companheiro se pode ser, mesmo praticando um esporte tão violento! Agradeço ao Jon e Joe por toda a paciência e atenção com a Vó.

Ao meu orientador Flávio Dutra de Resende pela orientação, conselhos e ensinamentos que levarei para sempre.

Ao Dr. Gustavo Resende Siqueira por todo o suporte, ensinamentos e conselhos que fazem sempre a diferença.

Ao Dr. Ricardo Reis por todos os ensinamentos, consideração e atenção com a minha formação acadêmica.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. E por meio da bolsa de doutorado (Processo: 2015/07046-1, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)) e todo o suporte técnico e financeiro concedidos pela FAPESP.

SUMÁRIO

UTILIZAÇÃO DE EXTRATO DE ASPERGILLUS ORYZAE CONTENDO ALFA - AMILASE EM DIETAS DE CONFINAMENTO PARA BOVINOS NELLORE	1
RESUMO	1
ABSTRACT	3
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	4
1.1. INTRODUÇÃO.....	4
1. 3. REFERÊNCIAS	14
CAPÍTULO 2: EFEITO DA ADIÇÃO DE ALFA-AMILASE NA FERMENTAÇÃO RUMINAL E DIGESTIBILIDADE EM BOVINOS NELORE	18
RESUMO	18
ABSTRACT	20
INTRODUÇÃO	21
MATERIAL E MÉTODOS	22
RESULTADOS	31
DISCUSSÃO.....	36
CONCLUSÃO.....	40
CAPÍTULO 3: EFEITO DA ADIÇÃO DE ENZIMA ALFA-AMILASE NO DESEMPENHO E QUALIDADE DA CARNE EM BOVINOS NELORE TERMINADOS EM CONFINAMENTO	47
RESUMO	47
ABSTRACT	49
INTRODUÇÃO	51
MATERIAL E MÉTODOS	51
RESULTADOS	58
DISCUSSÃO.....	63
CONCLUSÃO.....	65
REFERÊNCIAS.....	66



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 015610/14 do trabalho de pesquisa intitulado "Utilização de *Aspergillus oryzae* α -amilase (Amaize®) em dietas de confinamento para bovinos Nelore", sob a responsabilidade do Prof. Dr. Flávio Dutra de Resende está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 03 de setembro de 2014.

Jaboticabal, 03 de setembro de 2014.

Prof.ª Dr.ª Paola Castro Moraes
Coordenadora – CEUA

UTILIZAÇÃO DE EXTRATO DE *Aspergillus oryzae* CONTENDO ALFA - AMILASE EM DIETAS DE CONFINAMENTO PARA BOVINOS NELORE

RESUMO

Em dietas com teores elevados de amido, fornecidas a ruminantes podem apresentar subaproveitamento em relação ao tempo de permanência da digesta no rúmen, assim, considerando que a digestão é mediada por enzimas presentes na composição dos microorganismos ruminais, a adição de isoenzimas exógenas pode potencializar o aproveitamento da dieta. Desta forma, o objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos da adição de extrato de *Aspergillus oryzae* contendo alfa - amilase em dietas com elevada inclusão de concentrado no metabolismo e desempenho de bovinos Nelore. O experimento foi conduzido no confinamento individual da estação experimental APTA - Colina / SP / Brasil. Foram utilizados dois delineamentos distintos para avaliar o metabolismo (Exp. 1), e o desempenho (Exp. 2). No Exp. 1 (Metabolismo) foram utilizados dez bovinos Nelore, (5 animais por tratamento), canulados no rúmen, com peso corporal inicial (PCI) 400 ± 25 kg e idade média 24 meses, em um delineamento em esquema *crossover* e distribuídos em dois tratamentos: Controle (ausência de alfa-amilase) e adição de Amilase (5g/animal/dia de extrato de *Aspergillus oryzae* alfa-amilase – Amaize®, Alltech, Inc). A dieta foi isoprotéica fornecida *ad libitum* foi formulada para conter 2,96 Mcal/kg de Energia Metabolizável (EM). A fermentação ruminal foi mensurada a partir de amostras de líquido ruminal coletadas ao final de cada período de 25 dias do total de 125 dias de período experimental. Enquanto que as amostras de sangue foram coletadas no início e final deste mesmo período. A digestibilidade e balanço de compostos nitrogenados foram mensurados concomitantemente, por meio de coleta total de fezes e urina, respectivamente (3 dias consecutivos). No Exp. 2 (desempenho) foram utilizados quarenta e dois bovinos Nelore, não castrados, com PCI de 353 ± 13 kg e idade média de 24 meses, alocados em baias individuais, em um delineamento experimental em blocos casualizados (PCI foi considerado o critério de blocagem). Os tratamentos e a dieta foram os mesmos descritos para o metabolismo, com 21 animais por tratamento. Os dados foram analisados utilizando o procedimento MIXED do SAS, as diferenças entre as médias foram comparadas pelo teste t com 5% de probabilidade e tendências discutidas entre 5 e 10% de probabilidade. A concentração de propionato foi 8,72% maior para animais recebendo Amilase ($P = 0,027$), apresentando tendências de diminuição na concentração de acetato e consequentemente na relação acetato:propionato ($P = 0,088$). A concentração de insulina plasmática nos animais que receberam Amilase tendeu a ser menor ($P = 0,062$). A digestibilidade da PB tendeu a ser maior ($P = 0,064$), assim como para a digestibilidade da FDN em animais que receberam Amilase ($P = 0,066$). O balanço de compostos nitrogenados não sofreu efeito do uso da Amilase ($P = 0,904$). Entre as características de desempenho, o PC final, peso de carcaça quente (PCQ) e os ganhos tanto em PC quanto em peso de carcaça tenderam a ser maior para animais que receberam Amilase ($P = 0,092$), o que corresponderia a quase 9 kg a mais de peso de carcaça em comparação com animais do grupo controle. Para as características de qualidade da carne, houve diferenças para a cor L* (luminosidade) ($P = 0,041$) e tendências para a cor b* (amarelada) ($P = 0,074$). A cor L* (37,80 vs. 40,01) e b* (13,98 vs. 15,33) apresentaram valores mais baixos em animais que receberam Amilase, comparados com o controle,

respectivamente. O teor de ácidos graxos hipocolesterolêmicos foi maior para animais alimentados com Amilase ($P = 0,049$), correspondendo a 5,92% superior em comparação ao grupo controle. O uso de extrato de *Aspergillus oryzae* contendo alfa - amilase aumenta a utilização da dieta por meio da melhor digestibilidade da PB e fibra, assim como pela maior concentração de propionato no rúmen que implicará em melhor desempenho tanto pelo ganho em peso, quanto pelas características de qualidade de carne.

Palavras-chave: aditivos, amido, desempenho, enzimas, metabolismo

USE OF *Aspergillus oryzae* EXTRACT CONTAINING ALPHA - AMYLASE IN FEEDLOT DIETS FOR NELLORE CATTLE

ABSTRACT

In diets with high levels of starch supplied to ruminants, the strategy to improve reduce underutilization of the concentrate is to optimize the digestibility. The digestion is enzyme-mediated by the rumen microorganisms, the addition of exogenous isoenzymes can enhance the use of diet. The objective of this study was to evaluate the effects use of *Aspergillus oryzae* extract containing alpha-amylase in feedlot diets on metabolism and performance of Nellore cattle. The study was in feedlot at the APTA experimental facility - Colina / SP / Brazil. Two distinct designs were used to evaluate metabolism (Exp. 1) and performance (Exp. 2). Exp. 1: Ten Nellore bulls, rumen cannulated (initial body weight between 400 ± 25 kg and age of 24 months) were housed in individual pens. The experimental design was *crossover*, in which the animals were randomized between two treatments 1: Control - absence of amylase and 2: Amylase -*Aspergillus oryzae* extract containing alpha amylase activity (Amaize[®], Alltech, Inc.), 5 g/animal daily. The diet was isoprotein provided *ad libitum*, formulated to contain 2,96 Mcal/kg ME. Ruminal fermentation was measured from rumen fluid samples collected at the end of a 25 day period, while blood samples were collected at the beginning and end of this period. The digestibility and nitrogen balance were measured concomitantly, through total collection of feces and urine, respectively (3 consecutive days). Exp. 2 (performance): Forty-two bulls Nellore (initial body weight of 353 ± 13 kg and 24 months) were used in individual pens. The experimental design was a randomized blocks (blocked by initial BW) with the same treatments and diet as on metabolism design. The data were analyzed using the MIXED procedure of SAS. The differences between means were compared by the t-test with 5% probability and trends were discussed between 5 and 10% probability. The concentration of propionate was 8.72% greater for animals receiving Amylase ($P = 0.027$), showing decreasing trends in acetate concentration and consequently acetate: propionate ratio ($P = 0.088$). Plasma insulin concentration in animals receiving Amylase tended to be lower ($P = 0.062$). The digestibility of CP tended to be higher ($P = 0.064$), as well as for the digestibility of NDF in animals receiving Amylase ($P = 0.066$). The balance of nitrogen compounds was not affected using Amylase ($P = 0.904$). Among the performance characteristics, the final BW, hot carcass weight (HCW) and gains in BW and carcass weight tended to be greater for animals receiving Amylase ($P = 0.092$), which would correspond to almost 9 kg more carcass weight compared to control animals. For the meat quality characteristics, there were differences for the color L^* (luminosity) ($P = 0.041$) and tendencies for the color b^* (yellow) ($P = 0.074$). The color L^* (37.80 vs 40.01) and b^* (13.98 vs. 15.33) had lower values in animals receiving Amylase, compared to control, respectively. The content of hypocholesterolemic fatty acids was greater for Amilase ($P = 0.049$), corresponding to 5.92% higher in compared to the control group. The use of *Aspergillus oryzae* containing alpha - amylase extract increases dietary utilization through better digestibility of CP and fiber, as well as greater concentration of propionate in the rumen which will imply in better performance both by gain in weight and by the characteristics of meat quality.

Keywords: additives, enzyme, metabolism, performance, starch

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1. Introdução

Com um rebanho bovino total em torno de 219 milhões de cabeças e aproximadamente 1.600.238 km² de pastagem naturais, o sistema de criação de rebanhos zebuínos em pastagem é predominante em todo o território nacional (ABIEC, 2017). A terminação destes animais é quase que totalmente em pastagens, pois o número de cabeças abatidas remanescentes de confinamento representam 12,49% (4,61 milhões de cabeças) do total de animais abatidos (36,9 milhões de cabeças) (ABIEC, 2017).

O que reflete a interpretação de baixo custo de produção. Porém, as disparidades em termos de qualidade nutricional destas pastagens, fatores sazonais para manejo e até mesmo homogeneidade dos lotes dos animais culminam num ciclo de produção lento e muitas vezes ineficiente, um dos exemplos é a média de peso de abate, correspondendo a 480 kg de peso corporal (PC) e 240 kg de peso de carcaça (IBGE, 2017).

Assim, são necessárias estratégias para otimizar e intensificar os sistemas de produção, a fim de aplicar tecnologias que sejam eficientes, tanto para o uso de recursos naturais, quanto na elevação da qualidade dos recursos humanos, e que terão impacto direto nos fatores econômicos da produção (OLIVEIRA et al., 2011).

Dentre as estratégias utilizadas, o confinamento surgiu como proposta para viabilizar a tramitação de compra e revenda de animais no período de safra e entressafra, respectivamente. Conforme a estratégia foi se estabelecendo, passou a ser uma das principais formas de utilização de resíduos ou subprodutos das agroindústrias e, hoje, é uma atividade que visa acelerar o crescimento animal e poupar o mesmo de um pasto ruim no período da seca durante a terminação (OLIVEIRA et al., 2011). Comparado com outros países como Estados Unidos, Austrália e outros na Europa, o tempo de confinamento no Brasil é mais curto, representando em média 80 dias (OLIVEIRA et al., 2011). Assim, este curto período de intensificação do sistema deve ser eficiente para promover ganhos em animais que provém de diferentes condições de cria e recria, a nível nutricional e genético. E no que diz respeito ao procedimento executável nos confinamentos, a formação de lotes homogêneos e formulações de rações são os componentes

chave para alcançar continuidade e retorno financeiro nesta atividade (OLIVEIRA et al., 2011). Mundialmente, os cereais nas dietas de terminação em confinamentos são a principal fonte energética fornecida aos animais, e o milho é o tipo de cereal mais utilizado para compor estas dietas (SANTOS et al., 2001; MILLEN et al., 2009). Os grãos de cereais, em especial sorgo e milho, são compostos por aproximadamente 70% de amido e a digestibilidade do mesmo pode variar em função do tipo do cereal, teor dos compostos químicos presentes neste carboidrato de reserva e até mesmo a estrutura interna do grânulo (SANTOS et al., 2001).

As variedades do milho podem ser tanto do tipo “dentado”, o qual contém endosperma farináceo e com isso maior quantidade de amido digestível, quanto do tipo “duro” ou “*flint*” com maior teor de endosperma vítreo e amido menos digestível, o qual é produzido em abundância no Brasil (CORREA et al., 2002). Estas características são de extrema importância, em termos de produtividade e resistência a pragas nas condições climáticas do Brasil, entretanto, este tipo de milho possui menor digestibilidade na fermentação ruminal (CORREA et al., 2002; MILLEN et al., 2009; SANTOS et al., 2001).

Desta forma, métodos de processamento do grão podem aumentar a área de superfície de contato e proporcionar uma maior susceptibilidade do amido à ação enzimática e assim afeta a digestibilidade a nível ruminal e intestinal (RAMOS et al., 2009). O processamento contribui com o maior aporte de energia metabolizável das rações, devido a maior digestibilidade do amido, todavia, este efeito pode não ser evidente no ganho em peso dos animais, mas é perceptível na eficiência alimentar e há alta correlação positiva entre a digestibilidade ruminal e total do amido (OWENS et al., 1998; SANTOS et al., 2001). A moagem fina é o tipo de processamento mais comum no Brasil, porém, embora o processamento seja uma alternativa para melhorar a utilização do amido, cada tipo de processamento tem sua particularidade inerente ao operacional e ao teor de digestibilidade que pode proporcionar (ZEOULA E CALDAS NETO, 2001).

A digestão do amido em ruminantes ocorre tanto a nível ruminal, quanto intestinal e a composição química e o tamanho da partícula podem definir o grau de acesso dos microorganismos ao substrato e a ação enzimática no mesmo, assim como o tempo de permanência do alimento em cada compartimento e desta

forma obtendo maiores ou menores coeficientes de digestibilidade do amido (RAMOS et al., 2009). Mas ainda que a porção não digerida represente em torno de 10% do total de amido ingerido, quando processado (moagem fina), a perspectiva toma dimensões expressivas se consideramos o total de alimento ingerido por dia, o número de bois e o período total da terminação em confinamento (SANTOS et al., 2001). Neste sentido, conciliar técnicas, métodos e ou estratégias que minimizem os custos operacionais totais são determinantes para que a produção seja rentável, em um sistema que as margens encontram-se cada vez mais estreitas.

Dentre essas possibilidades há o uso de enzimas exógenas conceitualmente fornecidas ao animal com intuito de modular a fermentação ruminal, tal prática, bem comum na dieta de monogástricos, foi inicialmente desacreditada em dietas fornecidas a ruminantes, pois havia um preconceito de que as enzimas seriam degradadas no rúmen, antes de agirem no substrato. Entretanto, em condições ideais de temperatura, pressão e pH, as enzimas provocam efeitos positivos na degradação dos substratos específicos (MEALE et al., 2014).

Enzimas são catalisadoras de reações químicas no organismo, ou seja, têm a capacidade de acelerar as reações naturais do metabolismo, por agir na quebra de compostos da parede celular e alguns compostos químicos (BEAUCHEMIN, 2003). E, em condições ruminais, as mesmas podem favorecer a adesão dos microrganismos nas células vegetais e, até mesmo, agir no substrato e converter polissacarídeos estruturais e não estruturais em açúcares solúveis (ROJO et al., 2007).

A adição de alfa-amilases em dietas com elevada inclusão de concentrado na dieta causa um efeito somatório a já existente hidrólise do amido por meio dos microrganismos do rúmen, assim, os produtos resultantes dessa hidrólise são açúcares solúveis prontamente utilizáveis para os microrganismos, que produzirão ácidos graxos de cadeia curta, desta forma ocorrerá alterações na fermentação ruminal que por sua vez afetará o metabolismo e desempenho dos animais (HRISTOV et al., 2008; KLINGERMAN et al., 2009; RAMOS et al., 2009).

Contudo, a gama de estudos avaliando o efeito do uso de enzimas exógenas foram desenvolvidos principalmente no hemisfério norte, onde é maior

a predominância de bovinos de origem taurina e cultivo de milho mais digestível, comparado ao tipo “*flint*”. (HRISTOV et al., 2008; KLINGERMAN et al., 2009; TRICARICO et al., 2007). Esta perspectiva atenta para a necessidade de avaliação em zebuínos, visto que em alguns trabalhos há relatos de que estes tem menor potencial de digestibilidade do amido e além disso, há o agravante de que são alimentados com um tipo de milho menos digestível (KREHBIEL, KREIKEMEIER, FERRELL, 2000; BRITO et al., 2011 e OLIVEIRA et al., 2015).

Assim, o uso de enzimas exógenas (alfa-amilase) proverá melhor utilização do amido contido no milho? Esta melhora implicará em mudanças no metabolismo e resultará em diferenças no desempenho de bovinos Nelore confinados?

Este trabalho foi então delineado com o intuito de responder estas questões, preenchendo uma lacuna existente sobre a utilização de alfa – amilase em dietas contendo milho produzido em regiões tropicais para zebuínos confinados.

1.2. Revisão de Literatura

Dietas de confinamento e tipos de milho

As dietas de confinamento são formuladas com o intuito de fornecer aos animais o nível adequado de nutrientes para que os mesmos possam atingir o seu potencial máximo de produção. Para tal, é necessário a escolha de ingredientes que sejam eficientemente utilizados, de fácil obtenção, e qualidade nutricional. O milho tem sido a principal fonte energética utilizada em dietas de confinamento, com elevada inclusão de grão, correspondendo a escolha de 100% dos nutricionistas de confinamentos no Brasil, conforme levantamento obtido por Millen et al. (2009).

O pericarpo, endosperma, germe e pedicelo são as principais estruturas do milho, as quais variam em função do estágio de maturação da planta, material genético, condições climáticas, tipo de solo e nível de adubação (RITCHIES e HANWAY, 1989). Existem algumas classificações do milho, as principais diferenças são identificadas na estrutura do endosperma, o qual representa uma maior proporção do grão. Desta forma, a partir da identificação da composição e

tamanho do endosperma é possível classificá-lo em duro, dentado, semiduro e misturado (CANTARELLI et al., 2006). Em resumo, essa classificação remete principalmente a combinação e constituição da proteína e amido que compõe o grão (CANTARELLI et al., 2006)

Os tipos de milho mais utilizados na alimentação animal são os classificados como dentado ou “*flint*”. O milho do tipo dentado apresenta maior produtividade em regiões de clima temperado, enquanto que o “*flint*” é mais adaptável ao clima da região dos trópicos.

A estrutura do grão dentado é caracterizada pelo arranjo dos grânulos de amido nas laterais dos grãos, mais espaçado, para formar um cilindro, na parte central, que envolve o embrião. Já o milho duro (“*flint*”) possui uma região mais cristalina desenvolvida e adensada que envolve endosperma farináceo. Para determinar este grau de cristalinidade é comum o método de mensuração através da luz, no qual, quanto maior a reflexão da luz que incidi sobre o grânulo, menor é o espaço entre os grânulos e este é considerado um grão mais vítreo (“*flint*”), enquanto que os espaços entre os grânulos permitem a passagem da luz, o que confere opacidade ao material (farináceo – dentado) (CORREA et al., 2002).

Em torno de 60-90% do peso do grão de milho é formado pelo endosperma amiláceo e os grânulos de amido são envoltos por uma matriz proteica na parede celular do endosperma que pode ser quebrada após processamento e os anéis concêntricos que são formados com a deposição do amido tornam-se passíveis da ação de enzimas amilolíticas presentes no meio (SANTOS et al., 2001). Tal fato pode afetar a digestibilidade dos nutrientes, uma vez que pela matriz proteica ser densa e desenvolvida em milho tipo “*flint*”, a mesma é hidrofóbica, dificultando o acesso e ação das enzimas no substrato a nível ruminal e intestinal (MCALLISTER et al., 2001).

Processamento do grão de milho

O processamento do grão de milho, seja por aumento da umidade, temperatura e/ou pressão, tem como objetivo aumentar o acesso das bactérias do rúmen ao amido, apresentando efeitos positivos sobre a digestibilidade ruminal,

pós-ruminal e total do amido (THEURER et al., 1999; SANTOS et al., 2001; RAMOS et al., 2009).

O processamento pode influenciar a digestibilidade do amido nos diferentes compartimentos do trato gastrointestinal. Métodos mais intensos de processamento, como ensilagem de grão com alta umidade e floculação, apresentaram aumento na proporção do amido total que será digerido no rúmen e no intestino delgado e baixa digestibilidade do amido no intestino grosso, em virtude de quase a totalidade do amido ter sido digerido nos compartimentos anteriores, quando comparado aos tratamentos menos intensos, como milho laminado seco (SANTOS et al., 2001).

A digestibilidade ruminal do amido está diretamente relacionada com melhorias no desempenho de bovinos de corte, em virtude do aumento do aporte energético para o animal e do aumento da produção de proteína microbiana e consequentemente fluxo de proteína microbiana para o intestino delgado (SANTOS et al., 2001; RAMOS et al., 2009).

Amido

O amido é um carboidrato não estrutural com característica biológica de componente de reserva nas plantas, chegando a representar 70% do grão de milho. É composto por polímeros de glicose unidas de forma linear e ramificadas denominados amilose e amilopectina, respectivamente. A amilose é formada por unidades de glicose unidas por ligações α -(1,4), enquanto que a amilopectina apresenta tanto ligações α -(1,4), quanto ligações α -(1,6) nos pontos de ramificação da cadeia glicosídica. A formação do grão de amido ocorre por meio de deposição de anéis de crescimento que se desenvolvem da região central até a superfície, compondo camadas denominadas amorfas (ramificação da amilopectina) e a semicristalina (dupla hélice da amilopectina) (TESTER et al., 2007). A proporção de amilose e amilopectina pode estar relacionada a degradação do amido e assim os grãos de amido podem ser classificados em cerosos (amilose:amilopectina \leq 15 %), normal (a relação fica entre 16 e 35%) e de alta amilose (relação \geq 36% do grânulo)

(MEALE et al., 2014). A amilose e amilopectina são ligadas por pontes de hidrogênio, assim o processamento do grão também é feito com o intuito de quebrar estas ligações, permitindo assim, a entrada de água e ação enzimática. Neste momento pode haver a gelatinização do amido que é a transformação da estrutura original do grão, pois permite a absorção de água em detrimento a diminuição da região cristalina e a degradação passa a ser possível (TESTER et al., 2007).

Conforme já mencionado, a matriz proteica presente no endosperma vítreo constitui uma limitação inicial de acesso aos polímeros de amido do grão, por parte dos microorganismos do rúmen. Assim, para que a degradação do substrato se inicie a nível ruminal, a ação conjunta de bactérias que degradem proteínas (prolamina é a principal proteína do grão de milho) é essencial para que aconteça a degradação do amido (MCALLISTER et al., 2003; COTTA et al., 2006).

Degradabilidade ruminal do amido

Uma vez que os microorganismos conseguem acessar os carboidratos presentes na dieta, estes carboidratos são metabolizados a ácidos graxos de cadeia curta e passam a ser a principal fonte de energia para ser utilizada diretamente nos tecidos dos ruminantes. Os carboidratos que não são degradados no rúmen passam para o intestino delgado. No caso do amido, a quantidade que escapa da fermentação ruminal pode ser hidrolisada por enzimas pancreáticas, o restante desta fração pode ser fermentado no intestino grosso, mas a maior parte acaba sendo excretada nas fezes (VAN SOEST, 1988).

Para que os grânulos de amido se tornem acessíveis aos microorganismos amilolíticos há uma ação conjunta entre bactérias celulolíticas e proteolíticas, conforme já mencionado.

Amilases

As enzimas são denominadas em função do substrato de atuação. Desta forma, as amilases atuam sobre o amido, além de glicogênio e polissacarídeos, hidrolisando as ligações glicosídicas, liberando diversos produtos, como dextrinas e polímeros de unidades de glicose. As amilases podem ser divididas em três grupos de acordo com a ligação que hidrolizam: alfa-amilase, rompem ligações no interior do substrato (endoamilases), beta-amilases, atuando nas extremidades não redutoras do substrato (exoamilases), e a glucoamilase (amiloglucosidase), efetivas no terminal não redutor das moléculas do substrato (KOZLOSKI, 2016).

A alfa-amilase é a enzima que rompe as ligações alfa-1,4 dos polissacarídeos com três ou mais unidade de D-glucose. Durante a hidrólise do amido, a alfa-amilase cliva aleatoriamente o polímero do amido em oligossacarídeos de baixo peso molecular e, eventualmente produz unidades de maltotriose e maltose e dextrina-limite, glicose e maltose a partir de amilopectina (KOZLOSKI, 2016).

Utilização de enzimas na nutrição de ruminantes

As enzimas exógenas podem ser utilizadas como estratégia nutricional, promovendo melhorias no desempenho animal. Uma vez atuando no substrato específico, a enzima alcança a maior estabilidade enzimática devido a formação do complexo enzima-substrato, o que afeta a ação de proteases e aumenta o tempo de permanência da amilase no ambiente ruminal, quando não há o complexo enzima-substrato, as mesmas podem solubilizar no líquido ruminal e fluírem para o intestino (MEALE et al. 2014). O impacto no desempenho reflete esta maior ação de otimização dos nutrientes no rúme. Há um sinergismo entre as enzimas exógenas e microbianas por maior hidrólise ruminal, assim melhora a colonização do alimento pelos microrganismos, aumentando a disponibilidade de carboidratos fermentáveis para a multiplicação microbiana e maior digestão da dieta (RAMOS et al., 2009).

Desempenho e qualidade de carne de bovinos recebendo enzimas

Estudos demonstram que o complexo enzimático de alfa-amilase acarreta em maiores desempenhos, melhoras nas características de carcaça, aumento no consumo voluntário de matéria seca (MS). Demais autores conseguiram identificar também que enzimas exógenas podem aumentar os coeficientes de digestibilidade da MS, matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB) e Fibra em detergente neutro (FDN) (CHEN et al., 1995; TRICÁRICO et al., 2007; HRISTOV et al., 2008; KLIGERMAM et al., 2009; GADO et al., 2009).

A qualidade da carne é um fator muito importante tanto pelas exigências de mercado em relação a consistência, sabor, coloração, quanto pelo aspecto de saúde e segurança alimentar. A coloração da carne é um fator influenciado principalmente pela natureza do conteúdo do pigmento de mioglobina, que está intimamente relacionada ao músculo, que sofre efeitos desde a idade até nutrição e conseqüentemente estado de oxigenação e oxidação do músculo. Devido a oxidação lipídica dos ácidos graxos presentes no músculo a coloração do músculo pode ser mais acentuada ou não. Desta forma, maior proporção de ácidos graxos

insaturados na carne pode inferir uma coloração vermelho mais brilhante na carne (oximioglobina); (SEYMOUR et al., 2005).

O pH final do músculo pode estar relacionado ao estado físico e a reflexão de luz sobre a superfície do músculo. Valores elevados de pH são negativamente correlacionados com a luminosidade do músculo (ROSENVOLD et al., 2001). Em relação a maciez da carne, tal aspecto está associado principalmente ao grau de acabamento (espessura de gordura subcutânea) e com o teor de gordura intramuscular na carcaça os quais podem variar em função do aporte energético da dieta, pois os estoques de glicogênio no músculo podem ser alterados em função da alimentação e assim terá impactos na maciez da carne, por meio do pH final (ROSENVOLD et al., 2001; LEHESKA et al., 2002). As proporções de ácidos graxos na carne de bovinos dependem entre outros aspectos, da dieta, a qual pode prover carboidratos, proteínas e lipídios, em que os mesmos ainda podem sofrer ação da biohidrogenação nas insaturações, quando chegam no rúmen e o perfil de deposição no músculo passa a ser outro. Desta forma, o uso de amilase que propõe uma otimização a nível ruminal e elevação das concentrações de ácidos graxos de cadeia curta, pode influenciar o teor dos ácidos graxos na carne, uma vez que o acetato é o principal precursor de ácido graxo no tecido adiposo (POLIZEL et al., 2008), seguido do beta hidroxibutirato e o propionato, que influencia a formação de ácidos graxos de cadeia ramificada, além disso, a glicose influencia a formação de adipócitos, por estimular a atividade das enzimas responsáveis pela absorção de ácidos graxos a nível plasmático (KOZLOSKI, 2016).

Conforme já mencionado neste texto o uso de amilase pode promover melhoras no desempenho animal em função do efeito no metabolismo ruminal sobre a degradação do amido presente nos grãos de milho da dieta, contudo é necessário verificar especificamente os efeitos em bovinos Nelore consumindo um tipo de milho mais duro e ainda que as respostas sejam semelhantes, é importante observar os efeitos na raça mais utilizada no Brasil recebendo o tipo de milho mais abundante e adaptado ao nosso clima.

Assim, a proposta do nosso estudo foi observar quais as respostas geradas no metabolismo e desempenho de bovinos Nelore confinados, recebendo alfa – amilase exógena em dietas com elevada inclusão de concentrado.

1. 3. Referências

ABIEC - Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne, Exportação Brasileira de Carne Bovina, 2015. <http://www.abiec.com.br/texto.asp?id=8>.> Acesso em 15 de janeiro de 2016.

ABIEC - **Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne**. Exportação Brasileira de Carne Bovina. 2015.<<http://www.abiec.com.br/texto.asp?id=8>.> Acesso em 10 de dezembro de 2016.

ANUALPEC. Anuário da Pecuária Brasileira 1º ed, Instituto FNP e Agro FNP Pesquisas Ltda.São Paulo. Brasil, 2016.

CHEN. K. H. J. T. HUBER, J. SIMAS, C. B. THEURER, P. YU, S. C. CHAN, F. SANTOS, Z. WU, B. S. SWINGLE, AND E. J. DEPETERS. 1995. Effect of enzyme treatment or steam-flaking of sorghum grain on lactation and digestion in dairy cows. **Journal of Dairy Science**. 78:1721–1727.

CORREA C, E, S, et al, Relationship between corn vitreousness and ruminal in situ starch degradability. **Journal of Dairy Science**. University of Wisconsin. Madison, v85, n11. p,3008-3012, 2002.

FIRKINS, J.L., 1997. Effects of feeding nonforage fiber sources on site of fiber digestion. **Journal of Dairy Science**. 80, 1426-1437.

GADO, H. M., A. Z. M. SALEM, P. H. ROBINSON, AND M. HASSAN. 2009. Influence of exogenous enzymes on nutrient digestibility, extent of ruminal fermentation as well as milk production and composition in dairy cows. **Animal Feed Science Technology** 154:36–46.

HRISTOV, A. N. C. E., BASEL, A. MELGAR, A. E., FOLEY, J. K., ROPP, C. W., HUNT, AND J. M. TRICARICO. 2008, Effect of exogenous polysaccharide-degrading enzyme preparations on ruminal fermentation and digestibility of nutrients in dairy cows, **Animal Feed Science Technology**, 145:182–193.

HUNTINGTON, G, B, Starch utilization by ruminants: from basics to the bunk, **Journal of Animal Science**, Albany, v,75, p,852-867, 1997.

IBGE. Estatística da produção pecuária, 2017. Indicadores do IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2017. 47p.

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

KREHBIEL, C,R,; KREIKEMEIER, K,K,; FERRELL, C,L, Influence of Bos indicus crossbreeding and cattle age on apparent utilization of a high-grain diet. **Journal of Animal Science**. Savoy, v, 78, p, 1641-1647, 2000,

KOZLOSKI, V,G, Bioquímica dos ruminantes, 3 ed, 1º reimpressão, UFSM, Santa Maria, RS, 2016.

LEHESKA, J,; WULF, D, M,; CLAPPER, J, A,; THALER, R, C,; MADDOCK, R, J, 2002, Effects of high-protein/low-carbohydrate swine diets during the final finishing phase on pork muscle quality, **Journal of Animal Science**, 80:137-142.

MEALE, S. J.; BEAUCHEMIN, K. A.; HRISTOV, A. N.; CHAVES, A. V.; MCALLISTER, T.A. Board Invited Review: Opportunities and challenges in using exogenous enzymes to improve ruminant production. **Journal of Animal Science**, v. 92, p. 427-442, 2014.

MILLEN, D, D,; PACHECO, R, D, L,; ARRIGONI, M, D, B, et al, A snapshot of management practices and nutritional recommendations used by feedlot nutritionist in Brazil, **Journal of Animal Science**, jul, 2009, 38 p.

OLIVEIRA, C. A. MILLEN, D, D, Levantamento sobre as recomendações nutricionais e práticas de manejo adotadas por nutricionistas de bovinos confinados no Brasil: informações gerais e adaptação, **Revista Brasileira de Zootecnia**, v, 41, N, 7, 3 P, 2011.

OWENS, F, N,, ET AL, Acidosis in cattle: A review, **Journal of Animal Science**, v76, P,275-286, 1998.

PHILIPPEAU, C,; MARTIN, C,; MICHALET-DOREAU, B, Influence of grain source on ruminal characteristics and rate, site, and extent of digestion in beef steers, **Journal of Animal Science**, Savoy, v, 77, p, 1587-1596, 1999.

POLIZEL NETO, A,; BRANCO, R, H,; BONILHA, S, F, M; GOMES, H, F, B,; CORVINO, T, L, S, Papel dos Ácidos Graxos Voláteis na Deposição de Tecido Adiposo Intramuscular, 2008, Artigo em Hypertexto, Disponível em: <[http://www,infobibos,com/Artigos/2008_3/AcidosGraxos/index,htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2008_3/AcidosGraxos/index,htm)>, Acesso em: 20/12/2016.

RAMOS, B.M.O., CHAMPION, M., PONCET C., MIZUBUTI, I.Y., NOZIERE, P. 2009. Effects of vitreousness and particle size of maize grain on ruminal and intestinal in sacco degradation of dry matter, starch and nitrogen. **Animal Feed Science and Technology**. 148: 253-266.

ROJO, R., G, D, MENDOZA, S, S, GONZÁLEZ, L, LANDOIS, R, BÁRCENA, AND M, M, CROSBY, 2005, Effects of exogenous amylases from *Bacillus licheniformis* and *Aspergillus niger* on ruminal starch digestion and lamb performance, **Animal Feed Science and Technology**. 123–124:655–665.

ROONEY, L,W,; PFLUGFELDER, R,L, Factors affecting starch digestibility with special emphasis on sorghum and corn, **Journal of Animal Science**, Savoy, v, 63, p,1607-1623, 1986.

ROSENVOLD, K,; PETERSEN, J, S,; LAERKE, H, N,; JENSEN, S, K,; THERKILDSEN, M,; KARLSSON, A, K,; MOLLER, H, S,; ANDERSEN, H, J, 2001, Muscle glycogen stores and meat quality as affected by strategic finishing feeding of slaughter pigs, **Journal of Animal Science**, 79:382-391.

SANTOS, F.A.P.MENEZES JR,, M,P,; SIMAS, J,M,C, et al, Processamento do grão de milho e sua substituição parcial por polpa de citros peletizada sobre o desempenho, digestibilidade de nutrientes e parâmetros sanguíneos, **Acta Scientiarum**, v,23, n,4, p,923-931, 2001.

SEYMOUR B,, ET AL, (2005) Opponent appetitive-aversive neural processes underlie predictive learning of pain relief, **Natural Neuroscience**. 8:1234 –1240.

THEURER, C,B, Grain processing effects on starch utilization by ruminants, **Journal of Animal Science**, Albany, v,63, p,1649-1662, 1986.

TRICARICO, J, M., ET AL. Effects of a dietary aspergillus oryzae extract containing alfa-amylase activity on performance and carcass characteristics of finishing beef cattle, **Journal of Animal Science**, v85,P-802-811,2007.

ZEOULA, L,M,; CALDAS NETO, S,F, Recentes avanços em amido na nutrição de vacas leiteiras, In: Simpósio internacional em bovinocultura de leite, n2,, Lavras,**Anais**,,, Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2001, p,249-284, 2001.

CAPÍTULO 2

O artigo a seguir está redigido conforme normas de publicação do *Journal of Animal Science*, exceto pela língua tipo de letra e posicionamento das Tabelas e Figuras.

CAPÍTULO 2: Efeito da adição de alfa-amilase na fermentação ruminal e digestibilidade em bovinos Nelore

RESUMO

Em dietas com elevada inclusão de concentrado fornecidas para bovinos Nelore na terminação, a adição da enzima alfa-amilase exógena pode promover alterações na fermentação ruminal por agir na velocidade da clivagem do amido e conseqüentemente afetar o metabolismo do mesmo. Assim, este estudo foi conduzido com o objetivo de avaliar os efeitos da adição de extrato de *Aspergillus oryzae* contendo alfa-amilase em dietas com elevada inclusão de concentrado sobre a fermentação ruminal, metabólitos sanguíneos e digestibilidade em bovinos Nelore. Dez bovinos Nelore, canulados no rúmen, com peso corporal inicial de 400 ± 25 kg e 24 meses de idade, foram avaliados em delineamento em esquema *crossover* e distribuídos nos tratamentos: Controle (ausência de alfa-amilase) e Amilase (5g/animal/dia de extrato de *Aspergillus oryzae* contendo alfa-amilase – Amaize®, Alltech, Inc). A dieta foi fornecida *ad libitum* e composta por: bagaço de cana-de-açúcar (12 % MS), milho (62 % MS), polpa cítrica (17% MS), farelo de soja (4,7 % MS), Optigen®, ureia de liberação controlada (1,1% MS) e sal mineral (3,2 % MS). As características ruminais foram mensuradas a partir de amostras de líquido ruminal coletadas ao final de um período de 25 dias, já as amostras de sangue foram coletadas ao início e final deste mesmo período. A digestibilidade e balanço de compostos nitrogenados foram mensurados, concomitantemente, por meio de coleta total de fezes e urina, respectivamente (3 dias consecutivos por 24 horas). Os dados foram analisados utilizando um modelo misto que incluiu o efeito fixo de tratamento e efeito aleatório de período e animal. As médias foram comparadas pelo teste-t e as diferenças consideradas a partir do $P < 0,05$ e tendências foram discutidas quando $0,05 \geq P \leq 0,10$. A concentração de propionato foi maior para animais recebendo Amilase (18,8 vs. 20,4 mM/100 mM; $P = 0,027$). Animais recebendo Amilase apresentaram tendências de diminuição na concentração de acetato e conseqüentemente na relação acetato:propionato (60,6 vs. 59,5 mM/100 mM; $P \leq 0,0885$), assim como a concentração de insulina plasmática nos animais que receberam Amilase tendeu a ser menor ($P = 0,06$). A digestibilidade da PB e FDN tenderam a ser maiores em animais que receberam Amilase ($P \leq 0,066$). O balanço de compostos nitrogenados não sofreu efeito ($P = 0,519$) do uso da Amilase. O extrato de *Aspergillus oryzae* contendo alfa-amilase

pode ser usado para aumentar a concentração de propionato ruminal e aproveitar melhor os nutrientes da dieta (PB e fibra).

Palavras-chave: Aditivos, *Aspergillus oryzae*, enzima, flúido ruminal, insulina, propionato

CHAPTER 2: Effect of alpha-amylase enzyme on ruminal variables and digestibility in Nellore cattle

ABSTRACT

In diets with high inclusion of concentrate supplied to Nellore cattle at the termination, the addition of the exogenous alpha-amylase enzyme may promote changes in ruminal fermentation by acting at the rate of starch cleavage and consequently affecting the metabolism thereof. Thus, the objective of this study was to evaluate the effects of *Aspergillus oryzae* containing alpha-amylase extract in diets with high inclusion of concentrate on ruminal fermentation, blood metabolites and digestibility in Nellore. Ten Nellore bulls rumen cannulated (initial body weight 400 ± 25 kg and age of 24 months) were housed in individual pens. The experimental design was *crossover*, in which the animals were randomized between treatments 1: Control - absence of amylase and 2: Amylase -*Aspergillus oryzae* extract containing alpha amylase activity (Amaize[®], Alltech, Inc.), 5 g/animal daily. The diet was composed of: sugar cane bagasse (12 % DM), corn (62 % DM), citrus pulp (17% DM), soybean meal (4,7 % DM), Optigen[®], a controlled-release urea (1,1% DM) and mineral salt (3,2 % DM). The parameters evaluated were plasma concentrations of insulin, glucose, and beta-hydroxybutyrate plus molar proportions of volatile fatty acids (VFA), pH and ammonia concentration in rumen fluid. The data were analyzed using the MIXED procedure of SAS, the means were compared by the t-test and the differences considered from the $P < 0.05$ and trends were discussed when $0.05 \geq P \leq 0.10$. The concentration of propionate was higher for animals receiving Amylase (18.8 vs, 20.4 mM/100 mM, $P = 0.027$). Animals from the Amylase group showed decreasing trends in acetate concentration and consequently in acetate:propionate ratio (60, 6 vs. 59.5 mM/100 mM, $P \leq 0.0885$), as well as the plasma insulin concentration in animals receiving Amylase tended to be lower ($P = 0.062$). The digestibility of CP and NDF tended to be higher in animals receiving Amylase ($P \leq 0.066$). The balance of nitrogenous compounds was not affected ($P = 0.519$) of the use of Amylase. The extract of *Aspergillus oryzae* containing alpha-amylase can be used to increase ruminal propionate concentration and to make better use of dietary nutrients (CP and fiber).

Key-words: *Aspergillus oryzae*, blood, enzyme, insulin, rumen fluid

INTRODUÇÃO

A moagem de grãos de milho é o método de processamento mais utilizado no Brasil, com o intuito de quebrar as ligações dos grânulos de amido, tornando susceptível a absorção de água e ação do complexo enzimático de microorganismos presentes no rúmen (McAllister et al., 2001). Assim, a amilose e a amilopectina que compõem o grânulo de amido são hidrolisadas e utilizadas pelos microorganismos para a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (Rojo et al., 2005). Alguns estudos propõem a inclusão de isoenzimas exógenas para somar o efeito de degradação já existente nos animais pela ação das enzimas endógenas dos microorganismos (Chen et al., 1995; McAllister et al., 2001; Hristov et al., 2008; Gado et al., 2009; Dilorenzo et al., 2011).

Com a hidrólise do amido, os açúcares solúveis liberados são prontamente utilizados pelos microorganismos para a produção de AGCC, o que torna o mecanismo mais intenso e as proporções de ácidos graxos, como NH_3 , e pH podem ser alteradas. Além de serem observados também, maiores taxas de síntese de proteína microbiana, em contrapartida há a diminuição da população de protozoários que são sensíveis a alterações no pH (Rojo et al., 2005; Gado et al., 2009). Esse maior acesso dos microorganismos a compostos prontamente disponíveis beneficia não só bactérias amilolíticas, como as não amilolíticas, assim espera-se melhoras nas digestibilidades tanto do amido, quanto de outros nutrientes que compõem a dieta (Hristov et al., 2008). Consequentemente, os metabólitos formados no período pós absorptivos também podem sofrer alterações em função dessa maior utilização dos nutrientes no rúmen (Defrain et al., 2005; Tricarico et al., 2007).

Entretanto, ainda há muita variação nos resultados encontrados pelas pesquisas com adição de enzimas exógenas na alimentação de ruminantes, além de serem praticamente em totalidade com animais taurinos com aptidão leiteira e com tipo de milho mais digestível, quando comparado ao tipo utilizado no Brasil (“*flint*”) (Chen et al., 1995; McAllister et al., 2001; Defrain et al., 2005; Hristov et al., 2008; Klingerman et al., 2008; Gado et al., 2009; Dilorenzo et al., 2011). Desta forma é importante avaliar o efeito da inclusão da enzima em dietas que contenham um tipo de milho mais duro e se os mecanismos de degradação são

similares em zebuínos, pois a digestibilidade do alimento é inerente a características tanto do alimento, quanto do animal. Assim, este estudo foi conduzido com o objetivo de avaliar os efeitos da adição de extrato de *Aspergillus oryzae* contendo alfa-amilase em dietas com elevada inclusão de concentrado sobre variáveis ruminais, sanguíneas e digestibilidade em bovinos Nelore.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido de acordo com as regras do bem-estar animal, aprovado pelo comitê de Ética da FCAV/UNESP/Jaboticabal-SP, Brasil (número 015610/14), conforme a lei número 11977 do Estado de São Paulo, Brasil (São Paulo, 2005).

Local, Animais, delineamento e período experimental. O experimento foi realizado no Pólo Regional de Desenvolvimento Tecnológico dos Agronegócios da Alta Mogiana (PRDTA – Alta Mogiana) em Colina – SP, Brasil. A pesquisa foi desenvolvida utilizando dez machos da raça Nelore, não castrados, canulados no rúmen (24 meses de idade média e 400 ± 25 kg de peso corporal médio inicial).

Logo após a recuperação total da cirurgia para colocação de cânulas no rúmen, os animais passaram por um processo de adaptação a dieta. Nos quinze primeiros dias de adaptação (25 dias no total), a dieta foi fornecida com teor protéico e fibroso mais elevado (Tabela 1) para que o animal tivesse condições nutricionais em desenvolver o trato digestório adequadamente ao novo tipo de dieta mais energética. Nos dez dias restantes de adaptação, a dieta com maior concentração energética foi fornecida no período da tarde 16:00 horas.

O delineamento experimental foi em um esquema *crossover*, no qual os tratamentos foram atribuídos aos animais dentro de cada período (unidade experimental), sendo dois tratamentos: 5 animais por tratamento. Quando os animais já estavam adaptados a dieta, houve a adaptação a enzima (25 dias), a duração do período foi baseada no tempo médio necessário para compor um período de coleta neste tipo de delineamento.

Desta forma, o esquema em *crossover* foi composto por: Adaptação 1 (25 dias) – Adaptação de 5 animais a adição da enzima; Período 1 - Avaliação (25 dias), no qual foram coletadas amostras que comprovassem modificações no

metabolismo. Na sequência, os animais passaram por um intervalo de descanso (*wash-out*, 25 dias) e em seguida a distribuição dos tratamentos foi atribuída inversamente aos animais, ou seja, os 5 animais que estavam no grupo controle, passaram a receber enzima e os 5 animais que receberam enzima, passaram a receber a dieta controle. Assim, passaram novamente por um período de adaptação a enzima (Adaptação 2), a duração do período foi mantida em 25 dias, para que os períodos de adaptação e de avaliação (Período 2), fossem equidistantes. Totalizando 125 dias de período experimental no delineamento *crossover*.

Os animais foram alocados em baias individuais, semi-cobertas, com piso de concreto, equipadas com cochos de alimentos e bebedouros individuais.

Dieta, tratamentos, manejo alimentar e consumo. A dieta experimental foi composta por bagaço de cana-de-açúcar (*in natura*), milho moído grosso em moinho do tipo martelo (4-mm), polpa cítrica e blend (farelo de soja, ureia com degradação lenta e sal mineral). A dieta foi formulada para fornecer nutrientes necessários para ganho de peso corporal médio esperado de 1,5 kg/dia e consumo de 2% do PC (Tabela 1).

Tabela 1. Ingredientes e composição química da dieta de bovinos Nelore recebendo Amilase na terminação em confinamento

Ítem	Dietas - g/kg MS	
	Inicial	Final
Bagaço de cana-de-açúcar*, g/kgMS	211	124
Milho moído, g/kgMS	472	625
Polpa cítrica, g/kgMS	162	171
Blend ¹² , g/kgMS	155	80
VO:CO ³	20:80	12:88
<i>Composição nutricional</i>		
Amido, %	-	65,5
MO, %	90,5	91,1
PB, %	16,2	14,5
FDN, %	31,8	25,2
FDA, %	18,8	14,0
EE, %	3,6	4,16
NDT, %	75,7	78,6
EM,Mcal/kg	2,73	2,96

¹ Blend protéico da dieta nos 15 dias iniciais da adaptação: 79% de farelo de soja; 18% núcleo mineral³; 3% Optgem[®] (proteína de degradação lenta), ² Blend protéico da dieta nos demais dias de experimento: farelo de soja 52 g/kgMS; núcleo mineral³ 36 g/kgMS; Optgem[®] (proteína de degradação lenta) 12 g/kgMS, ³Núcleo mineral: zinco 728mg, ferro 221mg, flúor 100 mg, cálcio 116g, selênio 3 mg fósforo 14g manganês 226mg, cobre 221mg, cobalto 29mg, iodo 21mg, sódio 44g, enxofre 43g, potássio 47g, NNP-equiv. Proteína 109%, Monensina Sódica 1.000 mg, Virginiamicina 500 mg, Vitaminas A (23 KIU/animal/d), D (3 KIU/animal/d) e E (112 KIU/animal/d). ³ VO:CO = Proporção da quantidade de volumoso e concentrado da dieta.

Os tratamentos consistiram no fornecimento de mesma dieta com elevada inclusão de concentrado (12:88, volumoso:concentrado), variando apenas a ausência ou presença de enzimas amilolíticas exógenas (Extrato de *Aspergillus oryzae* α -amilase - Amaize[®] - Alltech Inc., Nicholasville, KY). Os tratamentos estão caracterizados:

Tratamento 1 – Controle : dieta experimental ausente de enzimas;

Tratamento 2 – Amilase: dieta experimental com presença de extrato de *Aspergillus oryzae* contendo alfa-amilase (em pó);

O aditivo extrato de *Aspergillus oryzae* contendo alfa-amilase (em pó) foi fornecido na quantidade de 5 g/animal/dia (conforme recomendação do fabricante). O extrato foi homogeneizado ao concentrado da dieta, previamente ao fornecimento da refeição aos animais.

As enzimas produzidas pelo fungo *Aspergillus oryzae* em procedimento em meio aquoso, apresentam uma coloração mais escura (marron), estabilidade e ação garantida dentro das variações de temperatura e pH (30° até 39° C e pH 4,8 até 6,8, respectivamente). A atividade enzimática da alfa-amilase foi determinada de acordo com o procedimento descrito no Food Chemicals Codex (1996). Uma unidade de dextrinação de alfa-amilase (DU) foi definida como a quantidade de enzima necessária para dextrinizar amido solúvel a taxa de 1g/h a 30° C e pH 4,8. Foi possível constatar 301 DU/g de extrato adicionado, assim, 5g/ animal/dia fornece, em média, 1505 DU/g de extrato por dia.

A quantidade de alimento oferecida para cada animal foi previamente estabelecida de acordo com o PC e a MS da dieta. O ajuste diário de alimento oferecido foi calculado considerando a sobra do dia anterior, a qual variou entre 1 a 3% da quantidade total de alimento oferecido.

A dieta foi dividida em duas refeições, 50% as 8:00 e 50 % as 16:00 horas. Na refeição da manhã foi fornecido 2,5g de Amilase e no período da tarde 2,5g de Amilase, totalizando 5g/dia, devidamente homogeneizadas ao concentrado da dieta. A ação da enzima contida no extrato de *Aspergillus oryzae* é ativada em meio aquoso. Para maior controle experimental, houve a escolha de adicioná-la e misturá-la ao concentrado da dieta no momento em que as refeições foram dadas aos animais, garantindo assim que os animais consumiriam a enzima imediatamente e sua ação iniciasse no rúmen.

O consumo de alimento individual foi obtido pela diferença entre a quantidade de alimento oferecido e as sobras diárias.

Análises químicas. Amostras de ingredientes da dieta, sobras e fezes, de cada animal, foram pré-secas em estufa de ventilação forçada a 55° C por 72h para

determinação da MS (nº do método 934.01, AOAC, 1995), moídas em moinho do tipo Wiley a 1 mm (Tecnal 680, Piracicaba, Brasil), e secas por 8h em estufa a 105° C para determinar a MS.

A análise químico-bromatológica foi realizada no laboratório do PRDTA – Alta Mogiana em Colina/SP, proteína bruta (PB) (nº do método 978.04, AOAC, 1995), extrato etéreo (EE) (nº do método 920.39, AOAC, 1995), cinzas (MM)(nº do método 942.05, AOAC, 1995) (AOAC, 1995), amido adaptado de Bach Knudsen et al, (1984), fibra em detergente neutro (FDN), segundo Mertens et al, (2002).

Os carboidratos totais (CT) foram calculados segundo metodologia descrita por Sniffen et al, (1992), em que $CT (\%) = 100 - (\%PB + \%EE + \%Cinzas)$, A quantificação dos carboidratos não fibrosos (CNF) foi obtido de acordo com adaptação de Hall (2000) utilizando a equação:

$$CNF = 100 - [(\%PB - \%PB \text{ da uréia} + \%ureia) + \%FDNcp + \%EE + \%cinzas]$$

Os nutrientes digestíveis totais (NDT) foram calculados segundo equação sugerida pelo BR-Corte (2010), a partir da composição dos alimentos avaliados utilizando-se a equação:

$$NDT = PBD + CNFD + FDND + 2,25 \times EED - 7 \times FNDD$$

Onde: NDT = nutrientes digestíveis totais; PBD = proteína bruta verdadeira digestível; CNFD = carboidratos não fibrosos verdadeiros digestíveis; FDND = fibra em detergente neutro digestível; EED = extrato etéreo digestível; FNDD = nutrientes digestíveis totais fecal e 7 refere-se ao valor do NDT fecal metabólico.

Pesagens e variáveis sanguíneas. Os pesos corporais foram obtidos em procedimento padrão de pesagem de bovinos, após 16 horas de jejum de sólidos e água, no início e final de cada período experimental de 25 dias. As coletas de sangue foram realizadas nas mesmas ocasiões, as quais, foram coletadas por meio de venopulsão da veia jugular em tubos *Vacutainer*[®] de 10 mL, contendo heparina sódica (Vacutainer Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Os tubos Vacutainers foram homogeneizados e acondicionados, imediatamente após a venopunção, em recipientes refrigerados a 4°C. As amostras foram centrifugadas

a 1500 × g, por 20 min em temperatura ambiente para a separação do plasma, conforme descrito por Kerr (2003) e as aliquotas foram armazenadas em tubos eppendorfs a -20° C.

A concentração plasmática de glicose foi mensurada por método colorimétrico utilizando kit enzimático (LaborLab®, São Paulo, Brasil). A concentração de Beta-hidroxibutirato (BHBA) foi mensurada por cinética (UV) e quantificada por ensaio colorimétrico (Randox Laboratories® Ltd, Ardmore, Diamond Road, Crumlin, Co, Antrim, United Kingdom). Ambos os métodos foram determinados em espectrofotômetro semi-automático (Labquest – Ranbut - BTS-370; Biosystems, Barcelona, Spain). A concentração de insulina foi mensurada por meio do método ELISA (Multiscam MS; Labsystems, Vantaa, Finland), que baseia-se na interação anticorpo-antígeno, utilizando kit comercial (Accubind; Monobind, Inc. Lake Forest, CA). O coeficiente de variação (CV) intraensaio para insulina foi de 7,3; 6 e 5,8% para baixo, médio e alto padrão, respectivamente, e o CV para o interensaio foi de 10; 5,2 e 6,9% para baixo, médio e alto padrão, respectivamente.

Características ruminais. O fluido ruminal foi coletado no 20º dia (de cada período de avaliação), por meio da canula no rúmen, respeitando a cronologia de 0, 2, 6, 12 e 16h após a alimentação da manhã. O material proveniente das regiões inferior, central e superior do interior do rúmen, foi coletado e acondicionado em panos de poliéster com porosidade de 0,5 mm, para que assim fosse filtrado e o fluido originado foi então armazenado em recipientes adequados. O restante do material sólido foi amostrado em pequenas porções e acondicionado em um dos recipientes que já continha o fluido adquirido na primeira etapa da coleta, este procedimento foi necessário para posterior contagem de protozoários.

Em cada horário de coleta de fluido foi separada a quantidade correspondente a contagem de protozoários, que ao final do dia de coleta foi homogeneizada e gerada uma amostra composta de todos os horários. Para contagem de protozoários foram colhidas alíquotas de 10 mL de fluido ruminal com material sólido, as quais foram diluídas em 50% em formaldeído, posteriormente armazenadas em temperatura ambiente para contagem microscópica. A

identificação e a quantificação dos gêneros de ciliados foram feitas em câmara Sedgewick-Rafter, segundo Dehority (1984).

Nas amostras de fluido ruminal foram mensurados o pH, a concentração de nitrogênio amoniacal (NNH_3) e de ácidos orgânicos. As mensurações de pH foram realizadas imediatamente após as coletas, por intermédio de pHmetro digital (MA522 model, Marconi Laboratory Equipment, Piaracicaba, SP, Brasil). Para a determinação de amônia ruminal foi separada uma alíquota de 50 mL, acondicionada em recipiente de plástico contendo 1,0 mL de H_2SO_4 (1:1), posteriormente foram centrifugadas a 4°C e $1500 \times g$ por 30 minutos e determinados em espectrofotômetro manual (FEMTO) conforme Noel e Hambleton (1976).

Para determinação dos ácidos orgânicos foram coletadas alíquotas de 5 mL em cada tempo amostral, armazenados em frascos contendo 1 mL de ácido fórmico (H_2COO) e congeladas a -20°C . As determinações foram feitas segundo método descrito por Erwin et al. (1961) utilizando cromatografo gasoso (GC2014, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) equipado com HP-INNOWax capillary column (30 m \times 0,32 mm; Agilent Technologies, Colorado, USA). Foram calculadas as proporções molares dos ácidos acéticos, butírico e propiônico, assim como a relação acetato:propionato e a quantidade total de ácidos graxos voláteis (mM/100 mM).

Digestibilidade, balanço de compostos nitrogenados e eficiência microbiana. Para determinação da digestibilidade da dieta, amostras totais de fezes foram coletadas diretamente no piso da baias nos dias 21^o ao 23^o dia de cada período (3 dias consecutivos de coleta). Ao final de 24 horas de coleta, a massa total das fezes foi registrada e após homogeneização foi retirado 10% da massa total para análise bromatológicas. As fezes foram secas em estufa de ventilação forçada a 55°C por 72 horas, moídas em moinho tipo Willey com peneira de 1mm, e foram compostas referentes aos 3 dias de coleta para cada animal em cada período.

A digestibilidade total da MS, matéria orgânica (MO), proteína, fibra em detergente neutro (FDN) e amido foram estimadas pela diferença entre o consumido e excretado, em relação ao consumido. A digestibilidade do amido

também foi calculada por meio de duas equações propostas por Zinn et al. (2007): Digestibilidade do amido em função da % do ingerido, calculado pela equação:

$$\text{DGA, \% do ingerido} = 100 \times \{1 - [(0,938 - 0,497 \times \text{NF} + 0,0853 \times \text{NF}^2) \times \text{AF}/\text{AD}]\},$$

Onde NF é a % de N fecal, AF é % de amido nas fezes e AD é a % do amido na dieta (Zinn et al., 2007); e

DGA = digestibilidade do amido, calculado pela equação

$$\text{DGA, \%} = 99,9 - 0,413 \times \text{AF} - 0,0131 \times \text{AF}^2,$$

Onde AF é % de amido nas fezes (Zinn et al., 2007);

Concomitante com as coletas de fezes foram realizadas coletas de urina total (3 dias consecutivos, de 24 horas de coleta). Por meio de coletores, a urina foi armazenada em baldes (20 L), contendo 200 mL de ácido sulfúrico a 20% (H₂SO₄) e após 24 horas, foram homogenizadas e amostradas em 40 mL para serem analisadas quanto aos teores de nitrogênio total. As análises de alantoína e de ácido úrico na urina foram feitas por método colorimétrico, conforme Chen e Gomes (1992). A excreção total de derivados de purinas foi calculada pela soma das quantidades de alantoína e ácido úrico excretados na urina, expressas em mmol/dia.

O balanço de nitrogênio foi obtido a partir da diferença entre o N consumido e o excretado nas fezes e urina em g/dia.

As purinas absorvidas (Y, mmol/dia) foram calculadas a partir da excreção de derivados de purinas (X, mmol/dia), por intermédio da equação:

$$Y = (X - 0,385\text{PV}^{0,75}) / 0,85,$$

Onde, 0,85 é a recuperação de purinas absorvidas como derivados de purinas e 0,385PV^{0,75}, a contribuição endógena para a excreção de purinas (Verbic et al., 1990).

A síntese ruminal de compostos nitrogenados (Y, g Nmic/dia), foi calculada em função das purinas absorvidas (X, mmol/dia), utilizando-se a equação descrita por Chen & Gomes (1992), com exceção da relação N purinas:N total das bactérias de 0,134:

$$Y = 70X/0,83 \times 0,134 \times 1000,$$

Onde: 70 é o conteúdo de N de purinas (mgN/mol); 0,134, a relação N purinas:N total nas bactérias; e 0,83, a digestibilidade das purinas bacterianas.

Análise estatística. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade e homocedacidade usando histogramas e testes estatísticos formais do programa SAS (SAS Int. INC., Cary, NC.). Os dados que não apresentaram distribuição normal (contagem de protozoários) foram transformados usando Log₁₀.

O modelo estatístico proposto considerou os efeitos aleatórios de período e animal e o efeito fixo de tratamento. O animal dentro de período foi considerado como unidade experimental para todos parâmetros avaliados por meio de procedimento MIXED do SAS (9.0) (SAS Int. INC., Cary, NC). A diferença mínima significativa de fisher foi aplicada para comparação entre as médias e as diferenças foram consideradas ao nível de 5 % de probabilidade e tendencia discutida a 10% de probabilidade.

Para as variáveis sanguíneas, o valor médio obtido para cada animal foi calculado a partir da média das concentrações nas coletas inicial e final. A concentração na coleta no início da adaptação foi testada como covariável, mas não apresentou efeito no modelo estatístico e assim foi retirada.

As variáveis pH ruminal, nitrogênio amoniacal e ácidos graxos de cadeia curta foram analisadas como medidas repetidas no tempo utilizando o procedimento MIXED do SAS. O modelo incluiu os efeitos aleatórios de período e animal e os efeitos fixos de tratamento e o horário de coleta de amostras de fluido ruminal. O horário de coleta foi utilizado como repeated e o subject foi período, animal e tratamento. Foram averiguadas as interações entre tratamento e hora. Dentre todas as estruturas de erro investigadas, a estrutura diagonal principal

“banded” (UN (1)) foi a melhor de acordo com o critério de informação bayesiano (BIC).

RESULTADOS

Variáveis ruminais e sanguíneas. Embora verificar as diferenças entre as médias em função dos modelos estatísticos seja mais usual e direto. Houve a escolha de apresentar na Tabela 2. a análise descritiva das variáveis ruminais e sanguíneas, a fim de fomentar informações diretas sobre valores médios de tais variáveis para a espécie bovina e demonstrar que as mesmas estão dentro da variação relatada na literatura, conforme os trabalhos de Richardson et al., 2002; Richardson and Herd, 2004; Kelly et al., 2010, 2011a, b; Lawrence et al., 2011.

Tabela 2. Médias, desvio-padrão (DP), mínimo e máximo de variáveis ruminais e sanguíneas em bovinos Nelore recebendo extrato de *Aspergillus oryzae* contendo alfa-amilase em dietas com elevada inclusão de concentrado na terminação e Amplitude destas variáveis em bovinos, conforme relatado na literatura

Item	Média	DP	Mínimo	Máximo	Amplitude ¹
<i>Variáveis ruminais</i>					
Total AGCC mM ²	114,5	28,1	50,5	189	87 – 123
Acetato, mM/100 mM	60,0	3,40	44,0	66,6	52 – 65
Propionato, mM/100 mM	19,6	4,50	11,1	44,0	18 – 32
Butirato, mM/100 mM	8,93	1,51	4,90	12,4	7 – 18
Acetato:propionato	3,23	0,78	1,00	5,20	2 – 12
pH	6,55	0,50	5,47	7,59	5,2 – 7,2
Nitrogênio Amoniacal mg/dL	3,23	0,78	1,00	5,20	1,23 – 12,5
<i>Variáveis sanguíneas</i>					
Glicose, mg/dL	75,4	12,0	59,2	105	25 – 112
Insulina, µU / mL	22,3	13,7	4,06	66,8	3,8 – 34,6
Beta-hidroxibutirato, mmol/L	0,28	0,08	0,14	0,41	0,104 – 4,23

¹Amplitude de variação média de acordo com a literatura; ²Isobutirato, isovalerato, e valerato não foram demonstrados, mas foram incluídos para o cálculo de AGCC total.

Houve interação entre a adição de Amilase e o horário da coleta de fluido ruminal, após o fornecimento de 50% da dieta, para a variável pH ruminal (P =

0,0385), (Figura 1) Sendo que no horário 0 e 2 após a refeição da manhã, os valores de pH ruminal dos animais do grupo Controle foram superiores aos do grupo que recebeu a Amilase, até que a partir do horário das 2 as 4 horas após o fornecimento de 50% da dieta os valores de pH dos animais do grupo Controle, passaram a ser inferiores ao dos animais que receberam Amilase. O mesmo comportamento da variável pode ser observado para os tratamentos nos horários de 4, 6, 12 e 16 horas após o fornecimento de 50% da dieta, as médias de pH ruminal para os animais que receberam Amilase foram superiores. O segundo fornecimento da dieta foi seis horas após a primeira alimentação.

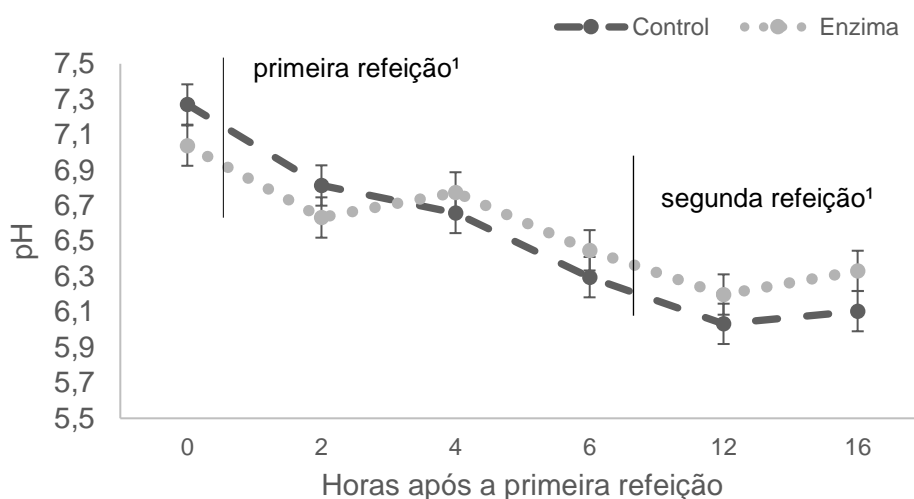


Figura 1. Valores de pH ruminal, ao longo do tempo, em bovinos Nelore recebendo extrato de *Aspergillus oryzae* contendo alfa-amilase em dietas de elevada inclusão de concentrado na terminação. 150% da dieta total. Interação tratamento e hora ($P = 0,0385$).

As quantidades de butirato e nitrogênio amoniacal ($N-NH_3$) (Tabela 3), não sofreram efeito da adição de Amilase ($P \leq 0,1253$). Entretanto a concentração molar de propionato foi maior em animais recebendo Amilase ($P = 0,0272$), enquanto que o acetato e a relação de acetato:propionato ($P = 0,0582$ e $0,0881$, respectivamente), tenderam a ser menores com a presença da Amilase.

Tabela 3. Concentrações das variáveis ruminais em bovinos Nelore recebendo extrato de *Aspergillus oryzae* contendo alfa--amilase em dietas de elevada inclusão de concentrado na terminação

Item	Tratamentos		EPM ¹	P-Valor
	Controle	Amilase 5g/animal/dia		
Total AGCC mM ²	114,72	114,74	4,87	0,9951
Acetato, mM/100 mM	60,57	59,50	0,64	0,0582
Propionato, mM/100 mM	18,8	20,45	1,43	0,0272
Butirato, mM/100 mM	9,32	8,65	0,36	0,1253
Acetato:propionato	3,33	3,12	0,27	0,0881
Nitrogênio mg/dL	Amoniacal, 14,8	15,8	1,30	0,4821

¹Erro padrão da média; ²Isobutirato, isovalerato, e valerato não foram demonstrados, mas foram incluídos para o cálculo de AGCC total.

A adição de Amilase nas dietas não influenciou ($P \geq 0,1784$) a contagem total de protozoários conforme podemos ver na Tabela 4.

Tabela 4. Contagem (log) de protozoários no fluido ruminal de bovinos Nelore recebendo extrato de *Aspergillus oryzae* contendo alfa-amilase em dietas de elevada inclusão de concentrado na terminação

Item	Tratamentos		EPM ¹	P-Valor
	Controle	Amilase 5g/animal/dia		
Total de prozotoários, log	13,8	10,8	0,80	0,3973
Entodinium, log	13,4	10,5	0,41	0,4190
Dasytricha, log	2,52	2,71	0,26	0,9691
Isotricha, log	1,76	1,15	0,29	0,1784
Metadinium, log	8,90	8,70	0,26	0,4501
Eudiplodinium, log	8,59	8,31	0,52	0,1902

¹Erro padrão da média;

As concentrações plasmáticas de glicose e o beta-hidroxibutirato, não sofreram efeito da adição da Amilase ($P \geq 0,4821$), como mostrado na Tabela 5. As concentrações plasmáticas de insulina nos animais recebendo Amilase tenderam a ser menores ($P = 0,0622$), quando comparados aos animais do grupo Controle.

Tabela 5. Concentrações plasmáticas de variáveis sanguíneas em bovinos Nelore recebendo extrato de *Aspergillus oryzae* contendo alfa-amilase em dietas de elevada inclusão de concentrado na terminação

Item	Concentração Inicial	Tratamentos Final		EPM ¹	P-Valor
		Controle	Amilase 5g/animal/dia		
Glicose, mg/dL	77,5	74,1	76,8	6,60	0,4821
Insulina, μ IU / mL	16,2	27,8	16,9	4,05	0,0622
Betahidroxibutirato, mmol/L	0,26	0,28	0,28	0,03	0,9681

¹Erro padrão da média;

Digestibilidade e balanço de compostos nitrogenados. A adição da amilase não causou efeito no CMS dos animais ($P = 0,6661$) e digestibilidade da MS ($P = 0,2214$). No entanto, tanto o coeficiente de digestibilidade da PB ($P = 0,0641$), quanto o coeficiente de digestibilidade do FDN ($P = 0,0662$) tenderam a ser diferentes quanto a adição da Amilase nas dietas, sendo em todos os casos, o valor médio, destas variáveis, superior para animais que receberam Amilase em relação aos animais do grupo Controle.

Os coeficientes de digestibilidade da MO e os coeficientes de digestibilidade do amido, não sofreram efeito da adição da Amilase nas dietas ($P \geq 0,1613$).

Tabela 6. Consumo de matéria seca (CMS) e coeficientes de digestibilidade da matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN) e Amido de bovinos Nelore recebendo extrato de *Aspergillus oryzae* contendo alfa-amilase em dietas com elevada inclusão de concentrado na terminação

Item	Tratamentos		EPM ¹	P-Valor
	Controle	Amilase 5g/animal/dia		
CMS, kg	10,12	10,21	1,12	0,6661
DigMS, %	81,77	82,98	1,42	0,2214
DigMO, %	85,38	85,71	0,74	0,1613
DigPB, %	97,87	98,07	0,19	0,0641
DigFDN, %	60,53	66,75	2,67	0,0662
DigAmido ²	92,03	93,13	1,57	0,4301
DGAIn ³	83,12	81,21	2,82	0,6371
DGA ⁴	94,25	94,29	1,214	0,9742

¹Erro padrão da média; ²Digestibilidade no trato digestivo total calculada pela diferença do ingerido com o excretado de amido, dividido pelo ingerido; ³DGA = digestibilidade do amido (Zinn et al., 2007); ⁴DGA = digestibilidade do amido (Zinn et al., 2007); DigMS = digestibilidade da MS; DigMO = digestibilidade da MO; DigPB = digestibilidade da PB; DigFDN = digestibilidade da FDN.

Em relação ao balanço de compostos nitrogenados, não houve efeito da adição de amilase na dieta para as variáveis balanço de N (%), excreção de

derivados de purina, (mmol), proteína e eficiência microbiana (g Nmic/MODR) ($P \geq 0,5191$).

Tabela 7. Balanço de Nitrogênio (N), excreção de derivados de purinas totais (DPt) e síntese ruminal de N microbiano de bovinos Nelore recebendo extrato de *Aspergillus oryzae* contendo alfa-amilase em dietas com elevada inclusão de concentrado

Ítem	Tratamentos		EPM ¹	P-Valor
	Controle	Amilase 5g/animal/dia		
Balanço de N, %	21,86	22,81	2,75	0,5191
Excreção DPt ² , mmol/dia	107,60	123,57	70,05	0,6671
Proteína Microbiana	327,4	380,4	180	0,6821
N mic/MODR	36,59	37,98	16,53	0,9040

¹Erro padrão da média; DPt²= Derivados de purinas totais.

DISCUSSÃO

Considerando que a adição de enzimas exógenas amilolíticas propõe uma maior taxa de utilização do amido no ambiente ruminal, uma vez que esta adição tem efeito somatório ao processo natural de degradação de polissacarídeos por meio de sistemas enzimáticos associados as membranas das bactérias (Meale et al., 2014) as variáveis envolvidas neste meio tendem a sofrer alterações.

A interação observada entre horário de coleta de flúido ruminal e tratamento para pH ruminal, pode ser explicada a partir do mecanismo de aderência e colonização bacteriana as partículas do alimento, considerando as quatro fases dessa colonização: contato aleatório, adesão não específica, interação específica e induzida com as moléculas presentes na superfície externa da bactéria, que reconhecem os receptores na superfície exposta da partícula do alimento e por último a proliferação celular e formação de colônias sobre as partículas digestíveis do alimento (Kozloski, 2016). Assim, os valores de pH ruminal, embora tenham diminuído para ambos os tratamentos ao longo do tempo, foram superiores nos animais recebendo amilase exógena, possivelmente pela diminuição da competição nos sítios de ligação específica entre as bactérias e a superfície da

partícula devido ao suposto aumento na presença de açúcares solúveis (Kozloski, 2016).

Tricarico et al. (2005) não observou diferenças entre os valores de pH ao avaliar o efeito do extrato de *Aspergillus oryzae* contendo alfa-amilase na fermentação ruminal *in vivo* e *in vitro* em dietas com elevada inclusão de concentrado, fornecidas a vacas em lactação. Entretanto, Assis et al., (2012) verificou que a amplitude de variação no pH para ação enzimática de enzimas amilolíticas avaliadas *in vitro*, foi pouco expressiva e condicionou maior pH no meio de atividade. Isso pode estar associado ao fato de que enzimas originárias, da ação de *Aspergillus oryzae* em planos submersos de culturas, são mais estáveis e tem sua atividade no mínimo de 30° C e 4,8 pH, chegando a atuar em média em pH 6,2 e 38°C em condições ruminais. Outro fator que contribuiu para que pH continuasse maior para o tratamento com enzima é o fato de que o coeficiente de digestibilidade da fibra tendeu a ser maior para o tratamento com Amilase.

A concentração molar de propionato foi 8,72% maior em animais que receberam a Amilase. Devido a possível ação das alfa-amilases na hidrólise das ligações no interior da cadeia do polímero do amido, supostamente liberando maltose que foi prontamente utilizada pelas bactérias amilolíticas, as quais degradam estes monossacarídeos a propionato. Este aumento observado na concentração molar de propionato corrobora com os resultados observados por Lara (2017) que avaliou o efeito da enzima amilolítica na digestibilidade, fermentação ruminal e síntese de proteína microbiana em ovinos recebendo dietas de silagem de milho com elevada inclusão de grão. Gado et al. (2009) trabalhando com variáveis ruminais de bovinos leiteiros observou aumento da concentração de AGCC total em animais que receberam Amilase.

Por se tratar de uma dieta rica em grãos, esperava-se menor contagem total de protozoários do tipo holotríquias, devido a sua maior capacidade de engolfar grânulos de amido, e a proposta da enzima é justamente quebrar estes grânulos e as bactérias por sua vez utilizam os açúcares solúveis.

O que poderia também limitar a quantidade de protozoários é o fato de que conforme a intensificação no uso das pentoses acontece, há maior necessidade do uso de co-fatores enzimáticos (NADH e FADH) e com isso há a formação de

ácido láctico, que por sua vez pode contribuir para a queda do pH do rúmen e afetar a população de protozoários (Kozloski, 2016). Porém no atual estudo, não foi observado efeito, entretanto Rojo et al. (2005) verificou queda na população de protozoários no líquido ruminal em ovinos alimentados com uma dieta com elevada inclusão de sorgo (70% MS) e que testou a ação da enzima amilolíticas provenientes de dois tipos de fungos.

Tricarico et al. (2007) avaliando vacas leiteiras, consumindo dietas com elevada inclusão de concentrado (milho moído) e silagem de milho, observaram efeito da adição de amilase nas concentrações de beta hidroxibutirato (BHBA) e glicose no sangue de vacas leiteiras, na ocasião, os autores demonstraram que as concentrações de BHBA aumentaram, enquanto que as de glicose diminuíram conforme a adição de Amilase. No presente estudo a ausência de efeito da amilase, sob o as concentrações de BHBA provavelmente discorre da ausência de efeito na concentração de butirato destes animais e embora o propionato seja um dos principais precursores da produção de glicose via neoglicogênese, os tecidos que constituem o estômago, o ceco e o intestino grosso utilizam os ácidos graxos como substrato energético, enquanto que a maior parte da glicose absorvida a partir do amido é utilizada pelas próprias células do epitélio intestinal, não sendo encontrada em abundância no sistema portal (Tricarico et al., 2007).

Os valores de insulina tenderam a ser menores em animais que receberam amilase, tal fato pode estar relacionado aos mecanismos de fome e saciedade em bovinos, uma vez que as concentrações plasmáticas de insulina remete a um status de equilíbrio nutricional entre as entradas e saídas de fontes glicídicas nos tecidos, desta forma este hormônio anorexígeno não sofre estímulos para ser secretado (Lawrence et al., 2011).

Além disso, se observarmos os valores da concentração inicial de insulina, será possível perceber que os animais que receberam Amilase mantiveram a mesma concentração inicial (16,2 $\mu\text{IU} / \text{mL}$ – inicial e 16,9 $\mu\text{IU} / \text{mL}$ – final), já a concentração da glicose aumentou (16,2 para 27,8 $\mu\text{IU} / \text{mL}$). Tal dado pode estar relacionado ao fato de que os animais que consumiram Amilase, otimizaram o uso do amido no rúmen, o qual foi convertido a propionato e assim proporcionou maior energia para os animais utilizarem no desempenho. Já os animais do grupo Controle, obtiveram o fluxo comum do amido que não foi utilizado no rúmen e

passou para o intestino delgado e grosso, onde também pode ser digerido (Santos).

Nesse local, a ação da amilase pancreática é mais efetiva e com isso há a quebra do amido em glicose, a qual é demandada principalmente pelos tecidos do intestino, desta forma não sendo liberada na corrente sanguínea e não apresentando alteração na concentração plasmática, conforme observamos. Porém o fato que pode elucidar mais os mecanismos envolvidos no presente estudo é que conforme a glicose é utilizada e passa pela fosforilação oxidativa, há um influxo de sódio, com isso a liberação de insulina é desencadeada para que a mesma, passe a transportar a glicose para a célula e assim armazene o excedente de glicose em glicogênio e tecido adiposo (McAllister et al., 2001). Este fato elucidou a tendência de aumento de insulina nos animais do grupo Controle.

Os coeficientes de digestibilidade da PB e FDN foram 12,09 e 9,66%, respectivamente, maiores para os animais que receberam Amilase. Tais resultados já foram reportados na literatura quando foram avaliados os efeitos de amilases nas dietas de elevada inclusão de grãos para bovinos de corte ou leite (Chen et al., 1995; Hristov et al., 2008; Gado et al., 2009). Essas diferenças nos coeficientes de digestibilidade podem ser em função do maior aporte de maltose que serve como substrato prontamente disponível para microorganismos amilolíticos ou não-amilolíticos. Assim como os polissacarídeos, a degradação de proteínas no rúmen é efetuada por sistemas multienzimáticos associados à membrana celular bacteriana. Após a degradação extracelular, os peptídeos, aminoácidos e açúcares solúveis resultantes, são prontamente captados e usados, respectivamente pelas bactérias, mantendo o sistema em equilíbrio (Kozloski, 2016).

Outro fato relevante é que em estudos realizados por Dilorenzo et al., (2011) avaliando o efeito da adição de amilase no metabolismo de vacas leiteiras, observaram melhor digestibilidade da FDN, quando as proporções do mesmo eram baixas, dentro da dieta de elevada inclusão de concentrado. McAllister et al. (2001) discutiram que o fornecimento de enzimas exógenas para bovinos de corte, representam somente uma fração da atividade enzimática no rúmen combinada com a capacidade inerente da microbiota ruminal para a digestão da fibra. O que indica que a presença de enzimas amilolíticas podem prover um melhor ambiente

para os microorganismos amilolíticos e não-amilolíticos, porém não necessariamente aumenta a população dos mesmos. Tal fato pode ser considerado no presente estudo, quando observamos a ausência de efeito da adição de enzima sobre as variáveis do balanço de compostos nitrogenados. Embora a discussão nos leve para uma melhora no ambiente ruminal com a adição da enzima, a mesma não teve o poder de inferir efeitos sobre a síntese microbiana, Gado et al. (2009), no entanto observou-se maior síntese microbiana em gado de leite recebendo amilase.

Embora os coeficientes de digestibilidades dos nutrientes mencionados anteriormente tenham sofrido efeito da adição de amilase na dieta, os coeficientes de digestibilidade do amido não foram diferentes entre os tratamentos. Conforme já reportado por Santos et al. (2001) a digestibilidade do amido em dietas com elevada inclusão de grãos com a presença de grãos de milho processados (moído – fino) representa mais do que 90% do total ingerido e conforme o local de digestão essa proporção pode ser mais ou menos efetiva em ruminantes. Assim, a possível maior digestibilidade do amido da dieta promovida pela ação da enzima a nível ruminal, pode ter sido igualada a nível intestinal, uma vez que a mesma é inativada pela digestão gástrica e o tempo de permanência da digesta no intestino é relativamente curto (Owens et al., 1998), tal fato elucida novas propostas de pesquisas avaliando o efeito da adição de enzimas em dietas de elevada concentração de concentrado, porém avaliando a digestibilidade em diferentes compartimentos do aparelho digestório de bovinos Nelore.

CONCLUSÃO

O extrato de *Aspergillus oryzae* contendo alfa-amilase em dietas com elevada inclusão de concentrado aumenta a concentração de propionato ruminal, assim como, otimiza a digestibilidade aparente da proteína e FDN no trato total de bovinos Nelore terminados em confinamento.

REFERÊNCIAS

- Anualpec, Anuário da Pecuária Brasileira 1st ed, Instituto FNP e Agro FNP. Pesquisas Ltda, São Paulo, Brasil, 2016.
- Association of Official Analytical Chemist, AOAC. 1995. 16th. ed. Arlington: [AOAC], 1995.
- Bach Knudsen, K. E.; P. Aman, and B. O. Eggum. 1987. Nutritive Value of Danish-grown Barley Varieties, I, Carbohydrates and Other Major Constituents. *Journal of Cereal Science*, 6:173-186.
- Correa C. E.S., et al, Relationship between corn vitreousness and ruminal in situ starch degradability, *Journal of Dairy Science*, University of Wisconsin, Madison, v85, n11, p,3008-3012, 2002.
- Chen, X. B.; Gomes, M,J, Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives- an overview of technical details, International feed research unit, Aberdeen Rowett Research Institute, 1992, 21p, (Occasional publication).
- Chen, K, H., J, T, Huber, J, Simas, C, B, Theurer, P, Yu, S, C, Chan, F, Santos, Z, Wu, B, S, Swingle, and E, J, DePeters, 1995, Effect of enzyme treatment or steam-flaking of sorghum grain on lactation and digestion in dairy cows, *J, Dairy Sci*, 78:1721–1727.
- Dehority, B. A. 1984, Evaluation of subsampling and fixation procedures used for counting rumen protozoa, *Appl, Environ, Microbiol*, 48: 182-185.
- DiLorenzo, N., Smith, D.R. Quinn, M. J, May, M.L., Ponce, C. H., Steinberg, W., Engstrom, M. A. Galyean, M. L. 2011. Effects of grain processing and supplementation with exogenous amylase on nutrient digestibility in feedlot diets. *Livest. Sci.* 137, 178-184.

Food Chemicals Codex, 1996. 4th ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.

Gado, H, M. A, Z, M, Salem, P, H, Robinson, and M, Hassan, 2009, Influence of exogenous enzymes on nutrient digestibility, extent of ruminal fermentation as well as milk production and composition in dairy cows, *Anim, Feed Sci, Technol*, 154:36–46.

Hall, M. B., 2000, Neutral detergent-soluble carbohydrates nutritional relevance and analysis, Gainesville: University of Florida, 42 p, (Bulletin, 339).

Hale, W, H, Influence of processing on the utilization of grains (starch) by ruminants, *Journal of Animal Science*, Champaign, v37, n,04, p,1075-1080, mar 1973.

Hristov, A, N., C, E, Basel, A, Melgar, A, E, Foley, J, K, Ropp, C, W, Hunt, and J, M, Tricarico, 2008, Effect of exogenous polysaccharide- degrading enzyme preparations on ruminal fermentation and digestibility of nutrients in dairy cows, *Anim, Feed Sci, Technol*, 145:182–193.

Kelly, A, K., M, McGee, D, H, Crews Jr. A, G, Fahey, A, R, Wylie, and D, A, Kenny, 2010, Effect of divergence in residual feed intake on feeding behavior, blood metabolic variables, and body composition traits in growing beef heifers, *J, Anim, Sci*, 88:109–123, doi:10,2527/jas,2009-2196.

Kelly, A, K., M, McGee, D. H. Crews Jr., C. O. Lynch, A. R. Wylie, R. D. Evans, and D. A. Kenny, 2011a, Relationship between body measurements, metabolic hormones, metabolites and residual feed intake in performance tested pedigree beef bulls, *Livest, Sci*, 135:8–16, doi: 10.1016/j.livsci.2010,05,018.

Kelly, A. K., S. M., Waters, M., McGee, R. G., Fonseca, C., Carberry, and D. A., Kenny, 2011b, mRNA expression of genes regulating oxidative phosphorylation in the muscle of beef cattle divergently ranked on residual feed intake, *Physiol, Genomics* 43:12–23, doi:10.1152/physiolgenomics.00213.2009.

Kerr, M. G., 2003, Exames laboratoriais em medicina veterinária: Bioquímica clínica e hematologia, (In Portuguese,) 2nd ed, Roca, São Paulo, Brazil.

Kozloski, V.G, Bioquímica dos ruminantes, 3 ed, 1º reimpressão, UFSM, Santa Maria, RS, 2016.

Lawrence, P., D. A. Kenny, B. Earley, D. H. Crews Jr. and M, McGee, 2011. Grass silage intake, rumen and blood variables, ultrasonic and body measurements, feeding behavior, and activity in pregnant beef heifers differing in phenotypic residual feed intake. *J, Anim, Sci*, 89:3248–3261. doi:10.2527/jas.2010-3774.

McAllister, T. A. A. N, Hristov, K. A. Beauchemin, L. M. Rode, and K.-J. Cheng, 2001, Enzymes in ruminants diets. In: M, R, Bedford and G, G, Partridge, editors. *Enzymes in farm animal nutrition*. CAB International, Wiltshire, UK.

Meale, S. J.; Beauchemin, K. A.; Hristov, A. N.; Chaves, A. V.; McAllister, T.A. Board Invited Review: Opportunities and challenges in using exogenous enzymes to improve ruminant production. *Journal of Animal Science*, v. 92, p. 427-442, 2014.

Oliveira, D. M. Expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico no músculo de bovinos de corte alimentados com fontes de lipídeos. 2013, 145p, Tese – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

Owens, F. N., et al, Acidosis in cattle: A review. *Journl of Animal Science*, v76, p,275-286, 1998.

- Passini, R, et al, Parâmetros de fermentação ruminal em bovinos alimentados com grãos de milho ou sorgo de alta umidade ensilados, Revista Brasileira de Zootecnia, Pirassununga, v,22, n,5, p,1266-1274, maio 2002.
- Richardson, E. C. R. M. Herd, J. A. Archer, and P. F. Arthur, 2004, Metabolic differences in Angus steers divergently selected for residual feed intake. Anim, Prod, Sci, 44:441–452, doi:10,1071/EA02219.
- Richardson, E. C., R. M. Herd, I. G. Colditz, J. A. Archer, and P. F. Arthur, 2002. Blood cell profiles of steer progeny from parents selected for and against residual feed intake. Anim, Prod, Sci, 42:901–908, doi:10,1071/EA01098.
- Rojo, R. G. D, Mendoza, S. S. González, L. Landois, R. Bárcena, and M. M. Crosby, 2005, Effects of exogenous amylases from *Bacillus licheniformis* and *Aspergillus niger* on ruminal starch digestion and lamb performance. Anim, Feed Sci. Technol, 123–124:655–665.
- Santos, F. A. P., Menezes JR., M. P. Simas, J.M.C. Processamento do grão de milho e sua substituição parcial por polpa de citros peletizada sobre o desempenho, digestibilidade de nutrientes e parâmetros sanguíneos. Acta Scientiarum, v,23, n,4, p,923-931. 2001,
- Seymour B, et al, (2005) Opponent appetitive-aversive neural processes underlie predictive learning of pain relief. Nat Neurosci 8:1234 –1240.
- Tricarico, J. M. J. D, Johnston, K, A, Dawson, K, C, Hanson, K, R, McLeod, and D, L, Harmon, 2005, The effects of an *Aspergillus oryzae* extract containing alpha-amylase activity on ruminal fermentation and milk production in lactating Holstein cows, Anim, Sci, 81:365–374.

Tricarico, J, M., et al. Effects of a dietary *Aspergillus oryzae* extract containing alfa-amylase activity on performance and carcass characteristics of finishing beef cattle. Journal of Animal Science, v85 p-802-811.2007.

Van Soest, P, J. Nutritional ecology of the ruminant. 2,ed. Ithaca: Comstock Publishing Assciations, 1994.476p.

Zinn, R. A., A, Barreras, L. Corona, F, N, Owens, and R, A, Ware, 2007. Starch digestion by feedlot cattle: Predictions from analysis of feed and fecal starch and nitrogen. J, Anim, Sci, 85:1727-1730.

CAPÍTULO 3

O artigo a seguir está redigido conforme normas de publicação do *Journal of Animal Science*, exceto pela língua, tipo de letra e o posicionamento das Tabelas e Figuras.

CAPÍTULO 3: Efeito da adição de enzima alfa-amilase no desempenho e qualidade da carne em bovinos Nelore terminados em confinamento

RESUMO

A maior utilização de amido no rúmen devido a adição de enzimas exógenas pode causar alterações nos metabólitos pós absorptivos e inferir diferenças no desempenho dos animais. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do uso de extrato de *Aspergillus oryzae* contendo alfa-amilase em dietas de confinamento com alta inclusão de concentrado para bovinos Nelore. Foram utilizados quarenta e dois bovinos, não castrados (peso corporal inicial de 353 ± 13 kg e idade média de 24 meses), distribuídos em baias individuais, em um delineamento experimental em blocos casualizados (em função do PC inicial) com dois tratamentos: 1) Dieta Controle - sem Amilase e 2) Dieta com Amilase - 5 g /animal/diariamente de extrato de *Aspergillus oryzae* contendo alfa-amilase - Amaize®, Alltech, Inc). A dieta foi fornecida *ad libitum* na proporção 12:88 volumoso:concentrado. O experimento durou 96 d, (sendo 24 d de adaptação). Os animais foram pesados em jejum no início e final do experimento e sem jejum em 3 pesagens intermediárias a cada 24 dias durante o período experimental. Os animais foram abatidos e as características de carcaça foram avaliadas. Um bife de 2,5 cm foi retirado do músculo *Longissimus thoracis* para avaliação da qualidade da carne (pH, cor (CIE), perdas por cocção, força de cisalhamento e ácidos graxos) . Os dados foram analisados utilizando o procedimento MIXED do SAS, considerando efeito fixo do tratamento e bloco como efeito aleatório. As diferenças entre as médias foram comparadas pelo teste t com 5% de probabilidade e tendências discutidas entre 5 e 10% de probabilidade. Entre as características de desempenho, o PC final, peso de carcaça quente (PCQ) e os ganhos tanto em PC quanto em peso de carcaça tenderam a ser maiores para animais que receberam Amilase ($P \leq 0,09$), o que corresponderia a quase 8,5 kg a mais de peso de carcaça em comparação com animais do grupo controle. Para os atributos de qualidade da carne, houve diferenças para a cor L^* (luminosidade) ($P = 0,041$) e tendências para a cor b^* (amarelada) ($P = 0,07$). A cor L^* (37,80 vs. 40,01) e b^* (13,98 vs. 15,33) tiveram valores mais baixos em animais que receberam Amilase, comparados com o controle, respectivamente. O teor de ácidos graxos hipocolesterolêmicos foi maior para Amilase ($P = 0,049$),

correspondendo a 5,92% superior em detrimento ao grupo controle. Portanto, o uso de extrato de *Aspergillus oryzae* contendo alfa-amilase em dietas de confinamento com alta inclusão de concentrado pode melhorar o desempenho de bovinos Nelore.

Palavras chave: ácidos graxos, *Aspergillus oryzae*, carcaça, coloração

CHAPTER 3: Effect of alfa - amylase enzyme on performance and meat quality in Nellore cattle

ABSTRACT

The increased use of starch in the rumen due to the addition of exogenous enzymes may cause changes in the post-absorptive metabolites and infer differences in the animal's performance. Thus, the objective of this study was to evaluate the effect of amylase addition in high concentrate diets on performance, carcass measurements and meat quality of Nellore cattle. Forty-two Nellore bulls, (initial body weight of 353 ± 13 kg and average age of 24 months) were used. The animals were evaluated on performance, distributed in individual pens. The experimental design was in randomized blocks (blocked by initial BW) with two treatments: 1) Control diet – no enzymes and 2) Amylase diet – the presence of 5g/head daily *Aspergillus oryzae* containing alpha amylase activity (Amaize[®], Alltech, Inc.). The diet was *ad libitum* in the ratio 12:88: roughage: concentrated. The experiment lasted 96 d, (24 d of adaptation). The animals were weighed without fasting at the beginning and end of the experiment and without fasting in 3 intermediate weighings every 24 days during the experimental period. The animals were slaughtered and the carcass characteristics were evaluated. Carcasses were chilled, and one 2,5-cm steak was taken from *Longissimus thoracis* muscle, The steaks were individually vacuum packaged and frozen at -18 °C, Frozen steaks were thawed, and the meat quality of muscle (pH, instrumental color (CIE), cooking loss, shear force and fatty acids) were determined, The data were analyzed using the MIXED procedure of SAS, considering the fixed effect of treatment and BWt block as a random effect. The differences between the means were compared by the t test with 5% probability and trends discussed between 5 and 10% probability. Among the performance characteristics, the final BW, hot carcass weight (HCW) and gains in both BW and carcass weight tended to be higher for animals receiving Amylase ($P = 0.09$), which would correspond to almost 9 kg more carcass weight compared to control animals. For the meat quality attributes, there were differences for the color L^* (luminosity) ($P = 0.041$) and tendencies for the color b^* (yellow) ($P = 0.07$), the color L^* (37.80 vs. 40.01) and b^* (13.98 vs. 15.33) had lower values in animals receiving Amylase, compared to control, respectively. The content of hypocholesterolemic fatty acids was higher for Amilase ($P = 0.049$), corresponding

to 5.92% higher in detriment to the control group. Therefore, the use of exogenous enzymes in high concentrate diets can improve performance in Nellore bulls.

Keywords: *Aspergillus oryzae*, carcass, coloration, fatty acids

INTRODUÇÃO

As dietas de confinamento utilizam o milho como principal fonte de energia aos animais (Santos et al., 2016). Dependendo do arranjo estrutural do grão de milho, o amido nele contido pode ser indisponível por estar envolvido numa matriz protéica rígida e desenvolvida. Assim, a moagem é um processamento muito utilizado para sanar estes problemas. Mas ainda assim, quando comparamos os tipos de milho e processamento, há variações inerentes ao método e híbrido (Santos et al., 2016). Por esta razão é comum o uso de aditivos para potencializar o uso dos nutrientes da dieta

Dentre os aditivos usados, as enzimas exógenas propõem um efeito somatório ao já existente nos processos de digestão e seu uso tem revelado benefícios na produção animal (Histrov et al., 2008; Klingerman et al., 2008, Tricarico et al., 2007).

Entretanto as pesquisas desenvolvidas são basicamente para avaliar animais quanto a produção de leite e os que mensuraram desempenho em bovinos de corte, em geral, são em animais de origem taurina (Tricarico et al., 2007^a; Dilozenzo et al., 2011). O que gera uma lacuna em relação a resposta animal a nível de produção brasileira, que tem predominância pela criação de zebuínos (ABIEC, 2017).

Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da adição de extrato de *Aspergillus oryzae* contendo alfa-amilase em dietas com elevada inclusão de concentrado sobre o desempenho, eficiência alimentar, características da carcaça e qualidade da carne de bovinos Nelore.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido de acordo com as regras do bem-estar animal, aprovado pelo comitê de Ética da FCAV/UNESP/Jaboticabal-SP, Brasil (número 015610/14), conforme a lei número 11977 do Estado de São Paulo, Brasil (São Paulo, 2005).

Local, Animais, delineamento e período experimental. O experimento foi realizado no Pólo Regional de Desenvolvimento Tecnológico dos Agronegócios da Alta Mogiana (PRDTA – Alta Mogiana) em Colina – SP, Brasil. A pesquisa foi

desenvolvida utilizando quarenta e dois machos da raça Nelore, não castrados (24 meses de idade média e 353 ± 13 kg de peso corporal médio inicial). O delineamento experimental foi em blocos casualizados, em função do peso corporal (PC) inicial. O experimento teve duração de 96 dias sendo 24 dias de adaptação a dieta e instalação.

Os animais foram alocados em baias individuais, semi-cobertas, com piso de concreto, equipadas com cochos de alimentos e bebedouros individuais.

Dieta, tratamentos, manejo alimentar e consumo. A dieta foi formulada para fornecer nutrientes necessários para ganho de peso corporal médio esperado de 1,5 kg/dia e consumo de 2% do PC (Tabela 1).

Tabela 1. Ingredientes e composição química da dieta de bovinos Nelore recebendo Amilase na terminação em confinamento

Ítem	Dieta - g/kg MS	
	Inicial	Final
Bagaço de cana-de-açúcar*, g/kgMS	211	124
Milho moído, g/kgMS	472	625
Polpa cítrica, g/kgMS	162	171
Blend ¹² , g/kgMS	155	80
VO:CO ³	20:80	12:88
<i>Composição nutricional</i>		
Amido, %	-	65,5
MO, %	90,5	91,1
PB, %	16,2	14,5
FDN, %	31,8	25,2
FDA, %	18,8	14,0
EE, %	3,6	4,16
NDT, %	75,7	78,6
EM,Mcal/kg	2,73	2,96

¹ Blend protéico da dieta nos 15 dias iniciais da adaptação: 79% de farelo de soja; 18% núcleo mineral³; 3% Optgem[®] (proteína de degradação lenta), ² Blend protéico da dieta nos demais dias de experimento: farelo de soja 52 g/kgMS; núcleo mineral³ 36 g/kgMS; Optgem[®] (proteína de degradação lenta) 12 g/kgMS, ³Núcleo mineral: zinco 728mg, ferro 221mg, flúor 100 mg, cálcio 116g, selênio 3 mg fósforo 14g manganês 226mg,

cobre 221mg, cobalto 29mg, iodo 21mg, sódio 44g, enxofre 43g, potássio 47g, NNP-equiv. Proteína 109%, Monensina Sódica 1.000 mg, Virginiamicina 500 mg, Vitaminas A (23 KIU/animal/d), D (3 KIU/animal/d) e E (112 KIU/animal/d).³ VO:CO = Proporção da quantidade de volumoso e concentrado da dieta.

Os tratamentos consistiram no fornecimento de mesma dieta com elevada inclusão de concentrado (12:88, volumoso:concentrado), variando apenas a ausência ou presença de enzimas amilolíticas exógenas (Extrato de *Aspergillus oryzae* α -amilase - Amaize[®] - Alltech Inc., Nicholasville, KY). Os tratamentos estão caracterizados abaixo:

Tratamento 1 – Controle : dieta experimental ausente de enzimas;

Tratamento 2 – Amilase: dieta experimental com presença de extrato de *Aspergillus oryzae* contendo alfa-amilase (em pó);

O aditivo extrato de *Aspergillus oryzae* contendo alfa-amilase (em pó) foi fornecido na quantidade de 5 g/animal/dia (conforme recomendação do fabricante). O extrato foi homogeneizado ao concentrado da dieta, previamente ao fornecimento da refeição aos animais.

As enzimas produzidas pelo fungo *Aspergillus oryzae* em procedimento em meio aquoso, apresentam uma coloração mais escura (marron), estabilidade e ação garantida dentro das variações de temperatura e pH (30° até 39° C e pH 4,8 até 6,8, respectivamente). A atividade enzimática da alfa-amilase foi determinada de acordo com o procedimento descrito no Food Chemicals Codex (1996). Uma unidade de dextrinação de alfa-amilase (DU) foi definida como a quantidade de enzima necessária para dextrinizar amido solúvel a taxa de 1g/h a 30° C e pH 4,8. Foi possível constatar 301 DU/g de extrato adicionado, assim, 5g/ animal/dia fornece, em média, 1505 DU/g de extrato por dia.

A quantidade de alimento oferecida para cada animal foi previamente estabelecida de acordo com o PC e a MS da dieta. O ajuste diário de alimento oferecido foi calculado considerando a sobra do dia anterior, a qual variou entre 1 a 3% da quantidade total de alimento oferecido.

A dieta foi dividida em duas refeições, 50% as 8:00 e 50 % as 16:00 horas. Na refeição da manhã foi fornecido 2,5g de Amilase e no período da tarde 2,5g de Amilase, totalizando 5g/dia, devidamente homogeneizadas ao concentrado da dieta. A ação da enzima contida no extrato de *Aspergillus oryzae* é ativada em meio aquoso. Para maior controle experimental, houve a escolha de adicioná-la e

misturá-la ao concentrado da dieta no momento em que as refeições foram dadas aos animais, garantindo assim que os animais consumiriam a enzima imediatamente e sua ação iniciasse no rúmen.

O consumo de alimento individual foi obtido pela diferença entre a quantidade de alimento oferecido e as sobras diárias.

Análises químicas. Amostras de ingredientes da dieta, sobras e fezes, de cada animal, foram pré-secas em estufa de ventilação forçada a 55° C por 72h para determinação da MS (nº do método 934.01, AOAC, 1995), moídas em moinho do tipo Wiley a 1 mm (Tecnal 680, Piracicaba, Brasil), e secas por 8h em estufa a 105° C para determinar a MS.

A análise químico-bromatológica foi realizada no laboratório do PRDTA – Alta Mogiana em Colina/SP, proteína bruta (PB) (nº do método 978.04, AOAC, 1995), extrato etéreo (EE) (nº do método 920.39, AOAC, 1995), cinzas (MM)(nº do método 942.05, AOAC, 1995) (AOAC, 1995), amido adaptado de Bach Knudsen et al, (1984), fibra em detergente neutro (FDN), segundo Mertens et al, (2002).

Os carboidratos totais (CT) foram calculados segundo metodologia descrita por Sniffen et al, (1992), em que $CT (\%) = 100 - (\%PB + \%EE + \%Cinzas)$, A quantificação dos carboidratos não fibrosos (CNF) foi obtido de acordo com adaptação de Hall (2000) utilizando a equação:

$$CNF = 100 - [(\%PB - \%PB \text{ da uréia} + \%ureia) + \%FDNcp + \%EE + \%cinzas]$$

Os nutrientes digestíveis totais (NDT) foram calculados segundo equação sugerida pelo BR-Corte (2010), a partir da composição dos alimentos avaliados utilizando-se a equação:

$$NDT = PBD + CNFD + FDND + 2,25 \times EED - 7 \times FNDD$$

Onde: NDT = nutrientes digestíveis totais; PBD = proteína bruta verdadeira digestível; CNFD = carboidratos não fibrosos verdadeiros digestíveis; FDND = fibra em detergente neutro digestível; EED = extrato etéreo digestível; FNDD = nutrientes digestíveis totais fecal e 7 refere-se ao valor do NDT fecal metabólico.

Desempenho abate e características da carcaça. Os pesos foram obtidos em procedimento padrão de pesagem de bovinos, após 16 horas de jejum de sólidos e água, no início e final de cada período experimental de 100 dias. A cada 24 dias de período (totalizando 3) os animais foram pesados sem a condição de jejum, para não haver prejuízos no desempenho.

Foram avaliados o consumo de matéria seca (CMS), calculados o ganho médio diário (GMD), a eficiência alimentar (EA). O GMD foi determinado em função do peso corporal inicial e final com jejum prévio de sólidos e líquidos por 16 horas. No início do experimento, foram abatidos seis animais, indivíduos que tinham peso corporal inicial que representava os demais animais do lote. O abate destes animais foi feito no início do experimento para estimar qual o peso de carcaça inicial que os demais animais do lote, possuíam ao início do experimento.

Por meio da utilização de equação de regressão entre o peso corporal inicial, em jejum, e peso de carcaça dos animais abatidos inicialmente, foi obtido o peso de carcaça inicial dos animais que não foram abatidos:

$$Y = 0,283 x + 85,227 (R^2 = 0,970),$$

Onde: Y= peso de carcaça inicial; x: peso corporal em jejum.

Ao final dos 96 dias de confinamento, todos os animais foram abatidos. O abate foi realizado em frigorífico comercial na cidade de Barretos/SP distante da APTA-Colina/SP em 20 km. Os procedimentos de abate seguiram o Regulamento de Inspeção Sanitária e Industrial para Produtos de Origem Animal (Brasil, 1997). Todas as carcaças foram identificadas e pesadas, obtendo-se o peso de carcaça quente (PCQ) e o rendimento de carcaça (RC). Após 24 horas na câmara fria, as carcaças foram novamente pesadas obtendo assim o peso de carcaça fria (PCF) e a perda por resfriamento (PPR). O pH foi aferido após 24 horas de resfriamento da carcaça entre a 12^a e 13^a costelas, no músculo longissimus. Foi utilizado um potenciômetro (Sentron, modelo 1001, Holanda) acoplado a uma sonda (Sentron, LanceFET 2074-008) com sistema de identificação digital, sensor de compensação de temperatura e eletrodo de vidro apropriado para determinação de pH em profundidade.

Na meia-carcaça direita, foram determinados o comprimento (Compr) e a profundidade da carcaça (Profun), o tamanho de coxão (Tcoxão) e o perímetro de coxão (Pcoxão), seguindo metodologia descrita por Müller (1987). O índice de compacidade da carcaça (ICC) foi determinado entre a relação do PCF e o comprimento da carcaça. Na meia-carcaça direita foi realizada a pesagem dos cortes primários e seus rendimentos (dianteiro, ponta de agulha e traseiro especial), conforme preconiza a padronização de cortes de carne bovina, aprovada pela Portaria SIPA nº 5, de 08 de novembro de 1988.

Foram sorteados 12 animais representantes de cada tratamento (24 animais no total) para mensurar e retirar amostras (bifes) e assim, efetuar as análises das características da carcaça e qualidade da carne.

A partir da secção do músculo longissimus entre a 12^a e a 13^a costelas, foi determinada a área de olho de lombo (AOL), retirando o decalque da peça em folha de retroprojeter e a área medida com régua quadriculada; a medida da espessura de gordura subcutânea (EGS) foi realizada com auxílio de um paquímetro.

Avaliação da qualidade da carne. Após 24 horas do abate, dos 24 animais sorteados e representantes de cada tratamento (12/tratamento), foram coletados um total de 3 bifés, do músculo longissimus, de 2,54-cm de espessura por animal, identificados, embalados a vácuo. Dois bifés foram utilizados para determinação da coloração, perda de peso por cozimento (PPC) e força de cisalhamento e um bife para determinar o perfil de ácidos graxos. As análises da coloração, PPC e força de cisalhamento da carne foram realizadas no Laboratório de Qualidade de Carne do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras.

A determinação da cor da carne e gordura foi realizada como descrito por Houben et al. (2000), utilizando um colorímetro Minolta (modelo CM 700, Konica Minolta, Sensing, Osaka, Japan). Para obtenção dos índices de cor foi estabelecido o sistema CIELAB, iluminante A, ângulo de 10° para o observador e luz especular excluída (SCE). A luminosidade (L*), índice de vermelho (a*) e índice de amarelo (b*) foram obtidos para cada amostra. Trinta minutos antes da avaliação, as amostras foram removidas da embalagem a vácuo e superfície exposta ao ar para a oxigenação de mioglobina (Tapp III et al., 2011), os mesmos

procedimentos foram feitos para a medição de cor de gordura. A cor foi medida em cinco pontos e os valores médios calculados.

A maciez foi avaliada através do método Warner-Bratzler Shear Force (WBSF), As amostras foram descongeladas em geladeira a 4°C durante 24 horas e assados numa chapa tipo “Grill” (George Foreman) com aquecimento inferior e superior. As temperaturas dos bifes foram monitoradas com o auxílio de um termômetro com haste colocada no centro geométrico de cada bife até a temperatura atingir 68°C (Wheeler et al., 1997), quando então os bifes foram retirados e deixados à temperatura ambiente para serem arrefecidos. Seis núcleos de 1 cm² por 2,54 cm de comprimento foram removidos de cada bife paralelo ao eixo longitudinal das fibras musculares. Cada núcleo foi cortado uma vez no centro, perpendicular à direção da fibra por uma lâmina tipo Warner-Bratzler ligado a um texturômetro TAXT2, a uma velocidade de 5,0 mm s⁻¹ no pré e pós-teste, e a uma velocidade de 3,3 mm s⁻¹ durante o teste. A perda por cocção foi calculada como a diferença entre o peso dos bifes, antes e depois de assados.

A análise do perfil de ácidos graxos da carne foi realizada no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia do Departamento de Nutrição e Produção Animal na Universidade de São Paulo. O perfil de ácidos graxos foi determinado pelo método de extração de Folch et al, (1957), a gordura separada foi metilada e os ésteres metílicos foram formados de acordo com Kramer et al, (1997). Para o processo de metilação foram utilizados dois padrões internos o ácido esteárico (C18:0) e o ácido nonadecanóico (C19:0) para quantificação das perdas do processo. Os ácidos graxos foram quantificados por cromatografia gasosa (GC-2010 Plus - Shimadzu, auto-injetor AOC 20i), usando coluna capilar SP-2560 (100 m x 0,25 mm de diâmetro com 0,02 mm de espessura, Supelco, Bellefonte, PA). A temperatura inicial foi de 70°C, com aquecimento progressivo (13°C/min) até chegar a 175 °C, mantendo por 27 minutos. Em seguida, um novo aumento de 4 °C/minuto foi iniciado até 215 °C, e mantido durante 31 minutos. Hidrogênio foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 40 cm³/s.

A avaliação dos ácidos graxos quanto a sua funcionalidade (Hipercolesterolêmicos; Hipocolesterolêmicos e Neutros) foi feita conforme equações a seguir:

Hipercolesterolêmicos = C14:0 + C14:1 + C16:0 + C16:1;

Hipocolesterolêmicos = C18:1n9 + C18:2n6 + 20:4n6;

Neutros = C18:0.

Analise estatística. O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados, compostos por 42 animais, 2 tratamentos e 21 blocos (o número de blocos foi necessário porque classificamos os animais do mais pesado ao mais leve e a cada 2 animais sorteávamos e atribuíamos os tratamentos, garantindo a equivalência de média e desvio-padrão para os dois tratamentos), sendo o tratamento considerado efeito fixo e o bloco efeito aleatório.

O modelo matemático é representado a seguir:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + B_j + e_{ij}$$

Onde Y_{ij} = valor observado na unidade experimental (animal) que recebeu o tratamento i , bloco j ; μ = efeito geral da média; B_j = efeito do bloco j ; T_i = efeito do tratamento i ; e_{ij} = erro aleatório (resíduo).

Todos os dados foram verificados quanto a normalidade da distribuição das variâncias pelo teste de Kramér-von Mises, com 5% de probabilidade e, os dados que não apresentaram distribuição normal foram transformados na base log. Os dados foram analisados utilizando o PROC MIXED do SAS (9.0) (SAS Int. INC., Cary, NC). A diferença mínima significativa de Fisher foi aplicada para comparação entre as médias e as diferenças foram consideradas ao nível de 5 % de probabilidade e tendência discutida a 10% de probabilidade.

RESULTADOS

Houve efeito da adição de Amilase em dietas com elevada inclusão de concentrado para as variáveis peso corporal e ganho médio diário no período da adaptação e foi possível observar tendências de superioridades nos segundo e terceiro período ($P = 0,010, 0,0512$ e $0,091$, respectivamente) (Figura 1).

O peso corporal no final tendeu a ser superior para animais que consumiram a amilase ($P = 0,091$) (Tabela 2). Assim como houve tendência para superior ganho médio diário em animais que receberam Amilase, em relação aos do grupo controle ao final do experimento ($P = 0,09$) Tabela 2.

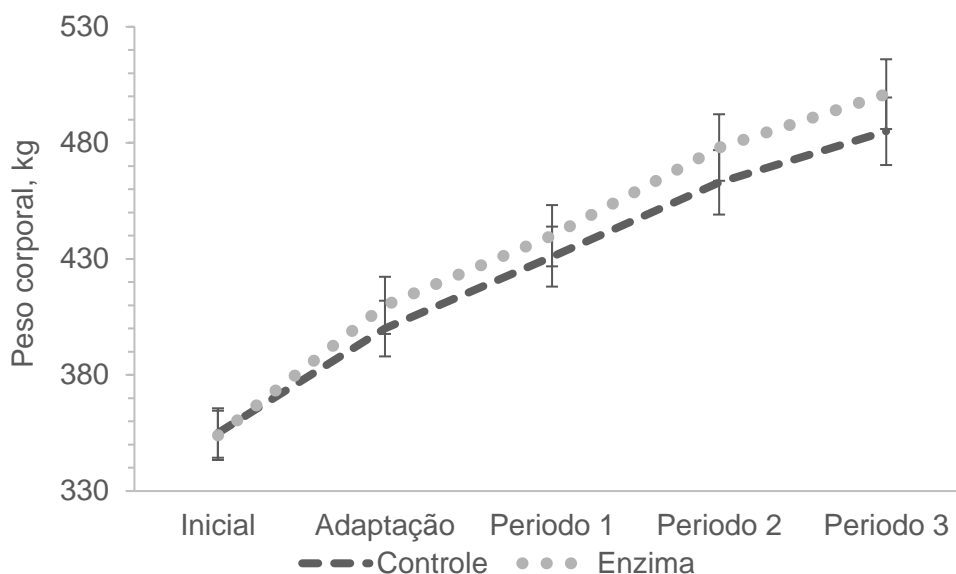


Figura 1. Peso corporal inicial (kg) na adaptação, primeiro, segundo e terceiro período de bovinos Nelore recebendo extrato de *Aspergillus oryzae* contendo alfa-amilase (5g/animal/dia) em dietas de confinamento com elevada inclusão de concentrado. Peso corporal foi diferente na adaptação ($P = 0,0121$); Tendências no período 2 e 3, ($P = 0,072$ e $0,091$, respectivamente).

Ao final do experimento, os animais que receberam Amilase tenderam a ter maior ganho médio, comparado aos do grupo controle, o que representaria 14 kg no ganho de peso total ($P = 0,091$) (Tabela 2). O que refletiu também nas tendências de maior peso de carcaça quente, ganho em carcaça total e ganho médio diário em carcaça ($P = 0,092$), para animais que receberam Amilase. No entanto, não foram observados efeito da adição de Amilase para consumo de matéria seca (CMS), CMS % PC, eficiência alimentar e rendimento de carcaça e rendimento do ganho ($P \geq 0,112$).

Tabela 2. Características de desempenho de bovinos Nelore recebendo extrato de *Aspergillus oryzae* contendo alfa-amilase em dietas de confinamento com alta inclusão de concentrado

Item	Tratamentos		EPM ¹	P-Valor
	Controle	Amilase 5g/animal/dia		
PC inicial, kg	355	354	0,58	0,7221
PC final, kg	466	480	5,54	0,091
GMD, kg/d	1,19	1,33	0,08	0,091
CMS, kg/d	8,32	9,07	0,44	0,1121
CMS, % PC	1,79	1,89	0,07	0,1388
EA, kg /kg	0,142	0,146	0,002	0,4431
PCQ, kg	267	276	4,74	0,0922
RC, %	57,2	57,4	0,40	0,6513
Ganho em carcaça total, kg	81,5	90,0	4,76	0,0922
GMD em carcaça, kg/d	0,87	0,96	0,05	0,0922
RG, g/kg	730	732	0,02	0,079

¹Erro padrão da média; PC = peso corporal; GMD= ganho médio diário (kg/dia); CMS= consumo de matéria seca (kg/dia); CMS, % PC= consumo de matéria seca em porcentagem do peso corporal; EA = eficiência alimentar; PCQ = peso de carcaça quente; RC = rendimento de carcaça; RG = rendimento do ganho

Entre as medidas biométricas da carcaça, o comprimento da carcaça, profundidade do peito, comprimento e perímetro da perna, área de olho de lombo (AOL) e espessura da gordura subcutânea (EGS), apenas o comprimento de perna foi diferente entre os tratamentos ($P < 0,05$), no qual os animais que as receberam amilase obtiveram em média 3,3 cm peso de carcaça e comprimento da perna, em comparação com animais do grupo Controle.

Tabela 3. Medidas biométricas da carcaça e características da qualidade de carne de bovinos Nelore recebendo extrato de *Aspergillus oryzae* contendo alfa-amilase em dietas de confinamento com elevada inclusão de concentrado

Item	Tratamento		EPM ¹	P-valor
	Controle	Amilase 5g/animal/dia		
Comprimento da carcaça, cm	131	133	0,68	0,3739
Profundidade do peito, cm	43,3	44,4	0,25	0,3826
Comprimento da perna, cm	88,8	92,1	0,51	0,0127
perímetro da perna, cm	108	107	0,50	0,6548
AOL, cm ²	72,4	71,0	1,55	0,8602
EGS, mm	2,68	2,63	0,190	0,9359
pH	5,77	5,89	0,09	0,3431
L*	40,0	37,8	0,44	0,0412
a*	17,4	17,0	0,27	0,3920
b*	15,3	14,0	0,33	0,0741
PPC, %	30,6	34,9	1,73	0,2032
Força de cisalhamento, kg	3,45	4,50	0,49	0,2742

¹Erro padrão da média

Para os atributos de qualidade do músculo, houve diferenças entre os tratamentos para a cor L* (luminosidade) (P = 0,041) e tendência para a cor b* (amarelada) (P = 0,074), sendo que os valores obtidos para pH não foram diferentes entre os animais, enquanto que a colocação L* e b* tiveram valores mais baixos em animais que receberam Amilase.

As variáveis da composição química do músculo (as quais foram obtidas a pelos mesmos métodos das análises bromatológicas) não sofreram efeito da adição da amilase (P ≥ 0,192) (Tabela 4).

Tabela 4. Composição química (%) do músculo *longissimus* de bovinos Nelore recebendo extrato de *Aspergillus oryzae* contendo alfa-amilase em dietas de confinamento com elevada inclusão de concentrado

Item	Tratamentos		EPM ¹	P-Valor
	Controle	Amilase 5g/animal/dia		
Extrato etéreo, %	2,68	2,72	0,15	0,3321
Matéria Mineral, %	1,19	1,13	0,05	0,8013
Proteína, %	23,1	23,2	0,44	0,1922
Umidade, %	73,2	73,9	0,002	0,4431

¹Erro padrão da média

Não houve efeitos para os teores dos ácido mirístico, miristoleico, palmítico, palmitoleico, heptadecanóico, esteárico, oleico, linoleico, araquidônico entre outros no músculo de animais que consumiram as dietas com adição de Amilase em relação ao controle ($P \geq 0,1312$) (Tabela 5). Assim como somatórias de ácidos graxos saturados (AGS), insaturados (AGI), monoinsaturados (AGMI), polinsaturados (AGPI) e as relações AGI:AGS, AGMI:AGS e AGPI:AGS, não sofreram efeito da adição de Amilase ($P \geq 0,1271$). Porém dentre as definições de ácidos graxos com potencial colesterolêmicos (hipercolesterolêmico, hipocolesterolêmico e neutros), houve efeito da adição de amilase nos ácidos graxos hipocolesterolêmicos, sendo maior em animais que receberam a Amilase, quando comparados aos animais do grupo Controle ($P = 0,0493$).

Tabela 5. Composição de ácidos graxos (mg/100 g de carne) do músculo *longissimus* de bovinos Nelore recebendo extrato de *Aspergillus oryzae* contendo alfa-amilase em dietas de confinamento com alta inclusão de concentrado

Item	Tratamentos		EPM ¹	P-valor
	Controle	Amilase 5g/animal/dia		
C14:0, Mirístico	2,95	2,80	0,20	0,6212
C14:1, Miristoleico, cis-9	0,61	0,40	0,14	0,3121
C16:0, Palmítico	25,2	24,8	0,74	0,7243
C16:1, Palmitoleico, cis-9	2,82	2,36	0,25	0,2231
C17:0, Heptadecanóico	0,85	0,65	0,10	0,2031
C18:0, Esteárico	14,1	13,4	0,55	0,3610
C18:1 n9, C, Oleico	0,26	0,13	0,12	0,4501
C18:2 n6, C, Linoleico	6,08	9,16	1,32	0,1312
C20:4 n6, Araquidônico	1,36	2,19	0,39	0,1632
Outros A,G	7,49	7,64	1,12	0,9261
AGS	43,1	41,6	1,09	0,3652
AGI	48,8	50,5	0,81	0,1761
AGMI	40,9	38,5	2,25	0,4662
AGPI	7,95	12,0	1,73	0,1271
AGI:AGS	1,13	1,22	0,04	0,1853
AGMI:AGS	0,95	0,93	0,06	0,8172
AGPI:AGS	0,19	0,29	0,04	0,1351
Hipercolesterolêmico	31,5	30,3	1,18	0,4901
Hipocolesterolêmico	43,5	46,1	0,81	0,0493
Neutro	14,1	13,4	0,54	0,3610

¹Erro padrão da média AGS = ácido graxo saturado; AGI = ácido graxo insaturado; AGMI = ácido graxo monoinsaturado; AGPI = ácido graxo poli-insaturado; AGI:AGS = relação AGI e AGS; AGMI:AGS = relação AGMI e AGS; AGPI:AGS = relação AGPI e AGS.

DISCUSSÃO

O fornecimento da enzima foi feito para minimizar as perdas no processo de digestão do amido, assim, a adição da enzima promoveria melhor aproveitamento do substrato amido no ambiente ruminal e com isso inferiria variações nos produtos gerados pela fermentação (AGCC) e conseqüentemente transferiria efeitos ao desempenho. Mediante essa contextualização, é importante,

explicar que o delineamento e resultados obtidos e relatados no capítulo anterior, serão mencionados, quando necessário, para elucidar os resultados obtidos neste capítulo.

Assim, o efeito observado ao longo dos períodos sugere uma reestrutura dos padrões de utilização de dietas nutricionais (em particular o uso de amido) durante o processo de digestão em animais suplementados com enzimas (Seymour et al., 2005). Tricárico et al. (2007) avaliaram o efeito da adição de amilase sobre o desempenho de novilhos na fase de terminação em dois experimentos concomitantes (com elevada inclusão de concentrado, variando apenas entre milho floculado e silagem de grão úmido) e encontraram efeitos positivos para GMD, tanto na adaptação quanto no GMD final em animais que receberam Amilase, corroborando com este estudo.

Embora os ganhos de peso não sejam significativos para uma possível melhoria na eficiência da utilização de alimentos através da ação de enzimas alfa-amilase em grãos de milho, a tendência para maior ganho em peso foi observada e representou em média 1,8% a mais para ganho em peso, quando comparado com o tratamento controle. Embora estes valores sejam numericamente diferentes e expressivos, relações derivadas destes valores não demonstraram efeito em relação a adição da Amilase e EA, o que pode estar relacionado ao fato que essas variáveis obtidas através da proporção simples do ganho diário médio e da ingestão de matéria seca, independentemente da partição na ingestão de matéria seca para manutenção e ganho o que poderia ilustrar o uso mais eficiente da dieta (Nkrumah et al., 2004). Mesmo a maioria dos trabalhos não serem desenvolvidos especificamente para bovinos de corte, outros autores relatam correlação positiva entre o uso de amilases e melhoria nas variáveis de desempenho de ovinos, caprinos e, principalmente vacas em lactação (Tricárico et al., 2007; Mota et al., 2011; Wahyuni et al., 2012). Estes autores avaliaram a ação da enzima amilolíticas tanto com milho floculado e silagem de grão úmido, quanto grão inteiro e milho moído, respectivamente.

Em relação as diferenças encontradas para os valores de L* (luminosidade) mais baixos em animais recebendo a enzima, podemos inferir que pode ter havido uma alteração no que diz respeito a depleção de glicogênio muscular. Uma vez que a coloração da carne é influenciada pela mioglobina, a qual depende de

fatores relacionados ao músculo, tais como a oxigenação e oxidação do músculo. Conforme o pH pode agir nas proteínas miofibrilares em termo físicos e de luminosidade da carne (Abril et al., 2001).

Ainda que individualmente os ácidos graxos da carne não tenham revelado efeito da adição de amilase, a relação de ácidos graxos Hipocolesterolêmicos foi afetada positivamente pela adição da Amilase. Tal presença deste tipo de ácido graxo são bem vistas do ponto de vista saudável, por prevenir doenças cardiovasculares, uma vez que atuam na redução de LDL (lipoproteína de baixa densidade) (Molketin, 2000). No presente estudo, se levarmos em consideração a maior concentração de propionato em animais que receberam Amilase (capítulo anterior), podemos sugerir que esta diferença nestes ácidos graxos na carne está relacionada com o maior aporte de propionato, o qual influencia a formação de ácidos graxos de cadeia ramificada e indiretamente pela possível utilização da glicose na formação dos adipócitos, mas não chegou a influenciar a EGS, no presente estudo (Doreus et al., 1994).

CONCLUSÃO

O uso de extrato de *Aspergillus oryzae* contendo alfa-amilase em dietas de confinamento com alta inclusão de concentrado pode melhorar o desempenho de bovinos Nelore.

REFERÊNCIAS

- Abril, M.; Campo, M, M.; Önenç, A.; Sañudo, C.; Albertí, P.; Negueruela, A, I, 2001, Beef Colour evolution as a function of ultimate pH, *Meat Science*, 58:69-78.
- Anualpec, Anuário da Pecuária Brasileira 1st ed, Instituto FNP e Agro FNP Pesquisas Ltda, São Paulo, Brasil, 2016.
- Brasil (1997), Ministério da agricultura, Pecuária e Abastecimento, Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal, Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.
- Correa C,E,S, et al, Relationship between corn vitreousness and ruminal in situ starch degradability, *Journal of Dairy Science*, University of Wisconsin, Madison, v85, n11, p,3008-3012, 2002.
- Doreaus, M., & Ferlay, A, (1994), Digestion and utilization of fatty acids by ruminants, *Animal Feed Science and Technology*, 45, 379-396.
- Food Chemicals Codex, 1996, 4th ed, Natl, Acad, Press, Washington, DC.
- Folch, J., M, Lees, and G, H, Sloane-stanley, 1957, A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues, *Journal of Biology and Chemistry*, 226:497– 509,
- Hall, M,B, 2000, Neutral detergent-soluble carbohydrates nutritional relevance and analysis, Gainesville: University of Florida, 42 p, (Bulletin, 339),
- Houben, J, H,, A, Van Dijk, G, Eikelenboom, and A, H, Hoving-Bolink, 2000, Effect of dietary vitamin E supplementation, fat level and packaging on color stability and lipid oxidation in minced beef, *Meat Sci*, 55:331–336,
- Kozloski, V,G, Bioquímica dos ruminantes, 3 ed, 1º reimpressão, UFSM, Santa Maria, RS, 2016.

- Kramer, J, K, G., V, Fellner, and M, E, R, Dugan, 1997, Evaluating acid and base catalysts in the methylation of milk and rumen fatty acids with special emphasis on conjugated dienes and total trans fatty acids, *Lipids*, 32:1219–1228.
- Latham, M,J,, Storry, J,E,, & Sharpe, M,E, (1972), Effect of low roughage diets on the microflora and lipid metabolism in the rumen, *Applied Microbiology*, 24, 871-877.
- Meale, S. J.; Beauchemin, K. A.; Hristov, A. N.; Chaves, A. V.; McAllister, T.A. Board Invited Review: Opportunities and challenges in using exogenous enzymes to improve ruminant production. *Journal of Animal Science*, v. 92, p. 427-442, 2014.
- Millen, D, D,; Pacheco, R, D, L,; Arrigoni, M, D, B, et al, A snapshot of management practices and nutritional recommendations used by feedlot nutritionist in Brazil, *Journal of Animal Science*, jul, 2009, 38 p.
- Molketin, J, 2000, Occurrence and biochemical characteristics of natural bioactive substances in bovine milk lipids, *Br, J, Nutr*, 84:47–53,
- Mota, N., G,D, Mendoza, F,X, Plata, J,A, Martinez, H, Lee, R, Rojo and M,M, Crosby, 2011, Effect of exogenous glucoamylase enzymes and reduction of grain level on lamb performance, *J, Applied Anim, Res,,* 39: 129-131.
- Muller, L, Normas para avaliação de carcaça e concurso de carcaças de novilhos, 2ed, Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 1987, 31p.
- National research COUNCIL - NRC, Nutrient requeriments of dairy cattle, 7,rev,ed, Washinton, D,C,: 2001, 381p.
- Nkrumah, J, D,, J, A, Basarab, M, A, Price, E, K, Okine, A, Ammoura, S, Guercio, C, Hansen, C, Li, B, Benkel, B, Murdoch, and S, S, Moore, 2004, Different measures of energetic efficiency and their phenotypic relationships with growth, feed intake, and ultrasound and carcass merit in hybrid cattle, *J, Anim, Sci*, 82:2451–2459.
- Seymour, W, M,, Campbell, D, R, and Johnson, Z, B, 2005, Relationships between rumen volatile fatty acid concentrations and milk production in dairy cows: a literature study, *Animal Feed Science and Technology* 119: 155-169.

- Tapp III, W, N., J, W, S, Yancey, and J, K, Apple, 2011, How is the instrumental color of meat measured? *Meat Science*, 89:1–5.
- Tricarico, J, M., J, D, Johnston, K, A, Dawson, K, C, Hanson, K, R, McLeod, and D, L, Harmon, 2005, The effects of an *Aspergillus oryzae* extract containing alpha-amylase activity on ruminal fermentation and milk production in lactating Holstein cows, *Anim, Sci*, 81:365–374.
- Tricarico, J, M., M, D, Abney, M, L, Galyean, J, D, Rivera, K, C, Hanson, K, R, McLeod, and D, L, Harmon, 2007, Effects of a dietary *Aspergillus oryzae* extract containing α -amylase activity on performance and carcass characteristics of finishing beef cattle, *J, Anim, Sci*, 85: 802-811.
- Tricarico, J, M., et al, Effects of a dietary *Aspergillus oryzae* extract containing alpha-amylase activity on performance and carcass characteristics of finishing beef cattle, *Journal of Animal Science*, v85,p-802-811,2007.
- Wahyuni, R,D., W, Ngampongsai, C, Wattanachant, W, Visessanguan and S,oonpayung, 2012, Effects of enzyme levels in total mixed ration containing oil palm frond silage on intake, rumen fermentation and growth performance of male goat, *Songklanakarin J, Sci, Technol.*, 34: 353-360.
- Wheeler, T, L. S, D, Shackelford, L, P, Johnson, M, F, Miller, R, K, Miller, and M,Koohmaraie, 1997, A comparison of Warner- Bratzler shear force assessment within and among institutions, *J, Anim, Sci*, 75:2423-2432.