

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
CAMPUS DE BOTUCATU

EFEITOS DA ADIÇÃO DE ENZIMAS FIBROLÍTICAS OU BUTIRATO DE SÓDIO  
EM DIETAS DE CONFINAMENTO SOBRE VARIÁVEIS METABÓLICAS DE BOVINOS  
ANGUS

DANIEL MORETTO CASALI

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-graduação em Zootecnia como parte  
das exigências para a obtenção do título de  
Mestre em Zootecnia

BOTUCATU – SP  
Fevereiro/2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
CAMPUS DE BOTUCATU

EFEITOS DA ADIÇÃO DE ENZIMAS FIBROLÍTICAS OU BUTIRATO  
EM DIETAS DE CONFINAMENTO SOBRE VARIÁVEIS METABÓLICAS DE BOVINOS  
ANGUS

DANIEL MORETTO CASALI

Orientador: Prof. Dr. Danilo Domingues Millen

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-graduação em Zootecnia como parte  
das exigências para a obtenção do título de  
Mestre em Zootecnia

BOTUCATU – SP  
Fevereiro/2024

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Casali, Daniel Moretto.

Efeitos da adição de enzimas fibrolíticas ou butirato de sódio em dietas de confinamento sobre variáveis metabólicas de bovinos angus / Daniel Moretto Casali. - Botucatu, 2024

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu

Orientador: Danilo Domingues Millen

Capes: 50403001

1. Confinamento (Animais). 2. Bovinos - Metabolismo.  
3. Ácidos Graxos Voláteis.

Palavras-chave: Confinamento; Metabolismo; Papila.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Botucatu



### ATESTADO DE APROVAÇÃO - DEFESA

Atestamos que **DANIEL MORETTO CASALI**, RA nº: ZNP220061, RG nº 49.706.838-2, expedido pela SSP/SP, defendeu, no dia 21/02/2024, a dissertação intitulada **EFEITOS DA ADIÇÃO DE ENZIMAS FIBROLÍTICAS OU BUTIRATO DE SÓDIO EM DIETAS DE CONFINAMENTO SOBRE VARIÁVEIS METABÓLICAS DE BOVINOS ANGUS**, junto ao Programa de Pós Graduação em Zootecnia, Curso de Mestrado Acadêmico, tendo sido 'APROVADO'.

Atestamos ainda que a obtenção do título dependerá de homologação pelo Órgão Colegiado competente.

Botucatu, 21 de fevereiro de 2024

---

Cláudia Cristina Moreci  
Assistente Administrativo  
Seção de Pós-Graduação / FMVZ



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



## Comissão de Ética no Uso de Animais

# Certificado

Certificamos que a proposta intitulada **"EFEITOS DA ADIÇÃO DE ROVABIO OU BUTIRATO EM DIETAS DE CONFINAMENTO SOBRE OS PARÂMETROS RUMINAIS DE BOVINOS ANGUS"**, registrada com o nº 08/2019.SP1 – CEUA, vinculada a proposta intitulada **"Caracterização da comunidade microbiana do rúmen aliada a estratégias para melhorar a eficiência alimentar de bovinos Nelore e Angus durante a adaptação e terminação em confinamento"** (registro nº 09/2018 – CEUA), sob a responsabilidade do(a) Prof(a). Dr(a). **Danilo Domingues Millen** – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de **pesquisa científica** – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas da UNESP - Câmpus de Dracena, em **19/04/2021**.

Dracena, 23 de abril de 2021.

**Prof.<sup>a</sup> Dra Jaqueline Dalbello Biller**

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

**Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas - DTA**

Rod. Cmt. João Ribeiro de Barros, km 651- Bairro das Antas – CEP: 17900-000 – Dracena/SP - Brasil

Tel. (18) 3821-8200 – [www.dracena.unesp.br](http://www.dracena.unesp.br) - [academico@dracena.unesp.br](mailto:academico@dracena.unesp.br)

## **BIOGRAFIA DO AUTOR**

Daniel Moretto Casali, brasileiro, nascido em Lençóis Paulista – SP, no dia 16 de abril de 1998, filho de Leandra da Silva Moretto e José Virgílio Casali. Concluiu o ensino médio pelo Colégio São José, Lençóis Paulista-SP, no ano de 2015. Em 2017 ingressou no curso de zootecnia pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus de Dracena, onde foi contemplado com uma bolsa de iniciação científica financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP), concluindo o curso em 2021. Em março de 2022 iniciou o mestrado acadêmico pela Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMZ), UNESP campus Botucatu, recebendo bolsa de estudo custeada pela Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), com vigência entre 03/22 e 09/22. Em 10/22 foi contemplado como bolsista pela FAPESP. Atua na área de nutrição, metabolismo e produção de ruminantes, com ênfase em bovinos de corte.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Leandra e José Virgílio, e a minha irmã Maria Clara, pelo suporte, confiança e paciência, os quais foram imprescindíveis durante toda minha vida, me dando os exemplos necessários para me tornar quem sou hoje. Amo muito vocês.

À minha namorada Laura Helena, crucial na execução deste projeto, me incentivando, motivando nos momentos mais difíceis. Agradeço por toda atenção, carinho e paciência. Te amo!

Ao professor Danilo Domingues Millen, pela parceria e valiosos ensinamentos, meu sincero obrigado.

À toda equipe de estagiários de Dracena pela ajuda na execução do projeto, em especial ao Eduardo, Mikaely, Delay e Gaytorade. E também a equipe de Jaboticabal pela ajuda na finalização das análises laboratoriais, Joeel, Julia e Jorge.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas – FCAT / UNESP campus Dracena, por ser minha segunda casa durante tantos anos e por aceitar sediar tal experimento.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ / UNESP campus Botucatu, pela oportunidade de realização deste projeto bem como os ensinamentos aprendidos.

A todos funcionários da FCAT – UNESP campus Dracena, especialmente aos técnicos de campo Alan, Fabão, pelo suporte e pelos conselhos, foram fundamentais.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa de mestrado acadêmico (Processo nº 2021/14826-4), a qual foi essencial durante o período de desenvolvimento do estudo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

À Adisseo Nutrição Animal pelo fornecimento dos aditivos bem como financiamento do projeto.

## RESUMO GERAL

Bovinos confinados são expostos a altas cargas de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), oriundos da fermentação ruminal, os quais podem provocar lesões ao epitélio digestivo caso este não esteja desenvolvido para promover a remoção de tais produtos. Tal desenvolvimento está intimamente ligado a absorção dos AGCC produzidos, especialmente o butirato, ou ácido butílico. Assim, a hipótese que a o aumento na concentração de butirato ruminal proporcione efeitos positivos ao metabolismo animal, bem como o desenvolvimento epitelial do rúmen. Esse estudo tem como objetivo avaliar o efeito do acréscimo do butirato ou de enzimas fibrolíticas sobre o epitélio ruminal, assim como nos demais parâmetros ruminais e fisiológicos envolvidos. Foram utilizados 3 bovinos da raça Aberdeen Angus, machos, castrados, cânulados no rúmen e com peso médio inicial de 690 kg. O experimento foi realizado em quadrado latino 3x3 duplicado, totalizando 6 períodos experimentais e com duração de 203 dias. Cada período experimental foi composto de 28 dias, 14 dias de adaptação e 14 dias de terminação, com intervalo de 7 dias entre os períodos, denominado *washout*, onde os animais foram liberados para pastejo. As dietas variaram apenas no tocante do aditivo alimentar utilizado, seguindo os tratamentos: **CON**) Controle (sem adição de aditivos); **ENZ**) Utilização de complexo enzimático exógeno (0,01% da MS); **BUT**) Utilização de butirato de sódio (0,3% da MS durante a adaptação e 0,1% da MS durante a terminação). O efeito dos tratamentos foi considerado como fixo e os efeitos de período e animal foram considerados efeitos aleatórios. Temperatura, pH e potencial de óxido-redução do rúmen foram mensurados por *data loggers*, assim como amostras de fluido ruminal foram coletadas para determinação da proporção de ácidos graxos de cadeia curta, N-NH<sub>3</sub> e composição da comunidade microbiana. Foram adicionados via cânula o marcador dióxido de titânio para que assim os coeficientes de digestibilidade total dos nutrientes sejam calculados. No último dia de cada período experimental foram coletadas amostras das papilas ruminais para realização de morfometria e expressão dos genes, assim como a coleta de sangue, que ocorreu também no primeiro dia e foi utilizada para mensuração de ácidos graxos não esterificados, insulina e glicose. Os dados deste estudo foram analisados pelo PROC MIXED do SAS (2003), sendo o teste de Tukey utilizado para comparação entre médias quando necessário, considerando o nível de 5% de significância. O tratamento ENZ resultou em redução no índice de seleção de partículas longas ( $P<0.01$ ), temperatura ruminal ( $P=0,04$ ), redução na população de protozoários do gênero *Diplodinium* ( $P=0,03$ ) e favoreceu a taxa de desaparecimento do conteúdo ruminal em %/h ( $P=0,05$ ), enquanto animais alimentados sem aditivos, CON, possuíram maiores concentrações de LBP ( $P=0,02$ ). Assim, tanto BUT quanto ENZ não foram capazes de exercer amplas mudanças no ambiente ruminal bem como no metabolismo animal, entretanto sugerem que novos estudos com diferentes doses podem ser promissores.

Palavras-chave: Confinamento, metabolismo, papila

## ABSTRACT

Confined bovine cattle are exposed to high loads of short-chain fatty acids (SCFA), deriving from ruminal fermentation, which can damage the digestive epithelium if not developed to promote the removal of such products. Such development is closely related to the absorption of the SCFA produced, especially butyrate or butyric acid. Thus, the hypothesis is of the increase in ruminal butyrate provide benefits effects to animal metabolism, like well rumen epithelial development. This study evaluates the effect of butyrate or fibrolytic enzyme addition to the ruminal epithelium and the other ruminal and physiological parameters involved. Three Aberdeen Angus cattle were used; each male, castrated, cannulated in the rumen, and with an average initial weight of 690 kg. The experiment was conducted in a duplicate 3x3 Latin square, totaling six experimental periods and lasting 203 days. Each experimental period consisted of 28 days, 14 for adaptation and 14 for finishing, with an interval of 7 days between them, called washout, in which the animals were released for grazing. The diets differed only regarding the food additive used, per the following treatments: CON) Control (no additives added); ENZ) Use of exogenous enzyme complex (0.01% of DM); BUT) Use of sodium butyrate (0.3% of DM during and adaptation and 0.1% of DM during finishing). The treatment effects were considered fixed, and the period and animal effects were considered random. Data loggers measured rumen temperature, pH, and oxide-reduction potential, and ruminal fluid samples were also collected to determine the proportion of short-chain fatty acids, N-NH<sub>3</sub>, and microbial community composition. Titanium dioxide markers were added via cannula to calculate the coefficients of total nutrient digestibility. On the last day of each experimental period, samples of ruminal papillae were collected to perform morphometry and gene expression; blood was also collected, which occurred on the first day as well and was used to measure non-esterified fatty acids, insulin, and glucose. The data from this study were analyzed by PROC MIXED by SAS (2003), using the Turkey test to compare averages when necessary, considering a 5% significance level. The ENZ treatment resulted in the decrease of sorting for long particles ( $P<0.01$ ), ruminal temperature ( $P=0.04$ ) and the reduction in the population of protozoa of genus *Diplodinium* ( $P=0.03$ ) and favored the ruminal content disappearance rate in %/h ( $P=0.05$ ). At the same time, animals fed with no additives, CON, presented more significant concentrations of LBP ( $P=0.02$ ). Therefore, neither BUT nor ENZ could exert extensive changes in the ruminal environment or the animal's metabolism. However, such results suggest that new studies with different dosages might be promising.

Keywords: Feedlot, metabolism, papillae

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### CAPÍTULO 2

|                                                                                                                                                                                    |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Figura 1.</b> Coletas realizadas durante o período experimental, cores são únicas e indicam diferentes análises e dias realizados.....                                          | <b>31</b> |
| <b>Figura 2.</b> Concentração de $\text{N-NH}_3$ nos diferentes horários de coletas.....                                                                                           | <b>39</b> |
| <b>Figura 3.</b> Concentração de lactato nos diferentes horários de coletas.....                                                                                                   | <b>39</b> |
| <b>Figura 4.</b> Indicador de riqueza microbiana Chao de animais Angus canulados no rúmen em confinamento com adição de enzimas fibrolíticas exógenas ou butirato de sódio.....    | <b>42</b> |
| <b>Figura 5.</b> Indicador de riqueza microbiana Shannon de animais Angus canulados no rúmen em confinamento com adição de enzimas fibrolíticas exógenas ou butirato de sódio..... | <b>43</b> |
| <b>Figura 6.</b> Teste de beta diversidade Jaccard em animais Angus canulados no rúmen em confinamento com adição de enzimas fibrolíticas exógenas ou butirato de sódio.....       | <b>43</b> |
| <b>Figura 7.</b> Teste de beta diversidade Bray-Curtis em animais Angus canulados no rúmen em confinamento com adição de enzimas fibrolíticas exógenas ou butirato de sódio.....   | <b>44</b> |
| <b>Figura 8.</b> Abundância relativa da comunidade bacteriana de Angus canulados no rúmen em confinamento com adição de enzimas fibrolíticas exógenas ou butirato de sódio.....    | <b>44</b> |
| <b>Figura 9.</b> Abundância relativa da comunidade bacteriana de Angus canulados no rúmen em confinamento com adição de enzimas fibrolíticas exógenas ou butirato de sódio.....    | <b>45</b> |
| <b>Figura 10.</b> Valores encontrados após análise de RNA pelo “Agilent 2100 Bioanalyzer” .....                                                                                    | <b>45</b> |

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2

|                  |                                                                                                                                                                                                      |           |
|------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Tabela 1.</b> | Composição e conteúdo nutricional das dietas experimentais.....                                                                                                                                      | <b>30</b> |
| <b>Tabela 2.</b> | Consumo de matéria seca de animais Angus canulados no rúmen em confinamento com adição de enzimas fibrolíticas exógenas ou butirato de sódio.....                                                    | <b>36</b> |
| <b>Tabela 3.</b> | Comportamento alimentar e seletividade de partículas longas, medias, curtas e finas em animais Angus canulados no rúmen em confinamento com adição de enzimas fibrolíticas ou butirato de sódio..... | <b>36</b> |
| <b>Tabela 4.</b> | Degradabilidade ruminal dos nutrientes e da MS em Angus canulados no rúmen em confinamento com adição de enzimas fibrolíticas exógenas ou butirato de sódio.....                                     | <b>37</b> |
| <b>Tabela 5.</b> | Digestibilidade total e dos nutrientes em Angus canulados no rúmen em confinamento com adição de enzimas fibrolíticas exógenas ou butirato de sódio.....                                             | <b>38</b> |
| <b>Tabela 6.</b> | pH, temperatura e potencial redox de animais Angus canulados no rúmen em confinamento com adição de enzimas fibrolíticas exógenas ou butirato de sódio.....                                          | <b>38</b> |
| <b>Tabela 7.</b> | Perfil de ácidos graxos de cadeia curta de animais Angus canulados no rúmen em confinamento com adição de enzimas fibrolíticas exógenas ou butirato de sódio.....                                    | <b>39</b> |
| <b>Tabela 8.</b> | Contagem diferencial de protozoários ciliados ( $10^3/\text{mL}$ ) de animais Angus canulados no rúmen em confinamento com adição de enzimas fibrolíticas exógenas ou butirato de sódio.....         | <b>40</b> |
| <b>Tabela 9.</b> | Peso vivo, frações do conteúdo ruminal e taxa de desaparecimento de animais Angus canulados no rúmen em confinamento com adição de enzimas fibrolíticas exógenas ou butirato de sódio.....           | <b>41</b> |

**Tabela 10.** Hormônios sanguíneos e proteínas ligadas ao processo inflamatório de animais Angus canulados no rúmen em confinamento com adição de enzimas fibrolíticas exógenas ou butirato de sódio.....**41**

**Tabela 11.** Variáveis histológicas das papilas ruminais de Angus canulados no rúmen em confinamento com adição de enzimas fibrolíticas exógenas ou butirato de sódio.....**4**

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

|                   |                                       |                  |                                               |
|-------------------|---------------------------------------|------------------|-----------------------------------------------|
| %                 | Porcentagem                           | μmol             | Micro mol                                     |
| B                 | Beta                                  | mm               | Milímetro                                     |
| μl                | Micro litro                           | cm               | Centímetro                                    |
| μg                | Micro grama                           | g                | Grama                                         |
| μm                | Micrômetro                            | °C               | Graus centígrados                             |
| AGCC              | Ácidos graxos de cadeia curta         | FDA              | Fibra em detergente ácido                     |
| Ca                | Cálcio                                | MM               | Matéria mineral                               |
| CON               | Controle                              | LRCpH            | Lethbridge Research Centre                    |
| ENZ               | Complexo enzimático fibrolítico       | N                | Nitrogênio                                    |
| BUT               | Butirato de sódio                     | NH <sub>3</sub>  | Amônia                                        |
| MS                | Matéria Seca                          | DNA              | Ácido desoxirribonucleico                     |
| FDN               | Fibra em detergente neutro            | RNA <sub>r</sub> | RNA Ribossomal                                |
| EFE               | Enzimas fibrolítica exógena           | m <sup>2</sup>   | Metros quadrado                               |
| UNESP             | Universidade Estadual Paulista        | EPM              | Erro padrão médio                             |
| NDT               | Nutrientes digestíveis totais         | FCAT             | Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas |
| PB                | Proteína bruta                        | IgA              | Imunoglobulina A                              |
| M                 | Molar                                 | IgG              | Imunoglobulina G                              |
| CMS               | Consumo de matéria seca               | Kg               | Quilograma                                    |
| nm                | Nanômetros                            | L                | Litros                                        |
| cDNA              | DNA complementar                      | LBP              | Proteína ligante do LPS                       |
| PCR-RT            | Polymerase chain reaction – real time | LPS              | Lipopolissacarídeo                            |
| min               | Minutos                               | CA               | Conversão alimentar                           |
| n                 | Número                                | LRNS             | Large Ruminant Nutrition System               |
| TRT               | Tratamento                            | mg               | Miligramas                                    |
| Mmol              | Mili mol                              | min              | Minuto                                        |
| D                 | Dia                                   | mL               | Mililitros                                    |
| N-NH <sub>3</sub> | Nitrogênio não proteico               | ng               | Nanogramas                                    |
| h                 | Hora                                  | P                | Fosforo                                       |
| IU                | Unidade Internacional                 | PCR              | Proteína C-Reativa                            |
|                   |                                       | pH               | Potencial de hidrogênio                       |

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                         |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| CAPÍTULO 1                                                                                                                              | 20 |
| Considerações Iniciais                                                                                                                  | 21 |
| 1. Revisão de Literatura                                                                                                                | 22 |
| 1.1. Butirato de sódio                                                                                                                  | 22 |
| 1.2. Enzimas fibrolíticas exógenas                                                                                                      | 23 |
| 2. Objetivo Geral                                                                                                                       | 25 |
| CAPÍTULO 2                                                                                                                              | 28 |
| “Efeitos da adição de enzimas fibrolíticas ou butirato de sódio em dietas de confinamento sobre variáveis metabólicas de bovinos Angus” | 28 |
| 1. Introdução                                                                                                                           | 29 |
| 2. Materiais e Métodos                                                                                                                  | 29 |
| 2.1. Animais e Local do Experimento                                                                                                     | 29 |
| 2.2. Delineamento Experimental                                                                                                          | 29 |
| 2.3. Manejo, Arraçoamento e Cuidado com os Animais                                                                                      | 30 |
| 2.4. Período experimental                                                                                                               | 31 |
| 2.5. Comportamento e Seletividade de Partículas                                                                                         | 31 |
| 2.6. Degradabilidade Ruminal <i>In Situ</i>                                                                                             | 31 |
| 2.7. Digestibilidade Total da MS e dos Nutrientes                                                                                       | 32 |
| 2.8. Mensuração Contínua de pH Ruminal                                                                                                  | 32 |
| 2.9. Avaliação dos Produtos da Fermentação Ruminal                                                                                      | 32 |
| 2.10. Sequenciamento das Comunidades Bacterianas Ruminais                                                                               | 33 |
| 2.11. Protozoários Ciliados                                                                                                             | 34 |
| 2.12. Dinâmica Ruminal                                                                                                                  | 34 |
| 2.13. Hormônios Metabólicos e Metabólitos                                                                                               | 34 |
| 2.14. Histologia das Papilas Ruminais                                                                                                   | 34 |
| 2.15. Expressão dos Genes Relacionados a Absorção                                                                                       | 35 |
| 2.16. Análises Estatísticas                                                                                                             | 35 |
| 3. Resultados                                                                                                                           | 35 |
| 4. Discussão                                                                                                                            | 45 |
| 5. Conclusão                                                                                                                            | 48 |
| Referências                                                                                                                             | 48 |
| 6. Implicações                                                                                                                          | 52 |

## **CAPÍTULO 1**

## Considerações Iniciais

Carboidratos são compostos formados por carbono, hidrogênio e oxigênio, responsáveis por 50 a 80% da Matéria Seca (MS) de forragens e grãos, essenciais na nutrição de animais ruminantes, uma vez que possuem sistema gástrico adaptado para digestão de tal, sendo o rúmen o principal pré estômago, colonizado por microrganismos responsáveis pela digestão enzimática dos nutrientes, os quais produzem ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) como produtos da fermentação

O animal utiliza-se dos AGCC como principal fonte energética (BERCHIELLI et al., 2006), porém, o acúmulo desses AGCCs no ambiente ruminal pode acidificar o meio, onde em casos severos podem provocar lesões no epitélio do rúmen (DILORENZO et al., 2008), o que reduz a capacidade absorptiva, motilidade e facilita a entrada de metabólitos e toxinas na corrente sanguínea. Como resultado, podem aparecer distúrbios metabólicos, como abscesso hepático e laminite (NAGARAJA e LECHTENBERG, 2007), causados pela recorrente exposição a baixo pH.

O epitélio ruminal é constituído por quatro camadas de células distintas: basal, espinhosa, granulosa e córnea, e possui funções fisiológicas de absorção e metabolismo dos AGCC (GÁLFI et al., 1991). A camada basal é responsável pelas funções germinativas, onde o processo de renovação celular se inicia. Em seguida ocorre o processo de diferenciação celular, em que as células migram para a parte córnea e promovem descamação e renovação da camada celular (GARRET et al., 1999).

Dentro do rúmen, o epitélio projeta-se para o interior do órgão, formando as papilas ruminais, que tem como função promover o aumento da superfície absorptiva. Caso a quantidade de células geradas for maior que a quantidade descamada, ocorre o processo de hiperplasia, promovendo aumento de altura, largura e espessura das papilas ruminais (KRISTENSEN et al., 2007).

A absorção dos AGCC estimula a formação de novas células, buscando adaptar-se a carga absorptiva necessária para escoamento de tais AGCC, podendo variar de acordo com o tipo de dieta ingerida pelo animal (CUNNINGHAM, 1992). Vale ressaltar que é crucial que haja certo período para adaptação epitelial quando busca-se alcançar dietas com elevados níveis energéticos, para que então o epitélio ruminal possa se desenvolver sem ser lesionado, possibilitando a adaptação morfológica com proliferação do tecido e diferenciação de células individuais (GÄBEL e ASCHENBACH, 2007).

O ácido propiônico e o ácido butírico são os principais estimulantes do desenvolvimento das papilas ruminais quando absorvidos, promovendo aumento na taxa mitótica epitelial. Porém, apenas o butirato possui a ação inibitória de apoptose *in vivo*, promovendo maior aumento das papilas ruminais, principalmente em comprimento (MENTSCHHEL et al., 2001), o que garante melhorias em sua absorção e diminui o acúmulo de ácidos no rúmen. Além de ser amplamente absorvido pelo epitélio ruminal, o butirato possui maior valor energético para o metabolismo celular que os demais AGCC, promovendo também mudanças na expressão dos genes ligados a proliferação celular epitelial (DONOHOE et al., 2012).

Dentre os três principais AGCC gerados durante a fermentação, o ácido butírico está presente em menor concentração, variando entre 10 a 17%, sendo esta concentração regulada de acordo com o nível de inclusão

de carboidratos não estruturais, como amido e açúcares, assim como pelo tipo de microrganismo que fermentará o substrato.

Dietas de alto grão, como as utilizadas em confinamento, possuem elevados teores de carboidratos não estruturais, proporcionando aumentos na produção dos ácidos propiônico e butírico. Porém, considerando-se a ampla utilização do butirato, alguns aditivos alimentares podem ser utilizados visando suplementar a quantidade desse ácido disponível para o animal.

Essa suplementação pode ocorrer de maneira direta, com o ácido butírico sendo um componente da dieta ofertada para o animal, em forma de sais ou ligados a lipídeos (MALLO et al., 2012), garantindo que a concentração de butirato no rúmen se eleve conforme a alimentação do animal independente da fermentação do substrato. Além de promover acréscimo energético para o animal, e desenvolvimento epitelial gerado pelos pontos já citados, proporciona maior bem-estar e desempenho ao animal, evitando acidificação prolongada e consequentes distúrbios metabólicos.

Em suma, além de proporcionar ao animal incremento energético, a adição de butirato dietético auxilia no desenvolvimento morfológico epitelial conforme citado acima. Favorecendo principalmente animais em início de confinamento, os quais recebem dieta de adaptação justamente para que as adaptações morfológicas e bacterianas ocorram de maneira correta e gradual (PACHECO e CRUZ, 2015), sendo possível assim a utilização de doses elevadas durante o período de adaptação, garantindo assim o desenvolvimento do epitélio.

Outra maneira encontrada para promover elevação na quantidade total de butirato encontrado no rúmen, é a melhora na degradação dos alimentos, ofertando aos microrganismos ruminais maior quantidade de substrato passível a fermentação e consequente geração de AGCC. Estratégias nutricionais que passam pela utilização de enzimas e complexos enzimáticos estão sendo bem estudados atualmente, mas não com foco em desenvolvimento do epitélio ruminal.

Os microrganismos ruminais iniciam a fermentação do alimento de maneira externa, liberando enzimas responsáveis por clivarem ligações químicas das estruturas complexas dos nutrientes, como polissacarídeos e longas cadeias peptídicas, o que resulta em liberação de estruturas menores e menos complexas, utilizadas pela microbiota como fonte energética e limitante da fissão binária, processo de divisão celular no qual os AGCC são liberados. Dessa forma, a adição de enzimas exógenas, promove aumento na digestibilidade da dieta, o que facilita a utilização do substrato pelos microrganismos e aumenta o potencial de produção de AGCC, o que inclui aumento do butirato gerado pelas vias fermentativas.

## **1. Revisão de Literatura**

### **1.1. Butirato de sódio**

O ácido butírico tem importante função energética para as células epiteliais ruminais, mesmo sendo convertido quase em sua totalidade à corpos cetônicos como o  $\beta$ -hidroxibutirato, além de influenciar nas atividades metabólicas do epitélio, como abundância de transcrição de proteínas mediadoras da absorção de

AGCC (DENGLER et al., 2015), fluxo sanguíneo epitelial (STORM et al., 2011) e motilidade ruminal (KENDALL et al., 1996).

Embora seja corrosivo, volátil e de difícil utilização na nutrição animal, o mesmo pode ser protonado em sais, como sódio ou cálcio, ou protegidos com uma camada de gordura. Dessa forma, a molécula se torna mais estável, de fácil manuseio durante o processo de fabricação das rações, e se torna também menos odorífera. Na sua utilização em forma protegida com gordura, é ligado em forma de ésteres a uma molécula de glicerol, podendo conter dois ácidos butíricos por molécula de glicerol (dibutirina), ou três ácidos butíricos por molécula de glicerol (tributirina). Essa proteção lipídica permite que grande quantidade da molécula consiga passar pelo rúmen, agindo na porção proximal do intestino (MOSQUET et al., 2016) como estimulante para o epitélio intestinal ou ligando-se a um íon de hidrogênio, transformando-se em ácido butírico e possuindo efeitos bactericida.

O butirato em sua forma protonada com sais de sódio é o método mais utilizado para suplementação do ácido butírico pois dentre os demais sais é o que apresenta o custo mais reduzido e de fácil disponibilidade. Os sais possuem rápida dissociação em água e são rapidamente oxidados a butirato, sendo absorvido e atuando principalmente em nível ruminal (MALLO et al., 2012).

Górka et al. (2014, 2011a) concluiu que a suplementação de butirato de sódio para bezerros, via dieta sólida, estimulou diretamente o desenvolvimento das papilas ruminais, resultando em maior densidade e dimensão e consequentemente em maior superfície absorviva e maior quantidade de nutrientes disponíveis para o metabolismo animal e em maior ganho de peso, corroborando com resultados encontrado por McCurdy et al. (2019), onde a suplementação com butirato de sódio no período pós desmame proporcionou aumento no consumo de matéria seca.

Rice et al. (2019) utilizando 4 diferentes doses de butirato de sódio (0; 0,25; 0,5 e 0,75 g/kg) constataram que animais que receberam suplementação apresentaram maior peso final e melhor eficiência alimentar, reduzindo também a contagem de coccídeos.

Baldwin & McLeod (2000) em experimento utilizando bezerros, reportaram que a presença do butirato de sódio nas dietas favoreceu o desenvolvimento epitelial do rúmen; mesmos resultados encontrados por Laarman et al. (2013) em vacas Holandesas lactantes, onde a utilização do ácido graxo também exerceu efeito modulador positivo em genes relacionados a glicólise e fosforilação oxidativa.

Comprovou-se recentemente que o butirato de sódio também estimula a proliferação, diferenciação e reduz apoptose em células epiteliais intestinais de bovinos e leitões, proporcionando maior digestibilidade da dieta (HILL e al., 2007). Porém, acredita-se que além dos benefícios energéticos, o butirato tenha efeitos indiretos no desenvolvimento epitelial, influenciando a liberação e secreção de hormônios e fatores de crescimento, como a insulina e IGF-1, que são limitantes para proliferação celular (PENNER et al., 2011).

## **1.2. Enzimas fibrolíticas exógenas**

Sabe-se que o animal ruminante se difere dos demais animais por sua alta capacidade de degradação de fibras, porém ainda é possível otimizar a degradação e absorção das mesmas por meio da utilização de

aditivos alimentares como complexos enzimáticos, os quais podem conter como componentes fitases, celulasas e hemicelulasas, oriundas da fermentação de fungos e bactérias, que em associação as demais enzimas produzidas pela microbiota presente no rúmen, elevam a degradação dos polissacarídeos estruturais (NEWBOLD, 1997).

As celulasas e hemicelulasas são as categorias com maior relevância, uma vez que maximizam a hidrólise de celulose e hemicelulose presentes principalmente nas fibras. O primeiro grupo pode ser dividido em endo e exoglucanases, as quais clivam as ligações glicosídeas em diferentes pontos da cadeia de celulose (ZHANG; SCHELL; MCMILLAN, 2007), enquanto as hemicelulasas baseiam-se principalmente na ação das xilanases, que iniciam o processo de quebra dos polímeros das xilanases, gerando oligossacarídeos.

Além da degradação enzimática dos alimentos, a ação química das enzimas também torna a parede celular mais degradável, o que aumenta a disponibilidade de proteínas e carboidratos ali contidos (VARGAS et al., 2008), e reduz o tempo de colonização do substrato pelas bactérias (YANG et al., 1999), o que possibilita maior fluxo de proteína microbiana para o duodeno.

Oba e Allen (1999) por meio de experimentos *in vitro* sugeriram que o aumento na digestibilidade da Fibra em Detergente Neutro (FDN) está relacionado com aumento na produção e concentração das enzimas responsáveis por tal degradação, podendo assim reduzir custos de alimentação, caso as enzimas estivessem presente em maior quantidade no ambiente ruminal.

Diversos estudos relataram efeitos positivos na utilização de EFE, como aumento na digestibilidade *in vivo* da MS e FDN (GRANZIN 2005; KNOWLTON et al. 2007), aumento na produção de AGCC e suas concentrações (GADO et al. 2011; TIRADO-ESTRADA et al. 2015), assim como aumentos na ingestão de matéria seca, produção de leite (KHOLIF e AZIZ 2014) e ganho médio diário de peso vivo; surtindo efeito mesmo em dietas com baixa inclusão de forragem (BEDFORD e COWIESON, 2012). Entretanto, alguns trabalhos encontraram resultados que discordam dos anteriormente citados, não encontrando efeitos sobre a digestibilidade da MS e FDN, produção de AGCC ou desempenho animal (HOLTSHAUSEN et al. 2011; TITI 2003; ARRIOLA et al. 2011).

Como a ação das enzimas é de extrema especificidade e o ambiente ruminal é repleto de uma ampla gama de enzimas, algumas relações e interações podem causar efeito negativos quanto aos parâmetros ruminais e desempenho (MEALE et al. 2014; BEAUCHEMIN et al., 2004). Assim deve-se ter em mente a interação das EFE com o ecossistema ruminal, com a parede celular do substrato e o tipo de EFE utilizado, que pode variar de acordo com o tipo da enzima, concentração e a proporção das enzimas dentro do complexo; fatores que promovem maior previsibilidade dos resultados (DEAN et al. 2008; JILILVAND et al. 2008).

McAllister et al. (1999) encontrou um aumento de 12,3% no consumo de matéria seca e 23,4% no ganho médio diário em bovinos confinados recebendo suplementação enzimática a base de xilanases e glucanases, corroborando com resultados encontrados por Queiroz et al. (2004), onde a inclusão de enzimas exógenas favoreceu a digestibilidade da forragem, consumo voluntário e desempenho animal.

## 2. Objetivo Geral

Esse estudo tem como objetivo avaliar os efeitos do acréscimo de butirato de sódio ou enzimas fibrolíticas sobre o desenvolvimento do epitélio ruminal, expressão de genes relacionados a absorção, microbiota ruminal, parâmetros fermentativos e sanguíneos em animais Angus confinados.

## REFERÊNCIAS

ARRIOLA, K. G., KIM, S. C., STAPLES, C. R., & ADESOGAN, A. T. Effect of fibrolytic enzyme application to low-and high-concentrate diets on the performance of lactating dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 94(2), 832-841, 2011.

BALDWIN, R. L. T.; MCLEOD, K. R. Effects of diet forage: concentrate ratio and metabolizable energy intake on isolated rumen epithelial cell metabolism in vitro. *Journal of animal science*, v. 78, n. 3, p. 771- 783, 2000.

BEAUCHEMIN, K. A., COLOMBATTO, D., & MORGAVI, D. P. A rationale for the development of feed enzyme products for ruminants. *Canadian Journal of Animal Science*, 84(1), 23-36, 2004.

BEDFORD, M., & COWIESON, A. J. Exogenous enzymes and their effects on intestinal microbiology. *Animal Feed Science and Technology*, 173(1-2), 76-85, 2012.

BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S. G. *Nutrição de Ruminantes*. Jaboticabal: Funep, v. 2. 583p, 2006.

CUNNINGHAM, J. G. *Tratado de Fisiologia Veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A. p. 454, 1992.

DEAN, D. B., ADESOGAN, A. T., KRUEGER, N. A., & LITTELL, R. C. Effects of treatment with ammonia or fibrolytic enzymes on chemical composition and ruminal degradability of hays produced from tropical grasses. *Animal Feed Science and Technology*, 145(1-4), 68-83, 2008.

DENGLER, F., R. RACKWITZ, F. BENESCH, H. PFANNKUCHE, G. GABEL. Both butyrate incubation and hypoxia upregulate genes involved in the ruminal transport of SCFA and their metabolites. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)* 99:379–390. 2015.

DILORENZO, N., DAHLEN, C. R., DIEZ-GONZALES, F., LAMB, G. C., LARSON, J. E., DICOSTANZO, A. Effects of feeding polyclonal antibody preparations on rumen fermentation patterns, performance, and carcass characteristics of feedlot steers. *Journal of Animal Science*. 2008.

DONOHUE, D. R., COLLINS L. B., WALI A., BIGLER R., SUN W., BULTMAN S.J. The Warburg effect dictates the mechanism of butyrate-mediated histone acetylation and cell proliferation. *Molecular Cell* 48, 612–626. 2012.

GÄBEL, G., ASCHENBACH, J. R. SCFA, protons and ruminal epithelium: The good, the bad, the barrier. In: Füll, M. *Production Diseases in Farm Animals*. Universitat Leipzig, Leipzig, Germany. 291. 2007.

GÁLFI, P., NEOGRADI, S., SAKATA, T. Effects of volatile fatty acids on the epithelial cell proliferation of digestive tract and its hormonal mediation. *Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants*. Academic Press, Orlando, Florida, 49-59. 1991.

GARRETT, E. F., PEREIRA, M. N., NORDLUND, K. V., et al. Diagnostic methods for the detection of subacute ruminal acidosis in dairy cows. *Journal Dairy Science* 82:1170–1178. 1999.

GÓRKA, P., KOWALSKI, Z. M., PIETRZAK, P., KOTUNIA, A., JAGUSIAK, W., HOLST, J. J., ... & ZABIELSKI, R. Effect of method of delivery of sodium butyrate on rumen development in newborn calves. *Journal of dairy science*, 94(11), 5578-5588. 2011.

GÓRKA, P. et al. Effect of method of delivery of sodium butyrate on maturation of the small intestine in newborn calves. *Journal of dairy science*, v. 97, n. 2, p. 1026-1035, 2014.

HILL, T. M. et al. Effects of changing the fatty acid composition of calf starters. *The Professional Animal Scientist*, v. 23, n. 6, p. 665-671, 2007.

HOLTSHAUSEN, L., CHUNG, Y. H., GERARDO-CUERVO, H., OBA, M., & BEAUCHEMIN, K. A. Improved milk production efficiency in early lactation dairy cattle with dietary addition of a developmental fibrolytic enzyme additive. *Journal of dairy science*, 94(2), 899-907. 2011.

JALILVAND, G., NASERIAN, A., KEBREAB, E., ODONGO, N. E., VALIZADEH, R., SHAHROODI, F. E., ... & FRANCE, J. Rumen degradation kinetics of alfalfa hay, maize silage and wheat straw treated with fibrolytic enzymes. *Archivos de zootecnia*, 57(218), 155-164. 2008.

KENDALL, P. E., MCLEAY, L. M. Excitatory effects of volatile fatty acids on the in vitro motility of the rumen of sheep. *Res. Vet. Sci.* 61:1–6. 1996.

KHOLIF, A. M., AZIZ, H. A. Influence of feeding cellulytic enzymes on performance, digestibility and ruminal fermentation in goats. *Animal Nutrition and Feed Technology*, 14(1), 121- 136. 2014.

KNOWLTON, K. F., TAYLOR, M. S., HILL, S. R., COBB, C., & WILSON, K. F. Manure nutrient excretion by lactating cows fed exogenous phytase and cellulase. *Journal of Dairy Science*, 90(9), 4356-4360. 2007

KRISTENSEN, N. B. et al. Metabolism of silage alcohols in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 90, n. 3, p. 1364-1377, 2007.

LAARMAN, A. H. et al. Butyrate supplementation affects mRNA abundance of genes involved in glycolysis, oxidative phosphorylation and lipogenesis in the rumen epithelium of Holstein dairy cows. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences*, v. 8, n. 4, p. 239-245, 2013.

MALLO, J. J., A. BALFAGON, M. I. GRACIA, P. HONRUBIA, PUYALTO, M. Evaluation of different protections of butyric acid aiming for release in the last part of the gastrointestinal tract of piglets. *J. Anim. Sci.* 90(Suppl. 4):227–229, 2012.

MCALLISTER, T. A.; OOSTING, S. J. Effect of exogenous enzymes on digestibility of barley silage and growth performance of feedlot cattle. *Can. J. Anim. Sci.*, 79 (3): 353-360. 1999.

MCCURDY, D. E. et al. Effects of supplemental butyrate and weaning on rumen fermentation in Holstein calves. *Journal of dairy science*, v. 102, n. 10, p. 8874-8882, 2019.

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*, 92(2), 427-442. 2014.

MOQUET, P. C. A., L. ONRUST, F. van IMMERSEEL, R. DUCATELLE, W. H. HENDRIKS, and R. P. KWAKKEL. Importance of release location on the mode of action of butyrate derivatives in the avian gastrointestinal tract. *Worlds Poult. Sci. J.* 72:61–80. 2016.

NAGARAJA, T. G., LECHTENBERG, K. F. Liver abscess in feedlot cattle. *Veterinary Clinical of North American: Food Animal Practice* 23:351-369. 2007.

NEWBOLD, J. Proposed mechanisms for enzymes as modifiers of ruminal fermentation. In: *Florida Ruminant Nutrition Symposium*. p. 3-17. 1997.

PACHECO, R. D. L., and CRUZ, G. D. Acidosis in cattle. In: Puniya, A. K., Singh, R., and Kamra, D. N. *Rumen microbiology: from evolution for revolution*. New Delhi, Springer India, 1:315-329. 2015.

PENNER, G. B.; BEAUCHEMIN, K. A.; MUTSVANGWA, T. A Evaluation of The Accuracy And Precision Of A Stand-Alone Submersible Continuous Ruminal Ph Measurement System. *Journal Dairy Science.*: 89:2133-2140. 2006.

STORM, A. C., M. D. HANIGAN, N. B. KRISTENSEN. Effects of ruminal ammonia and butyrate concentrations on reticuloruminal epithelial blood flow and volatile fatty acid absorption kinetics under washed reticulorumen conditions in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 94:3980–3994. 2011.

TITI, H. H. Evaluation of feeding a fibrolytic enzyme to lactating dairy cows on their lactational performance during early lactation. *Asian-australasian journal of animal sciences*, 16(5), 677-684. 2003.

VARGAS, J. M.; MENDOZA, G. D.; RUBIO-LOZANO, M. D. la S.; CASTREJÓN, F. A. Effects of exogenous fibrolytic enzymes on ruminant performance. *V.* 45, n. 2, p. 297-306, 2008.

YANG, W. Z.; BEAUCHEMIN, K. A.; RODE, L. M. Effects of an enzyme feed additive on extent of digestion and milk production of lactating dairy cows. *Journal of dairy science*, v. 82, n. 2, p. 391-403, 1999.

ZHANG, Y.-H. P., SCHELL, D. J.; MCMILLAN, J. D. Methodological analysis for determination of enzymatic digestibility of cellulosic materials. *Biotechnology and bioengineering*, v. 96, n. 1, p. 188- 194, 2007.

## **CAPÍTULO 2**

**“Efeitos da adição de enzimas fibrolíticas ou butirato de sódio em dietas de confinamento sobre variáveis metabólicas de bovinos Angus”**

## **1. Introdução**

A digestão ruminal é um processo complexo que envolve uma série de interações entre microrganismos, substrato e metabólitos, composta pelos processos de degradação e fermentação. A degradação ocorre no extracelular, que por ação enzimática, liberadas pela microbiota, reduz as macromoléculas dos alimentos em moléculas menores, utilizadas em processos subsequentes. Já a fermentação ocorre de maneira intracelular, de forma anaeróbica, e utiliza das moléculas absorvidas pela microbiota para a obtenção de energia, liberando alguns metabólitos como subprodutos.

Os Ácidos Graxos de Cadeia Curta (AGCC), acetato, propionato, butirato, etc., são alguns dos produtos gerados durante a fermentação e são utilizados pelo hospedeiro como fonte de energia, podendo suprir até 70% da exigência energética do animal. Esses metabólitos são absorvidos pelas papilas ruminais, estruturas epiteliais responsáveis pelo aumento na superfície de absorção, onde, concentrações de AGCCs elevadas promovem um maior desenvolvimento epitelial buscando manter as concentrações em níveis saudáveis ao órgão, através de sinalizações as células epiteliais relacionadas ao metabolismo, proliferação e diferenciação celular, apoptose, respostas imunológicas e absorção de nutrientes (PENNER et al., 2011).

Buscando maiores produções, estratégias como oferta de dietas ricas em grãos altamente fermentáveis proporcionam maior fermentação e consequentemente maior população microbiana e AGCCs gerados, elevando o aporte energético ao hospedeiro, porém essa alta carga de ácidos gerados exigem uma adaptação epitelial afim de evitar casos de distúrbios metabólicos como acidose. Dentre os AGCC gerados, o butirato é o maior estimulador do desenvolvimento epitelial (MENTSCHER et al., 2001), porém encontrado em menores concentrações independentes a dieta ingerida, variando entre 10 e 15% do AGCCs totais em dietas ricas em fibras ou grãos (MEDEIROS, 2015), respectivamente.

Assim, é levantada a hipótese que a o aumento na concentração de butirato ruminal proporcione efeitos positivos ao metabolismo animal, bem como o desenvolvimento epitelial do rúmen.

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1. Animais e Local do Experimento**

O estudo foi conduzido na Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas (FCAT) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Dracena, no confinamento experimental de bovinos de corte. Foram utilizados 3 animais da raça Angus, castrados, com peso vivo aproximado de 680 kg, 48 meses de idade, e canulados no rúmen.

### **2.2. Delineamento Experimental**

O delineamento experimental do estudo foi em quadrado latino 3x3 duplicado, dessa maneira, os três animais alternaram entre as dietas de acordo com o período experimental, replicado duas vezes.

No período pré experimental os animais ficaram no pasto, e durante os períodos experimentais receberam dietas que variaram apenas no tipo de aditivo ofertado seguindo os seguintes tratamentos: CON) Controle, sem nenhum aditivo; ENZ) Complexo Enzimático; BUT) Butirato de Sódio.

### 2.3. Manejo, Arraçoamento e Cuidado com os Animais

As dietas experimentais foram formuladas utilizando o *software* LRNS (*Large Ruminant Nutrition System*), nível 2, conforme apresentado na Tabela 1. A adaptação foi feita em 14 dias e feita no formato *step-up*, que consiste na retirada gradual de volumoso da dieta e aumento do concentrado em mesma proporção, e foi dividida em 3 dietas: 5 dias de dieta de Adaptação 1 (30% de volumoso), 4 dias de dieta de Adaptação 2 (25% de volumoso) e 5 dias de dieta de Adaptação 3 (20% de volumoso). Após adaptados os animais passaram 14 dias recebendo dieta de terminação, totalizando 28 dias por período experimental.

O nível de inclusão do complexo enzimático foi o mesmo entre as dietas de adaptação e terminação (0,01% da MS), enquanto a inclusão de butirato de sódio foi maior durante o período de adaptação (0,3% da MS), em relação a fase de terminação (0,1% da MS). Ambos os aditivos utilizaram o suplemento mineral como veículo e foram misturados na ração no momento do fornecimento da dieta, diretamente no cocho.

**Tabela 1.** Composição e conteúdo nutricional das dietas experimentais.

| Tratamentos                         | CON         |             |             | ENZ        | BUT        | CON        | ENZ        | BUT        |
|-------------------------------------|-------------|-------------|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Dietas                              | Adaptação 1 | Adaptação 2 | Adaptação 3 | Adaptações | Adaptações | Terminação | Terminação | Terminação |
| <b>Ingredientes (%MS)</b>           |             |             |             |            |            |            |            |            |
| Bagaço de cana                      | 12,00       | 12,00       | 12,00       | -          | -          | 12,00      | -          | -          |
| Feno <i>Tifton</i>                  | 18,00       | 13,00       | 8,00        | -          | -          | 3,00       | -          | -          |
| Milho fino                          | 50,90       | 57,90       | 65,10       | -          | -          | 71,40      | -          | -          |
| Farelo de Soja                      | 16,30       | 14,00       | 11,70       | -          | -          | 10,40      | -          | -          |
| Ureia                               | 0,50        | 0,80        | 0,90        | -          | -          | 0,90       | -          | -          |
| Suplemento Mineral                  | 2,30        | 2,30        | 2,30        | 2,29       | 2,00       | 2,30       | 2,29       | 2,20       |
| Butirato de Sódio                   | -           | -           | -           | -          | 0,30       | -          | -          | 0,10       |
| Complexo Enzimático                 | -           | -           | -           | 0,01       | -          | -          | 0,01       | -          |
| <b>Conteúdo Nutricional (%MS)</b>   |             |             |             |            |            |            |            |            |
| Nutrientes Digestíveis Totais (NDT) | 74,00       | 76,00       | 78,00       | -          | -          | 80,00      | -          | -          |
| Proteína Bruta (PB)                 | 15,50       | 15,40       | 14,5        | -          | -          | 14,30      | -          | -          |
| FDN                                 | 31,80       | 28,6        | 25,6        | -          | -          | 22,40      | -          | -          |
| peFDN <sup>1</sup>                  | 23,00       | 20,00       | 16,00       | -          | -          | 13,00      | -          | -          |
| Ca                                  | 0,66        | 0,64        | 0,62        | -          | -          | 0,60       | -          | -          |
| P                                   | 0,44        | 0,44        | 0,43        | -          | -          | 0,44       | -          | -          |

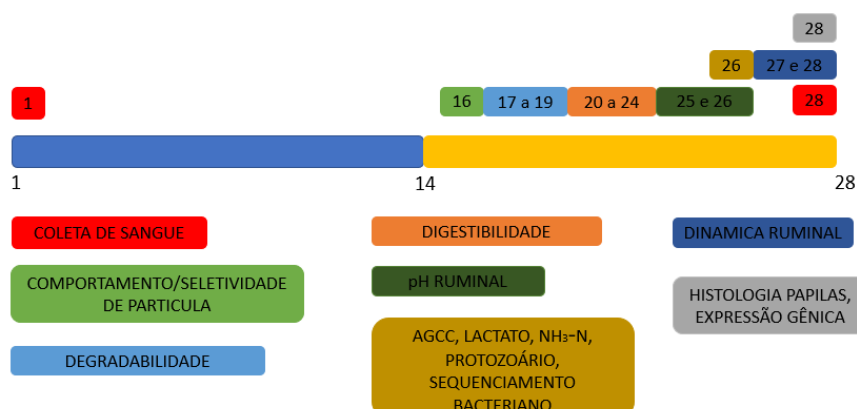
<sup>1</sup>Fibra em detergente neutro fisicamente efetiva

O aditivo utilizado na suplementação de BUT (ADIMIX® Easy) era compreendido por 68% de ácido butírico e 32% de veículo, enquanto o complexo enzimático utilizado (Rovabio® Advance P) era composto por enzimas endo-1,4-β-xilanase (mínimo de 25000 UV/g) e endo-1,3-glucanase (mínimo de 17200 UV/g), ambos fornecidos pela empresa Adisseo Animal Nutrition.

O arraçoamento foi realizado apenas uma vez ao dia no período da manhã (08:00). A quantidade de dieta ofertada teve como base a quantidade de sobras deixadas pelo animal referente ao trato do dia anterior. As sobras foram computadas, coletadas para análises químicas e então descartadas.

As baias eram parcialmente concretadas, com boa facilidade na circulação do ar e com lotação de 1 animal por baia (72 m<sup>2</sup> e 6 m linear de cocho por animal), sempre com água à vontade disponível em bebedouro automático (0,90x1,0x2,0 m).

## 2.4. Período experimental



**Figura 1.** Coletas realizadas durante o período experimental, cores são únicas e indicam diferentes análises e dias realizados.

Ao término de cada período os animais passaram por 7 dias de *washout*, onde foram liberados no pasto para induzir a padronização da microbiota ruminal e evitar interferência dos tratamentos anteriores.

## 2.5. Comportamento e Seletividade de Partículas

A avaliação do comportamento alimentar e a seletividade de partículas foi realizada no dia 16 de cada período experimental, de acordo com Robles et al. (2007). Os dados de comportamento foram registrados a cada 5 minutos durante um período de 24 horas, variando entre ócio, ruminação, alimentação. Além dos dados comportamentais, o Consumo de Matéria Seca (CMS) foi medido e amostras da dieta ofertada e de sua respectiva sobra também foram coletados para quantificação da Matéria Seca (MS) (AOAC, 1995) e Fibra em Detergente Neutro (FDN) segundo Van Soest (1991). Os resultados obtidos foram utilizados para calcular a duração das refeições em minutos, o CMS por refeição, taxa de consumo de FDN, taxa de ruminação (CARVALHO et al., 2006).

Para classificação das partículas quanto ao tamanho, as amostras da dieta e sobras referente ao comportamento ingestivo foram separadas utilizando o *Penn State Particle Size Separator* conforme relatado por Heinrichs and Kononoff (1996). A classificação das partículas utilizou a relação “ingestão real / ingestão esperada” variando de acordo com o diâmetro da peneira: 19 mm (longo), 8 mm (médio), 1,18 mm (curto) e o material presente na bandeja (fino). Os resultados da relação podem ser 1, “<1” e “>1”, que representam ausência de seleção, seleção contra (partícula evitada) e seleção preferencial, respectivamente.

## 2.6. Degradabilidade Ruminal *In Situ*

O ensaio de degradabilidade *in situ* foi realizado nos dias 17, 18 e 19 dos períodos experimentais, segundo metodologia proposta por Mehres e Ørskov (1977). Foram utilizados sacos de náilon, com porosidade de 50 µm, medindo 10,0 x 19,0 cm que abrigarão cerca de 15 g das amostras das dietas experimentais, previamente secas, em estufa a 65°C por 72 horas.

Posteriormente, os sacos foram incubados nos animais durante 0, 6, 12, 24, 48 e 72 horas nos dias descritos acima, sendo que para cada hora de incubação houve 3 réplicas de sacos de náilon, e após a retirada do rúmen, estes foram lavados em água corrente até o líquido da lavagem fluir incolor, levados a estufa a 65°C por 72 horas para posterior análise de amido (POORE et al., 1993), Proteína Bruta (PB) (AOAC, 1995), FDN e Fibra em Detergente Ácido (FDA) (VAN SOEST et al., 1991) e Matéria Mineral (MM) (AOAC, 1995). Os dados de degradabilidade foram ajustados seguindo o modelo de Ørskov e McDonald (1979), enquanto a degradabilidade potencial e efetiva utilizou modelos propostos por Ørskov et al. (1980).

### **2.7. Digestibilidade Total da MS e dos Nutrientes**

A digestibilidade total dos nutrientes (MS, PB, FDN, FDA, amido e MM) foi determinada usando o dióxido de titânio como marcador externo. Entre os dias 15 e 24 dos períodos experimentais, 1g/kg de MS foram administradas via cânula, metade às 08:00 e o restante às 16:00, e entre os dias 20 e 24 foram coletadas amostras de fezes, dietas e sobras. Ao término das coletas, as amostras foram moídas em peneira de 2 mm e formaram uma amostra composta que representa 5 dias de coleta. O coeficiente de digestibilidade aparente dos nutrientes foi calculado de acordo com a concentração de dióxido de titânio nas amostras de dieta, sobra e fezes seguindo a metodologia proposta por Pezzato et al. (2002).

### **2.8. Mensuração Contínua de pH Ruminal**

Foram registrados os valores de pH, temperatura e oxirredução no rúmen a cada 5 minutos durante os dias 25 e 26. O sistema de mensuração utilizado foi “Lethbridge Research Centre” (LRCpH) desenvolvido utilizando um data logger (modelo T7-1 LRCpH, Dascor, Escondido, CA). Dois pesos de 900g foram presos ao logger para garantir que o mesmo permaneça próximo ao epitélio ruminal (PENNER et al., 2006).

Os dados coletados foram utilizados para o cálculo de pH mínimo, pH médio, pH máximo, tempo em que o pH permaneceu abaixo de 5,2; 5,6 e 6,2 em minutos e área de pH abaixo de 5,2; 5,6 e 6,2 segundo Bevans et al. (2005).

Para calibração do sensor foi realizada calibração utilizando soluções com pH 7,0 e 4,0, permitindo um ajuste dos dados mensurados.

### **2.9. Avaliação dos Produtos da Fermentação Ruminal**

Foram coletadas amostras de líquido ruminal 0, 4, 8 e 12 horas após a oferta da dieta do dia 26 de cada período experimental. Em cada horário foram coletadas amostras de diferentes pontos do rúmen e espremida em malha fina. Aproximadamente 50 mL de líquido ruminal foram retirados e levados para o laboratório onde foram preparados para as futuras análises de AGCC's, lactato e NH<sub>3</sub>-N. A coleta referente a hora 0 foi feita antes do fornecimento da alimentação.

Durante a preparação das amostras, 25 mL do líquido ruminal foi centrifugado por 15 min a 3500 rpm, e alíquotas dos sobrenadante foram utilizadas para a realização das análises já citadas.

A determinação dos AGCC's foi feita utilizando a metodologia proposta por Erwin et al. (1961), por meio de cromatografia gasosa de alta performance, 2 mL do sobrenadante foi colocado em tubo de ensaio arrolhado, sendo acondicionado com 0,4 mL de ácido fórmico e mantido em congelador (-20 °C) até o momento da análise, que utilizou um cromatógrafo a gás (Finnigan, modelo 9001) equipado com coluna Megabore da Ohio Valley, modelo OV-351 de 1 Micron, possuindo 30 mm de comprimento e 0,53 mm de diâmetro.

A determinação da concentração do nitrogênio amoniacal utilizou 2 mL do sobrenadante que foram colocados em tubos de ensaio contendo 1 mL de ácido sulfúrico 1N e mantidos em congelador (-20°C) até o momento da análise colorimétrica segundo método descrito por Kulasek (1972) e adaptado por Foldager (1977).

A concentração total de Ácido Lático foi mensurada pela técnica colorimétrica descrita por Pryce (1969).

## **2.10. Sequenciamento das Comunidades Bacterianas Ruminais**

No dia 26 de cada período experimental, 4 horas após a alimentação, 50 mL do conteúdo ruminal (parte sólida + parte líquida) foram coletadas em tubos estéreis e congeladas a -80°C.

O DNA total foi extraído por ruptura mecânica e protocolo de extração fenólica. Todas amostras com o DNA extraído foram resuspensas em buffer de eluição de DNA, e consequentemente foram quantificadas pelo Qubit Fluometer invitrogen, (San Diego, CA, USA) e armazenadas a -80°C. Todas as amostras foram diluídas a 10ng de DNA por µl para garantir no mínimo 50ng por reação de PCR.

O procedimento do PCR foi realizado por meio da utilização de primers universais que flanqueiam a região variável 4 (V4) do gene bacteriano 16S RNAr. Um total de 50 ng de DNA, 0,4 µM de cada primer, 12,5 µl de 2X Hot Start Ready Mix (KAPA Biosystems, Wilmington, MA, USA) e água (DNA/RNA free water) até o volume de 25 µl foram utilizados para a reação de amplificação das amostras. Cada ciclo ocorreu da seguinte maneira: desnaturação inicial 95°C por 3 minutos seguido de 25 ciclos a 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, e para extensão final 72°C por 5 minutos. Depois da amplificação, 25 µL de cada amostra foi transferida para o gel de agarose (Low melt) com mais 5 µL de 6x Orange loading dye. Amostras que mostraram bandas brilhantes em torno de 380 bp foram coletadas do gel para posterior processo de extração e sequenciamento por meio do MiSeq (Illumina, San Diego, CA, USA) utilizando-se 5% PhiX para controle do DNA em kits MiSeq v4 (Illumina, San Diego, CA, USA; Dill-McFarland et al., 2017). As análises de PCR e de sequenciamento das amostras deste estudo foram realizadas na University of Wisconsin. As sequências obtidas do Illumina MiSeq foram processadas utilizando-se o software Mothur v.1.40.0 ([www.mothur.org/wiki](http://www.mothur.org/wiki)). As sequências das comunidades bacterianas obtidas foram alinhadas contra a base de dados referência chamada de SILVA 16S RNAr segundo Dill-McFarland et al. (2017). Foram calculados a diversidade alpha (diversidade da comunidade bacteriana para cada animal) por meio da estimativa Chao, que mede a riqueza de espécies bacterianas da amostra, e Shannon, que calcula o índice de diversidade microbiana. Da mesma forma, foram calculados a diversidade beta, o qual mede as diferenças entre a composição das comunidades bacterianas entre animais,

por meio dos testes de Bray-Curtis e Jaccard. Além disso, abundâncias relativas de comunidades bacterianas de interesse e daquelas que se mostrarem em maior número foram também determinadas (WEIMER et al., 2017). O sequenciamento de bactérias foi realizado no “Department of Bacteriology” na Universidade de Wisconsin, Madison.

### **2.11. Protozoários Ciliados**

As coletas para contagem diferencial dos protozoários ciliados no rúmen ocorreram no dia 26 de cada período experimental, 4 horas após o fornecimento da alimentação. Onde 10 mL do mesmo conteúdo material coletado para a análise de sequenciamento bacteriano foram armazenados em tubos contendo 20 mL de formaldeído 50% (v/v). Em 1 mL da amostra diluída em formol, será adicionado verde brilhante e glicerol, diluindo-a em 30 vezes.

A contagem foi feita utilizando uma câmara de contagem de “Sedgwick Rafter” com medidas internas de 50 mm X 20 mm X 1 mm (capacidade 1 mL), conforme Dehority (1993), onde 100 campos óticos foram contados através do retículo, diferenciando protozoários dos gêneros *Isotricha*, *Dasytricha*, *Entodinium* e *Diplodinium*.

### **2.12. Dinâmica Ruminal**

O rúmen dos animais fora esvaziado nos dias 27 às 11:00 (3 horas após a alimentação) e dia 28 às 08:00 (antes da alimentação), em cada período experimental. O conteúdo ruminal foi separado em fração sólida e líquida e em seguida pesados Dado e Allen (1995). Uma amostra de 600g replicou em um pote o conteúdo ruminal, respeitando as proporções da fração líquida e sólida encontradas. Esta amostra foi refrigerada (-20°C) até a realização da análise de MS (AOAC, 1995).

Com base nos valores de massa sólida e líquida, assim como o CMS, a taxa de desaparecimento ruminal foi expressa em %/h e kg/h.

### **2.13. Hormônios Metabólicos e Metabólitos**

No dia 1 e 28 de cada período experimental amostras de sangue foram coletadas diretamente da veia coccígea em tubos heparinizados e imediatamente centrifugadas. O plasma foi coletado e armazenado em freezer -80°C. Foram analisadas as concentrações de haptoglobina, ceruloplasmina, amiloide sérico A, imunoglobulina A, imunoglobulina G, proteína C-reativa e proteína ligante do LPS (LBP), Ácidos Graxos Não Esterificados (AGNE), glicose e insulina (Emmanuel et al., 2008; Guzelbektes et al., 2010; Kwon et al., 2011; Cooke e Arthington, 2013).

### **2.14. Histologia das Papilas Ruminais**

Para a avaliação histológica das papilas, foram coletadas papilas da parede ruminal no dia 28 do período experimental. Para emblocagem, as amostras passarão por uma série de soluções com permanência de 1 hora

cada, são elas: álcool 70%, álcool 90%, álcool 100%, álcool etílico absoluto I, álcool etílico absoluto II, xilol I, xilol II, parafina I (Histosec ®) e parafina II (Histosec ®). Ao término das etapas anteriores, serão montadas travas de alumínio, preenchidas com parafina III (Histosec ®) e a amostra da papila ruminal segundo Odongo et al. (2006).

Serão realizados cortes desse material no micrótomo em secções de 6 µm, os quais passarão pelos corantes Hematoxilina–Eosina Hematoxilina de Harris.

As mensurações histológicas, altura, largura e área de papilas, espessura do epitélio queratinizado e índice mitótico, foram realizadas após a montagem das lâminas. Para a análise histológica, o Analisador Imagens Leica Qwin foi utilizado através do microscópio eletrônico de luz Leica.

### **2.15. Expressão dos Genes Relacionados a Absorção**

As amostras destinadas a análise dos genes relacionados a absorção dos AGCC foram coletadas juntamente com as amostras destinadas a histologia, utilizando materiais previamente esterilizados e armazenadas em tubos estéreis, livres de DNA, RNA, DNase e RNase, e imediatamente encaminhados para estocagem em freezer -80°C.

No momento da análise as amostras de papilas ruminais foram homogeneizadas utilizando um homogeneizador de tecidos (Polytron®), em seguida o RNA foi extraído através da adição de 0,2 mL de clorofórmico e precipitado utilizando 0,5 mL de isopropanol, seguido por uma lavagem do pellet de RNA utilizando 1 mL de etanol 75%.

As amostras foram quantificadas utilizando espectrofotômetro NanoDrop™ utilizando os comprimentos de ondas de 260 nm e 280 nm, quanto a presença de ácidos nucleicos e proteínas poluentes, respectivamente. Em caso de não contaminação as amostras seguirão para a etapa de transcrição reversa, que se utiliza da enzima transcriptase reversa, utilizando os valores de concentrações de RNA obtidos pelo NanoDrop, produzindo o cDNA que será analisado utilizando PCR-RT.

### **2.16. Análises Estatísticas**

Foram realizados testes de normalidade dos resíduos e de heterogeneidade de variâncias antes de se proceder a análise de variância, e quando necessário, os dados foram transformados. O efeito dos tratamentos foi considerado como fixo; no entanto, quando houver medidas repetidas no tempo, o efeito dessas medidas e da interação das mesmas com os tratamentos, será considerado aleatório. Da mesma maneira, os efeitos de período e animal foram considerados aleatórios no modelo. Os dados deste estudo foram analisados pelo PROC MIXED do SAS (2003), considerando o nível de 5% de significância.

## **3. Resultados**

Não houve diferenças estatísticas entre o CMS durante a fase de adaptação, terminação e em porcentagem do peso vivo ( $P>0.78$ ; Tabela 2). Também não foram observadas diferenças no comportamento

ingestivo dos animais, onde os tratamentos não influenciaram os comportamentos de ócio, ruminação e busca por alimentos ( $P>0.12$ ; Tabela 3), bem como seleção alimentar da ração ofertada, buscando especificamente por partículas médias, curtas ou finas ( $P>0.16$ ; Tabela 3), entretanto o índice de seleção de partículas longas foi menor para animais do tratamento ENZ em relação aos demais tratamentos ( $P<0.01$ ).

**Tabela 2.** Consumo de matéria seca de animais Angus canulados no rúmen em confinamento com adição de enzimas fibrolíticas exógenas ou butirato de sódio.

| Item (base na MS)         | Tratamentos |                  |                  | Valor de P       |            |
|---------------------------|-------------|------------------|------------------|------------------|------------|
|                           | CON         | ENZ <sup>1</sup> | BUT <sup>2</sup> | EPM <sup>3</sup> | Tratamento |
| Consumo (Kg) – Adaptação  | 18.60       | 18.38            | 18.60            | 0.89             | 0.82       |
| Consumo (Kg) - Terminação | 20.68       | 20.19            | 21.23            | 1.56             | 0.78       |
| Consumo (Kg) - Total      | 19.60       | 19.25            | 18.86            | 1.16             | 0.76       |
| Consumo - % do Peso Vivo  | 2.57        | 2.51             | 2.59             | 0.12             | 0.78       |

<sup>1</sup>Enzima Fibrolítica (Rovabio). <sup>2</sup>Butirato de Sódio (Adimix). <sup>3</sup>Erro Padrão Médio.

**Tabela 3.** Comportamento alimentar e seletividade de partículas longas, médias, curtas e finas em animais Angus canulados no rúmen em confinamento com adição de enzimas fibrolíticas ou butirato de sódio

|                                        | Tratamentos |                  |                  | Valor de P       |            |
|----------------------------------------|-------------|------------------|------------------|------------------|------------|
|                                        | CON         | ENZ <sup>1</sup> | BUT <sup>2</sup> | EPM <sup>3</sup> | Tratamento |
| Seletividade de partículas             |             |                  |                  |                  |            |
| Longo                                  | 0.97a       | 0.76b            | 0.93a            | 0.04             | <0.01      |
| Médio                                  | 0.98        | 0.92             | 0.96             | 0.04             | 0.61       |
| Curto                                  | 1.01        | 1.04             | 1.04             | 0.01             | 0.18       |
| Fino                                   | 0.98        | 0.95             | 0.93             | 0.03             | 0.16       |
| Comportamento ingestivo                |             |                  |                  |                  |            |
| Tempo em ócio, min/d                   | 830.83      | 880.00           | 880.83           | 38.22            | 0.30       |
| Tempo em ruminação, min/d              | 330.83      | 289.17           | 285.83           | 24.76            | 0.12       |
| Tempo em alimentação, min/d            | 231.67      | 214.17           | 227.50           | 23.09            | 0.53       |
| Ingestão MS, kg                        | 21.21       | 19.09            | 21.05            | 1.64             | 0.28       |
| Ingestão FDN, kg                       | 5.34        | 4.36             | 5.01             | 0.61             | 0.34       |
| Refeições por dia, <i>n</i>            | 15.67       | 17.33            | 17.00            | 1.00             | 0.48       |
| Tempo de refeição, min                 | 14.80       | 12.72            | 13.36            | 1.31             | 0.15       |
| CMS por refeição, kg                   | 1.39        | 1.11             | 1.25             | 0.11             | 0.06       |
| Taxa de alimentação MS, min/kg         | 10.72       | 11.45            | 10.89            | 0.84             | 0.21       |
| Taxa de alimentação FDN, min/kg de FDN | 44.13       | 54.45            | 46.79            | 5.69             | 0.38       |
| Taxa de ruminação MS, min/kg           | 15.97       | 15.28            | 14.21            | 1.63             | 0.31       |
| Taxa de ruminação FDN, min/kg de FDN   | 66.02       | 70.50            | 64.21            | 8.61             | 0.83       |

<sup>1</sup>Enzima Fibrolítica (Rovabio). <sup>2</sup>Butirato de Sódio (Adimix). <sup>3</sup>Erro Padrão Médio.

Não foram encontrados efeitos de tratamentos sobre os parâmetros analisados na degradabilidade ruminal *in situ* da MS ( $P>0.33$ ), FDN ( $P>0.31$ ), FDA ( $P>0.74$ ) e PB ( $P>0.14$ ), entretanto animais alimentados com BUT apresentaram, numericamente, maior potencial de degradação da proteína bruta.

**Tabela 4.** Degradabilidade ruminal *in situ* dos nutrientes de animais Angus canulados no rúmen em confinamento com adição de enzimas fibrolíticas exógenas ou butirato de sódio.

| Itens (%)                        | Tratamentos |                  |                  |                  | Valor de P |
|----------------------------------|-------------|------------------|------------------|------------------|------------|
|                                  | CON         | ENZ <sup>1</sup> | BUT <sup>2</sup> | EPM <sup>3</sup> | Tratamento |
| Degradabilidade Potencial MS     | 82.7        | 78.88            | 81.34            | 2.2              | 0.43       |
| Degradabilidade Efetiva MS 2%    | 66.11       | 66.25            | 67.61            | 1.75             | 0.33       |
| Degradabilidade Efetiva MS 5%    | 54.2        | 54.77            | 55.02            | 1.99             | 0.85       |
| Degradabilidade Efetiva MS 8%    | 47.26       | 47.62            | 47.5             | 1.87             | 0.96       |
| Degradabilidade Potencial FDN    | 57.15       | 56.83            | 59.22            | 1.68             | 0.31       |
| Degradabilidade Efetiva FDN 2%   | 52.33       | 52.32            | 52.67            | 1.16             | 0.96       |
| Degradabilidade Efetiva FDN 5%   | 47.08       | 47.38            | 46.91            | 1.18             | 0.89       |
| Degradabilidade Efetiva FDN 8%   | 43.28       | 43.76            | 42.86            | 1.26             | 0.61       |
| Degradabilidade Potencial FDA    | 47.81       | 46.82            | 49.04            | 2.24             | 0.78       |
| Degradabilidade Efetiva FDA 2%   | 45.64       | 45.07            | 45.40            | 1.27             | 0.94       |
| Degradabilidade Efetiva FDA 5%   | 43.25       | 43.08            | 42.30            | 1.25             | 0.74       |
| Degradabilidade Efetiva FDA 8%   | 41.45       | 41.58            | 40.59            | 1.41             | 0.86       |
| Degradabilidade Potencial PB     | 86.41       | 86.22            | 88.57            | 2.05             | 0.14       |
| Degradabilidade Efetiva PB 2%    | 76.24       | 75.23            | 76.59            | 1.36             | 0.42       |
| Degradabilidade Efetiva PB 5%    | 65.86       | 64.32            | 64.85            | 0.91             | 0.42       |
| Degradabilidade Efetiva PB 8%    | 58.8        | 57.08            | 57.3             | 0.74             | 0.21       |
| Degradabilidade Potencial Amido  | 98.12       | 98.25            | 99.54            | 0.83             | 0.09       |
| Degradabilidade Efetiva Amido 2% | 83.8        | 84.09            | 84.35            | 1.24             | 0.77       |
| Degradabilidade Efetiva Amido 5% | 69.96       | 70.4             | 69.89            | 1.7              | 0.89       |
| Degradabilidade Efetiva Amido 8% | 60.93       | 61.44            | 60.62            | 1.81             | 0.81       |

<sup>1</sup>Enzima Fibrolítica (Rovabio). <sup>2</sup>Butirato de Sódio (Adimix). <sup>3</sup>Erro Padrão Médio.

Não houve diferenças estatísticas em relação a digestibilidade da MS, FDA, PB e amido ( $P>0.69$ ), como apresentado na Tabela 5, bem como a concentração de amido nas fezes ( $P=0.51$ ), a digestibilidade do FDN também não apresentou efeitos de tratamento estatisticamente significativos, embora os valores encontrados sejam mais discrepantes em relação aos outros fatores analisados ( $P=0.14$ ).

**Tabela 5.** Digestibilidade total e dos nutrientes de animais Angus canulados no rúmen em confinamento com adição de enzimas fibrolíticas exógenas ou butirato de sódio.

|                                  | Tratamentos |                  |                  |                  | Valor de P |
|----------------------------------|-------------|------------------|------------------|------------------|------------|
|                                  | CON         | ENZ <sup>1</sup> | BUT <sup>2</sup> | EPM <sup>3</sup> | Tratamento |
| Matéria Seca (MS)                | 94.56       | 94.23            | 94.36            | 0.39             | 0.69       |
| Fibra em Detergente Neutro (FDN) | 66.39       | 59.31            | 63.8             | 2.22             | 0.14       |
| Fibra em Detergente Ácido (FDA)  | 63.63       | 62.11            | 63.44            | 3.21             | 0.92       |
| Proteína Bruta (PB)              | 82.32       | 81.69            | 82.05            | 1.57             | 0.94       |
| Amido                            | 95.23       | 95.97            | 96.05            | 1.08             | 0.83       |
| Amido Fecal                      | 10.92       | 7.65             | 8.9              | 1.98             | 0.51       |

<sup>1</sup>Enzima Fibrolítica (Rovabio). <sup>2</sup>Butirato de Sódio (Adimix). <sup>3</sup>Erro Padrão Médio.

Os pHs mínimos, médios e máximos não sofreram efeitos de tratamento ( $P>0.23$ ; Tabela 6), os parâmetros relacionados a tempo de permanência e área de curva abaixo dos pHs 6.2, 5.6 e 5.2 também não se diferenciaram do tratamento CON ( $P>0.45$ ). A temperatura ruminal ( $^{\circ}\text{C}$ ) foi menor em animais que consumiram ENZ em relação a BUT e CON, 39.63 vs 40.12, 40.02 ( $P=0.04$ ; Tabela 6).

**Tabela 6.** pH, temperatura e potencial redox de animais Angus canulados no rúmen em confinamento com adição de enzimas fibrolíticas exógenas ou butirato de sódio.

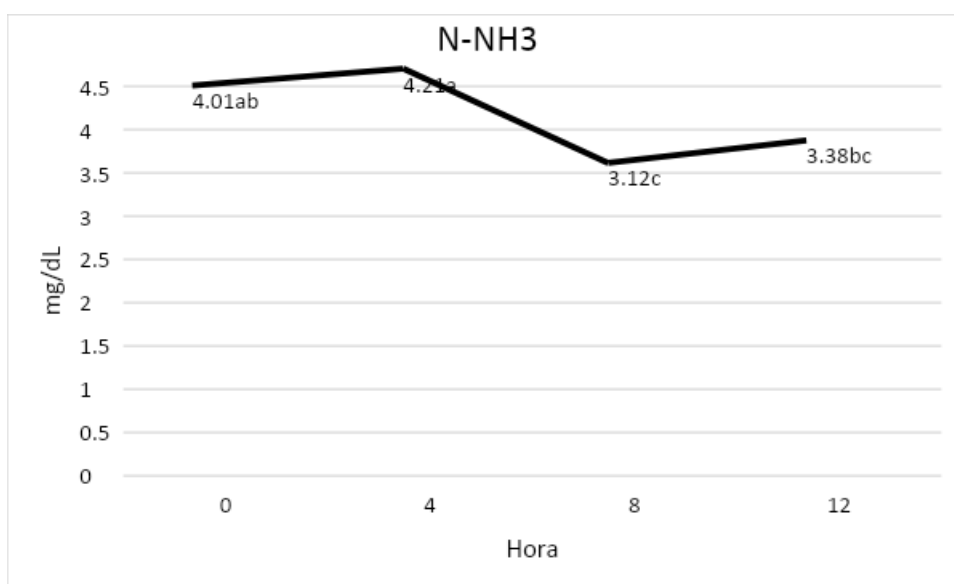
|                                           | Tratamentos |                  |                  |                  | Valor de P |
|-------------------------------------------|-------------|------------------|------------------|------------------|------------|
|                                           | CON         | ENZ <sup>1</sup> | BUT <sup>2</sup> | EPM <sup>3</sup> | Tratamento |
| pH máximo                                 | 6.70        | 6.45             | 6.46             | 0.18             | 0.38       |
| pH mínimo                                 | 5.07        | 4.90             | 4.94             | 0.12             | 0.23       |
| pH médio                                  | 5.66        | 5.58             | 5.53             | 0.17             | 0.69       |
| Tempo pH<6.2 (min)                        | 1149.17     | 1293.33          | 1230.83          | 122.53           | 0.45       |
| Tempo pH<5.6 (min)                        | 770.83      | 777.50           | 850.83           | 207.05           | 0.92       |
| Tempo pH<5.2 (min)                        | 435.00      | 314.17           | 571.67           | 189.74           | 0.51       |
| Área abaixo pH<6.2                        | 912.55      | 949.58           | 1031.97          | 176.55           | 0.88       |
| Área abaixo pH<5.6                        | 325.61      | 293.20           | 407.97           | 121.77           | 0.55       |
| Área abaixo pH<5.2                        | 81.98       | 71.21            | 116.00           | 47.83            | 0.68       |
| Temperatura ruminal( $^{\circ}\text{C}$ ) | 40.12a      | 39.63b           | 40.02a           | 0.37             | 0.04       |
| Potencial redox                           | -294.29     | -288.85          | -290.58          | 9.32             | 0.72       |

<sup>1</sup>Enzima Fibrolítica (Rovabio). <sup>2</sup>Butirato de Sódio (Adimix). <sup>3</sup>Erro Padrão Médio.

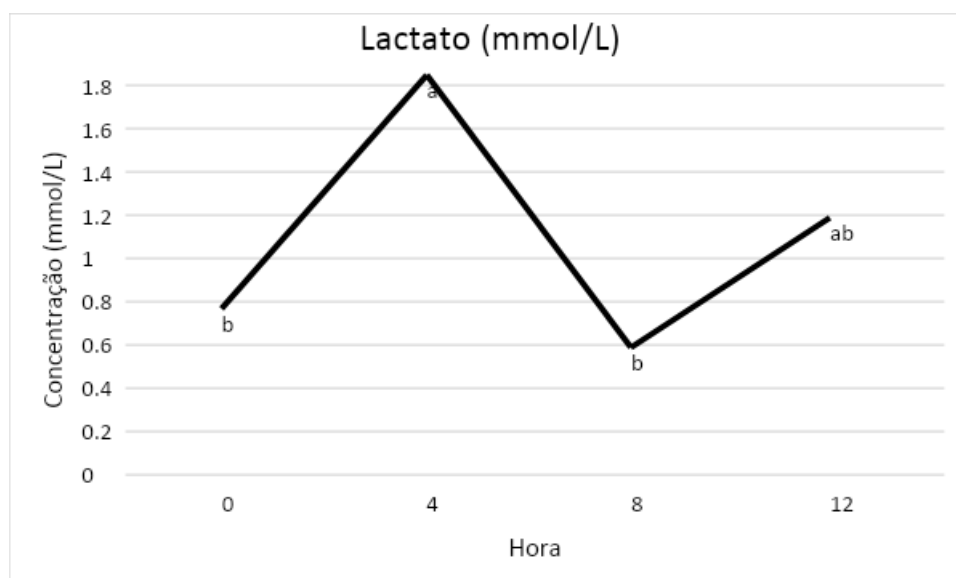
O perfil de AGCC não foi alterado em funções dos tratamentos e horários coletados ( $P>0.71$  e 0.23; Tabela 7). A concentração de  $\text{N-NH}_3$  e lactato não se diferiram significativamente entre os tratamentos, entretanto, sofreram alterações significativas em suas concentrações nos diferentes horários analisados conforme as Figuras 2 e 3 ( $P<0.01$  e  $P=0.04$ , respectivamente; Tabela 7).

**Tabela 7.** Perfil de ácidos graxos de cadeia curta de animais Angus canulados no rúmen em confinamento com adição de enzimas fibrolíticas exógenas ou butirato de sódio.

|                           | Tratamentos |                  |                  |                  | Valor de P |       | Tratamento *<br>Hora |
|---------------------------|-------------|------------------|------------------|------------------|------------|-------|----------------------|
|                           | CON         | ENZ <sup>1</sup> | BUT <sup>2</sup> | EPM <sub>3</sub> | Tratamento | Hora  |                      |
| Acetato (%)               | 61.05       | 60.85            | 61.45            | 3.63             | 0.86       | 0.23  | 0.96                 |
| Propionato (%)            | 26.30       | 27.27            | 26.08            | 3.47             | 0.71       | 0.55  | 0.98                 |
| Butirato (%)              | 12.63       | 11.86            | 12.46            | 1.27             | 0.96       | 0.75  | 0.78                 |
| Total AGCC (mmol/L)       | 104.12      | 107.06           | 103.93           | 6.44             | 0.71       | 0.36  | 0.98                 |
| Acetato:Propionato        | 2.49        | 2.51             | 2.48             | 0.29             | 0.99       | 0.89  | 0.88                 |
| N-NH <sub>3</sub> (mg/dL) | 3.80        | 3.61             | 3.62             | 0.67             | 0.74       | <0.01 | 0.12                 |
| Lactato (mmol/L)          | 0.99        | 0.63             | 1.09             | 0.29             | 0.28       | 0.04  | 0.10                 |



**Figura 2.** Concentração de N-NH<sub>3</sub> nos diferentes horários de coletas.



**Figura 3.** Concentração de lactato nos diferentes horários de coletas.

A população de protozoários dos gêneros *Dasytricha* e *Entodinium* não foram estatisticamente diferentes ( $P>0.15$ ; Tabela 8), enquanto protozoários do gênero *Diplodinium* foram reduzidos em animais alimentados com ENZ, numericamente ( $10^3/\text{mL}$ ;  $P<0.01$ ; Tabela 6) e em porcentagem ( $P=0.03$ ; Tabela 8). Enquanto protozoários *Isotrichas* não foram alterados numericamente, porém percentualmente, a inclusão de ENZ ou BUT reduz a população de tal em relação a tratamento CON.

**Tabela 8.** Contagem diferencial de protozoários ciliados ( $10^3/\text{mL}$ ) de animais Angus canulados no rúmen em confinamento com adição de enzimas fibrolíticas exógenas ou butirato de sódio.

|               | Tratamentos |                  |                  | Valor de P       |            |
|---------------|-------------|------------------|------------------|------------------|------------|
|               | CON         | ENZ <sup>1</sup> | BUT <sup>2</sup> | EPM <sup>3</sup> | Tratamento |
| Isotricha     | 21.20       | 22.20            | 15.40            | 3.68             | 0.12       |
| Dasytricha    | 23.00       | 25.60            | 19.20            | 3.83             | 0.24       |
| Entodinium    | 108.00      | 140.80           | 98.60            | 25.96            | 0.15       |
| Dyplodinium   | 10.2a       | 7.40b            | 12.20a           | 2.35             | <0.01      |
| Total         | 162.40      | 196.00           | 145.40           | 32.65            | 0.23       |
| % Isotricha   | 13.98a      | 11.21b           | 10.76b           | 1.01             | 0.02       |
| % Dasytricha  | 15.30       | 14.15            | 13.46            | 1.63             | 0.69       |
| % Entodinium  | 64.06       | 71.08            | 66.15            | 2.94             | 0.16       |
| % Dyplodinium | 6.66ab      | 3.56b            | 9.64a            | 1.82             | 0.03       |

<sup>1</sup>Enzima Fibrolítica (Rovabio). <sup>2</sup>Butirato de Sódio (Adimix). <sup>3</sup>Erro Padrão Médio.

Os tratamentos não exerceram efeitos significativos nos parâmetros analisados pela dinâmica ruminal ( $P>0.09$ ; Tabela 9), exceto na taxa de desaparecimento expressa em %/h, onde o tratamento ENZ favoreceu o desaparecimento da digesta ruminal em relação aos demais tratamentos CON e BUT ( $P=0.05$ ; Tabela 9), 8.61 vs 6.38 e 7.12, respectivamente.

**Tabela 9.** Peso vivo, frações do conteúdo ruminal e taxa de desaparecimento de animais Angus canulados no rúmen em confinamento com adição de enzimas fibrolíticas exógenas ou butirato de sódio.

|                                 | Tratamentos |                  |                  |                  | Valor de P |
|---------------------------------|-------------|------------------|------------------|------------------|------------|
|                                 | CON         | ENZ <sup>1</sup> | BUT <sup>2</sup> | EPM <sup>3</sup> | Tratamento |
| Peso vivo final (kg)            | 776.82      | 764.67           | 781.43           | 10.89            | 0.33       |
| Massa líquida (kg)              | 61.04       | 55.86            | 59.21            | 5.30             | 0.51       |
| Massa sólida (kg)               | 13.86       | 12.47            | 13.48            | 1.05             | 0.59       |
| Massa total (kg)                | 74.90       | 68.33            | 72.68            | 5.22             | 0.52       |
| Massa líquida (% peso vivo)     | 7.87        | 7.25             | 7.64             | 0.52             | 0.52       |
| Massa sólida (% peso vivo)      | 1.82        | 1.63             | 1.75             | 0.19             | 0.61       |
| Massa total (% peso vivo)       | 9.69        | 8.87             | 9.39             | 0.60             | 0.53       |
| Matéria seca – conteúdo ruminal | 18.84       | 18.26            | 18.85            | 2.02             | 0.79       |
| Taxa de desaparecimento (%h)    | 6.36b       | 8.61a            | 7.12ab           | 1.11             | 0.05       |
| Taxa de desaparecimento (kg/h)  | 0.86        | 0.96             | 0.93             | 0.07             | 0.09       |

<sup>1</sup>Enzima Fibrolítica (Rovabio). <sup>2</sup>Butirato de Sódio (Adimix). <sup>3</sup>Erro Padrão Médio.

A concentração sanguínea de proteína de ligação a lipopolissacarídeos (LBP) foi maior no tratamento CON em relação a ENZ, enquanto BUT não se diferenciou de ambos ( $P=0.02$ ; Tabela 10). Não houve diferenças estatísticas nas demais proteínas relacionadas a processos inflamatórios ( $P>0.09$ ), bem como insulina, AGNE e glicose ( $P>0.18$ ; Tabela 10).

**Tabela 10.** Hormônios sanguíneos e proteínas ligadas ao processo inflamatório de animais Angus canulados no rúmen em confinamento com adição de enzimas fibrolíticas exógenas ou butirato de sódio.

|                           | Tratamentos |                  |                  |                  | Valor de P     |
|---------------------------|-------------|------------------|------------------|------------------|----------------|
|                           | CON         | ENZ <sup>1</sup> | BUT <sup>2</sup> | EPM <sup>3</sup> | Tratament<br>o |
| Proteína C-reativa (mg/L) | 6.52        | 6.43             | 7.68             | 0.49             | 0.09           |
| LBP (ng/mL)               | 376.37a     | 328.70b          | 343.10ab         | 13.09            | 0.02           |
| IgG (µg/mL)               | 89.15       | 85.97            | 109.01           | 12.61            | 0.17           |
| IgA (µg/mL)               | 12.63       | 13.67            | 14.25            | 2.93             | 0.51           |
| Haptoglobina (µg/mL)      | 143.36      | 131.49           | 148.69           | 69.98            | 0.25           |
| Ceruloplasmina (IU/L)     | 32.01       | 33.20            | 35.26            | 5.79             | 0.50           |
| Amilóide sérica A (µg/mL) | 8.29        | 7.66             | 8.13             | 0.39             | 0.34           |
| Insulina (mIU/L)          | 24.56       | 21.63            | 30.89            | 2.85             | 0.18           |
| AGNE (µmol/L)             | 126.86      | 122.12           | 125.16           | 33.48            | 0.99           |
| Glicose (mg/dL)           | 222.25      | 245.23           | 200.69           | 116.69           | 0.72           |

<sup>1</sup>Enzima Fibrolítica (Rovabio). <sup>2</sup>Butirato de Sódio (Adimix). <sup>3</sup>Erro Padrão Médio. <sup>4</sup>Proteína de ligação a lipopolissacarídeos. <sup>5</sup>Ácidos graxos não esterificados

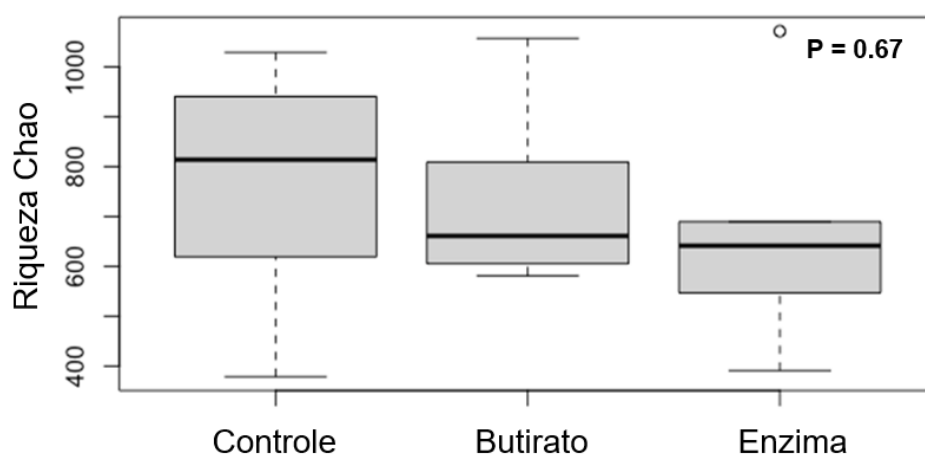
As variáveis histológicas analisadas estão demonstradas na Tabela 11, onde não houve efeito de tratamento nos parâmetros relacionados as dimensões das papilas, altura, largura e área ( $P>0.21$ ), assim como nos parâmetros microscópicos, espessura de queratina e índice mitótico ( $P>0.23$ ).

**Tabela 11.** Variáveis histológicas de papilas ruminais de Angus canulados no rúmen em confinamento com adição de enzimas fibrolíticas exógenas ou butirato de sódio.

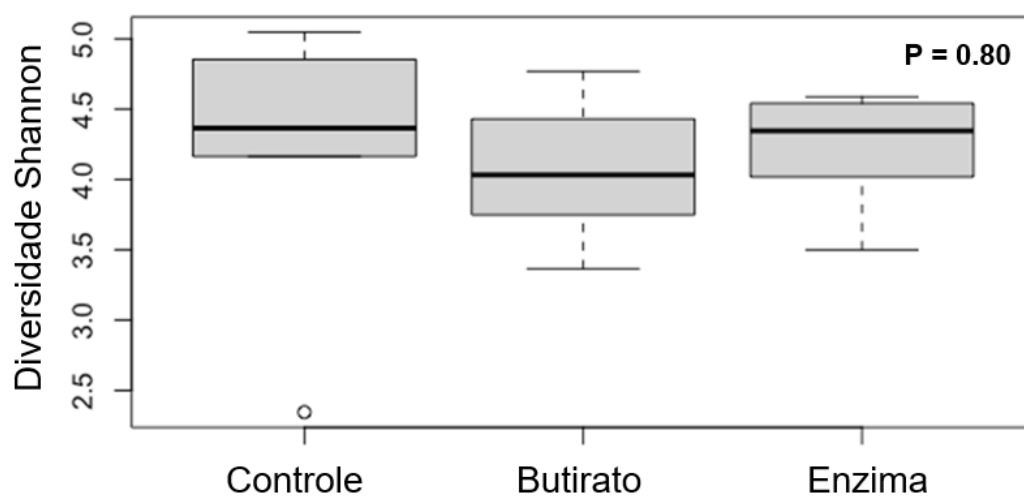
|                                   | Tratamentos |                  |                  |                  | Valor de P |
|-----------------------------------|-------------|------------------|------------------|------------------|------------|
|                                   | CON         | ENZ <sup>1</sup> | BUT <sup>2</sup> | EPM <sup>3</sup> | Tratamento |
| Altura (mm)                       | 7.84        | 8.28             | 8.14             | 0.41             | 0.73       |
| Largura (mm)                      | 2.44        | 2.69             | 2.68             | 0.14             | 0.21       |
| Área da Papila (mm <sup>2</sup> ) | 19.35       | 22.37            | 21.88            | 1.76             | 0.44       |
| Espessura de Queratina (µm)       | 20.77       | 20.02            | 20.79            | 1.02             | 0.75       |
| Índice Mitótico, n                | 230.17      | 242.17           | 271.83           | 13.04            | 0.23       |
| Índice Mitótico, %                | 12.11       | 13.01            | 13.59            | 0.65             | 0.23       |

<sup>1</sup>Enzima Fibrolítica (Rovabio). <sup>2</sup>Butirato de Sódio (Adimix). <sup>3</sup>Erro Padrão Médio.

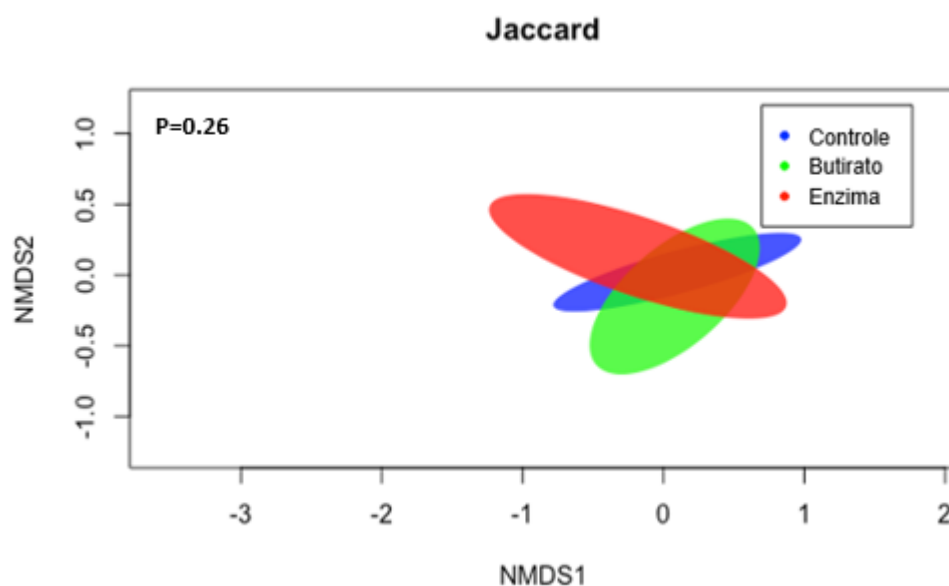
Não houve diferenças significativas na alfa-diversidade da população de bactérias ruminais com a inclusão dos aditivos alimentares, expressos pelos índices de riqueza microbiana Chao ( $P=0.67$ ; Figura 4) e diversidade microbiana Shannon ( $P=0.80$ ; Figura 5). Também não foram encontrados efeitos de tratamento sobre a beta-diversidade, expressos pelos índices de Jaccard ( $P=0.26$ ; Figura 6) e Bray-Curtis ( $P=0.27$ ; Figura 7). Os dados de abundância relativa demonstraram uma maior participação de bactérias do filo *Bacteroidetes*, seguidos por *Firmicutes* e *Proteobacterias*.



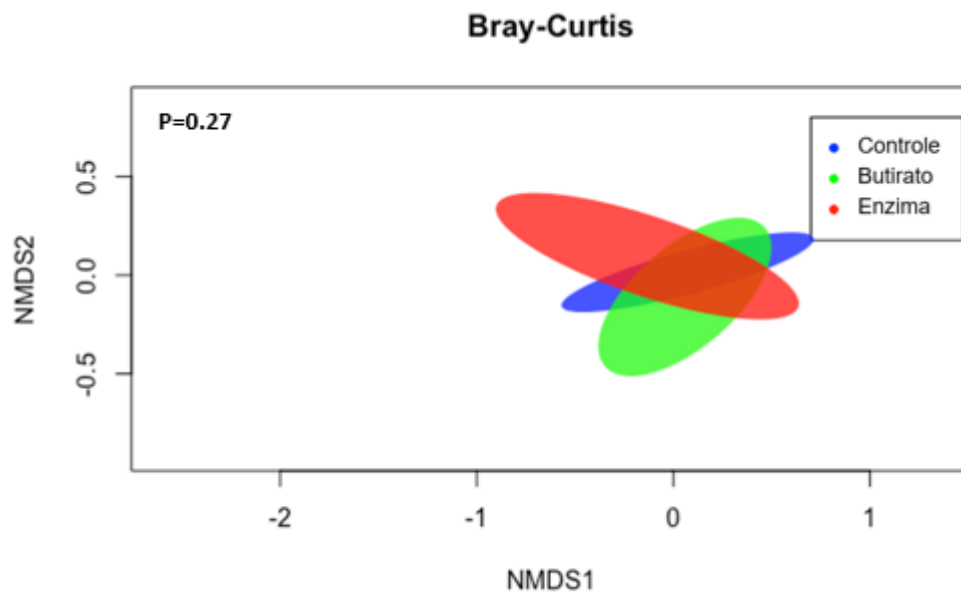
**Figura 4.** Indicador de riqueza microbiana Chao de animais Angus canulados no rúmen em confinamento com adição de enzimas fibrolíticas exógenas ou butirato de sódio.



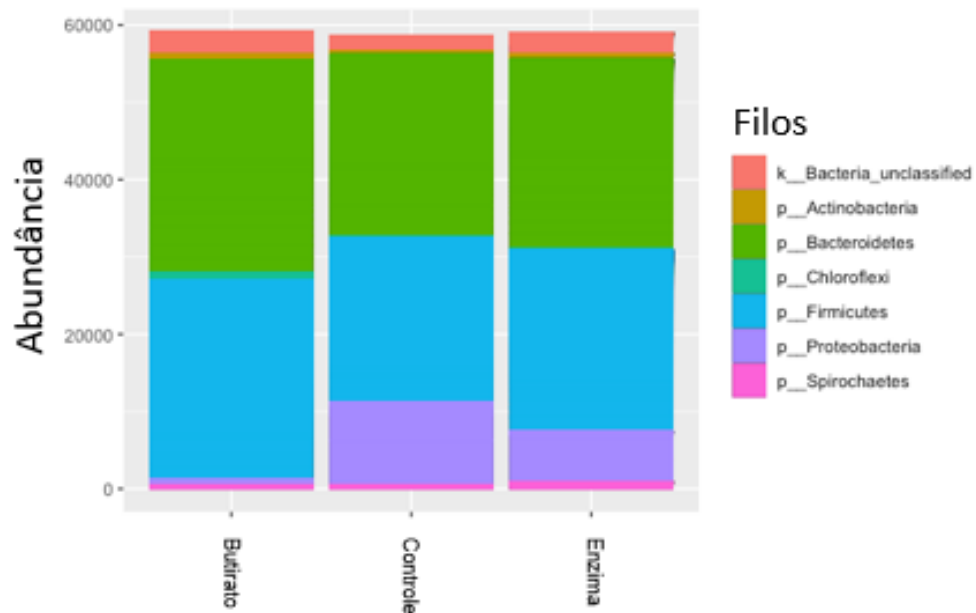
**Figura 5.** Indicador de riqueza microbiana Shannon de animais Angus canulados no rúmen em confinamento com adição de enzimas fibrolíticas exógenas ou butirato de sódio.



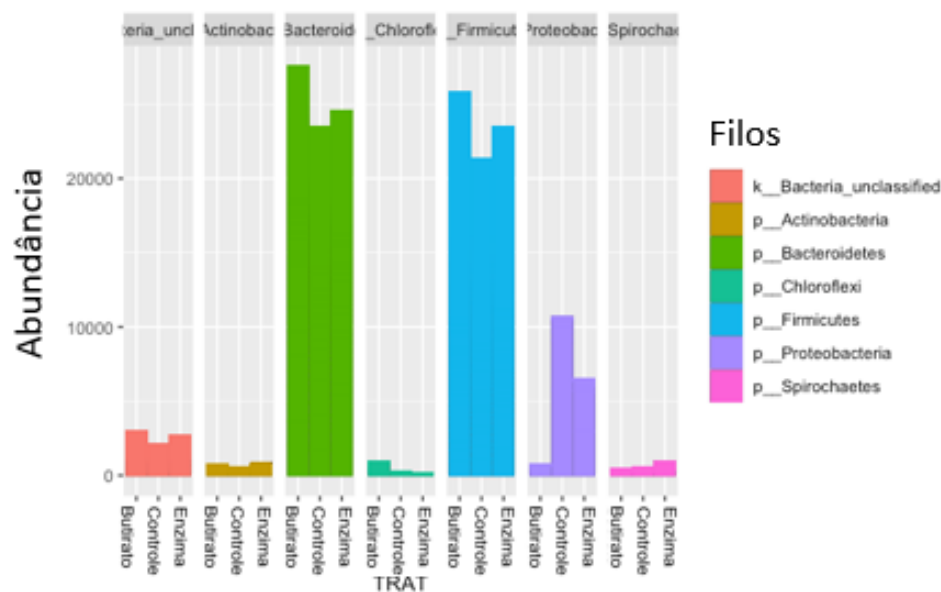
**Figura 6.** Teste de beta diversidade Jaccard em animais Angus canulados no rúmen em confinamento com adição de enzimas fibrolíticas exógenas ou butirato de sódio.



**Figura 7.** Teste de beta diversidade Bray-Curtis em animais Angus canulados no rúmen em confinamento com adição de enzimas fibrolíticas exógenas ou butirato de sódio.

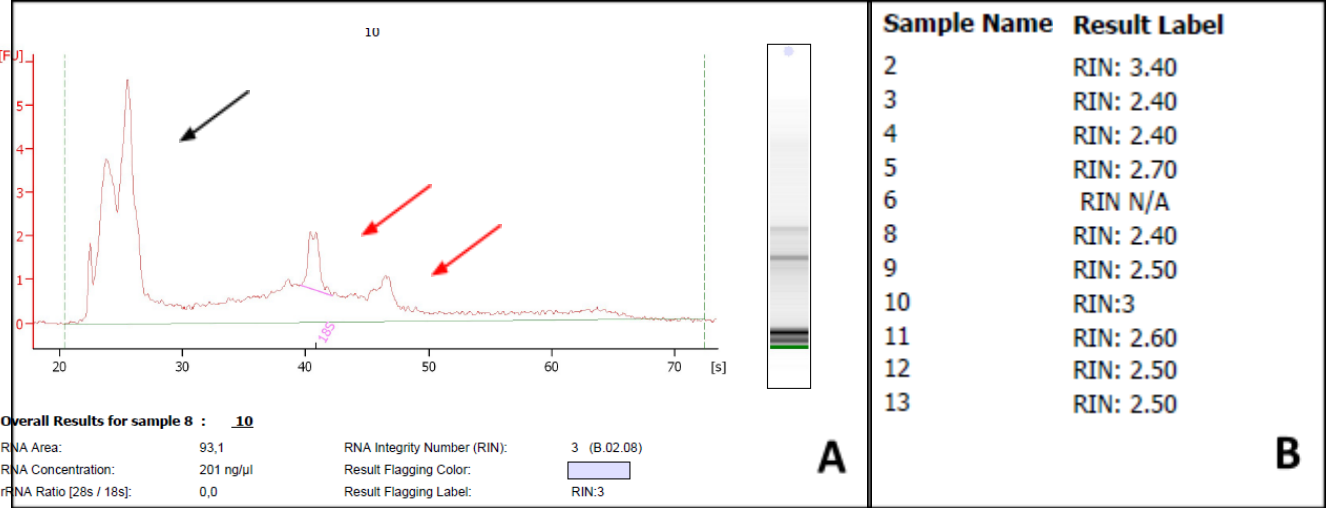


**Figura 8.** Abundância relativa da comunidade bacteriana de Angus canulados no rúmen em confinamento com adição de enzimas fibrolíticas exógenas ou butirato de sódio.



**Figura 9.** Abundância relativa da comunidade bacteriana de Angus canulados no rúmen em confinamento com adição de enzimas fibrolíticas exógenas ou butirato de sódio.

Durante o processo de quantificação do RNA pelo NanoDrop, foi detectado uma baixa razão 260nm/280nm, indicando contaminação com algum reagente utilizado durante o processo de extração. Afim de averiguar tal contaminação, bem como a integridade do RNA presente na amostra, as mesmas foram testadas utilizando o equipamento Agilent 2100 Bioanalyzer, onde foi constatado contaminação por fenol bem como degradação do material genético (Figura 2), indicado pelo índice “RNA Integrity Number” (RIN), o recomendado para o processo de transcrição é de RIN > 7-8 (PUCHTA, 2020), logo, o material não seguiu para as etapas posteriores.



**Figura 10.** Valores encontrados após análise de RNA pelo “Agilent 2100 Bioanalyzer”. A) Exemplo de resultado individual por amostra, demonstrando contaminação por fenol (seta preta) e baixos valores de integridade (setas vermelhas); B) Valores de RIN dentre as amostras analisadas.

#### 4. Discussão

O complexo enzimático utilizado era composto de xilanases e glucanase, na relação 1,45:1, respectivamente, favorecendo assim a degradação da celulose e hemicelulose presentes nos alimentos volumosos da dieta, porém atuando diretamente na gradação das xilanas encontradas nos grãos, essa relação é próxima a encontrada como relação ótima por Eun et al. (2007a), onde complexos enzimáticos variando entre 1.16:10 a 1:10 entre celulase:xilanase favoreceram a degradabilidade de alimentos volumosos em experimentos *in vitro*. Entretanto a proporção ideal seria entre 1:2 a 1:4, valores acima do aditivo utilizado no atual experimento.

O acréscimo diário de ácido butírico foi de 38g/d, 0,2% da MS, durante a fase de adaptação e 14g/d, 0,067% da MS, durante a fase de terminação. O acréscimo de butirato nessas concentrações não alterou o CMS, resultado também encontrado em estudos semelhantes. Kowalski (2015) utilizando uma adição de 0,44% e 0,04% da MS de butirato em vacas holandesas e novilhos, respectivamente. Utilizando doses mais elevadas, de 1,1% da MS de butirato, Izumi (2019) também relatou ausência de incremento no CMS. Assim, efeitos mais relevantes foram encontrados quando houve infusão de ácido butírico entre 1,5 a 6% da MS (SHEN et al., 2005; MALHI et al., 2013; WIESE et al., 2013).

Quando absorvido pelo epitélio, o ácido butírico é convertido quase em sua totalidade em  $\beta$ -hidroxibutirato, um corpo cetônico utilizado como fonte de energia por alguns tecidos, uma vez que é metabolizado em acetil-CoA, dado sua utilização energética acredita-se que o aumento em sua concentração no sangue cause um *feedback* negativo em relação a glicose sanguínea, como encontrado por Herrick (2017) e Zarrin (2013, 2014). Onde, glicose sanguínea, bem como outros hormônios relacionado como NEFA e insulina, não foram alterados em estudos cujas doses de butirato não foram significativas ao passo de elevar a concentração de butirato sanguíneo (Kowalski, 2015; Izumi, 2019), onde, quando utilizadas maiores doses de butirato ruminal, a concentração de insulina plasmática teve resposta linear a infusão (NEOGRÁDY, 1989). Assim, a dose utilizada de butirato de sódio no presente estudo não foi capaz de alterar os parâmetros ruminais e sanguíneos estudados.

Kowalski (2015) encontrou aumento na quantidade total de AGCC, entretanto as proporções mantiveram-se as mesmas em relação ao tratamento controle, assim como pH e  $\text{NH}_3$  ruminal. Em contraste aos experimentos citados e aos resultados obtidos no presente estudo, Herrick (2017), utilizando doses mais elevadas de butirato, 1g/kg de peso vivo e 2g/kg de peso vivo relatou uma diminuição no N ruminal, baseando-se na maior expressão de proteínas ligadas a absorção de nitrogênio pelas papilas ruminais, bem como uma maior área de absorção e reciclagem de nitrogênio pelo animal, relatando também aumento de pH, maior concentração de butirato no rúmen e redução na glicose sanguínea quando utilizado o tratamento de maior inclusão de ácido butírico.

A utilização de aditivos alimentares não modificou a alfa e beta diversidade nas amostras ruminais coletadas, entretanto, a utilização de butirato de sódio suprimiu o filo das *Proteobacterias*, resultados também encontrados por Ma (2023) e Zhou (2021), principais degradadoras de proteínas no ambiente ruminal, porém sem alterarem a concentração de N ruminal.

A concentração de N-NH<sub>3</sub> foi elevada no período após 4 horas da oferta de ração, uma vez que o processo de fermentação ruminal atingiu seu ponto máximo em relação a última refeição (MARINO, 2011), proporcionando uma maior degradação das fontes proteicas, disponibilizando para a microbiota altas cargas de NH<sub>3</sub> para utilização, corroborado pelas menores concentrações nos horários 8 e 12 horas após o trato, onde tais fontes de N livres já haviam sido consumidas. Seguindo o comportamento do nitrogênio amoniacal, a concentração de lactato também foi aumentada 4 horas após a alimentação, sendo reduzida na hora 8 e voltando a aumentar (sem diferença significativa) 12 horas após o fornecimento da ração diária, uma vez que o lactato é rapidamente utilizado quando produzido em faixas de pH acima de 5, uma vez que bactérias como *Selenomonas ruminantium* e *Megasphaera elsdenii* possuem alta atividade, consumindo o mesmo. Quando o pico de fermentação é alcançado cerca de 4 horas após o trato e o pH apresenta seu ponto mínimo, a ação de tais microrganismos é comprometida, gerando assim um acúmulo de lactato, que é lentamente absorvido ou metabolizado pela ambiente ruminal (NAGARAJA, 2007).

O tratamento ENZ favoreceu o a taxa de desaparecimento da MS ruminal na base de %/h, porém sem aumentar a produção de AGCC e desempenho animal, levantando a ideia de possivelmente o substrato degradado, possivelmente junto com metabolitos formados durante a fermentação podem ter escapado do rúmen via orifício reticulo-omasal antes de serem utilizados pelo animal, resultado semelhante encontrado por Pinos-Rodrigues e colaboradores (2008), onde a utilização de complexos enzimáticos a base xilanases e glucanases não afetou o desempenho animal e produção de AGCC, porém favoreceu o desaparecimento da MS e FDN, resultados esses que sugerem que a utilização de ENZ favoreceu o local de digestão do alimento ingerido, alterando de uma digestão ruminal para uma digestão intestinal.

Assim como no presente estudo, Peters et al. (2015) não encontraram diferenças no comportamento animal a respeito de ruminação, onde mesmo favorecendo o desaparecimento da MS ruminal, os estímulos para tal reflexo foram mantidos, favorecendo uma manutenção do ambiente ruminal em pH aceitável, haja visto a participação da saliva rica em elementos tamponantes.

Corroborando com os dados encontrados, ambos trabalhos citados acima não encontraram efeitos de tratamento sobre o CMS em animais alimentados com enzimas fibrolíticas exógenas, não modificando o perfil de AGCC e concentração de  $\beta$ -hidroxibutirato no sangue. Krause (2006) concluiu que o principal fator responsável pelas alterações no pH é o consumo de matéria seca, corroborando com os dados encontrados.

Animais expostos ao tratamento ENZ apresentaram menor seleção por partículas longas, principais fontes de estímulo ao reflexo de ruminação e grande contribuinte de FDN e FDA da dieta, assim, sugere-se uma maior estabilidade ruminal, mantendo os parâmetros relacionados a fermentação em níveis aceitáveis pelo metabolismo animal sem necessidade de buscar fatores externos para controle, tal resposta é embasada

pelos demais resultados encontrados no presente estudo, tais ausência de variação de pH e menor temperatura ruminal frente aos demais tratamentos.

A população de protozoários do gênero *Diplodinium* foi reduzida em animais suplementados com ENZ, uma vez utilizam frações fibrosas da dieta como principal substrato energético (Bohatier, 1991), assim, a ação enzimática exógena sobre os alimentos volumosos reduziu o aporte energético dos protozoários *Diplodinium* afetando negativamente sua população numericamente e percentualmente. Já protozoários do gênero *Isotricha* foram reduzidos em ambos os tratamentos em relação ao tratamento CON, estes são sensíveis a variações de pH, e mesmo inexistindo diferenças estatísticas a respeito dos pHs mínimos, médios e máximos, o tratamento CON apresentou os valores mais elevados, favorecendo assim tal população, apenas percentualmente.

O acréscimo de BUT ou ENZ não foi capaz de influenciar a largura ou comprimento das papilas ruminais, uma vez que não gerou mudanças no perfil de AGCC ruminal, trabalhos anteriores (KOWALSKI, 2015; LIU, 2019) demonstram que o acréscimo de butirato ruminal favoreceu o desenvolvimento das papilas, em comprimento e largura, podendo gerar um aumento de até 50% na área de superfície da papila (DIEHO, 2017), entretanto, é notável que a utilização dos aditivos alimentares aumentaram numericamente a largura das papilas ruminais, sugerindo sucintas mudanças na morfologia ruminal, enquanto BUT elevou também o número de células em processo de mitose, corroborando com Sakata (1978) e Gorka (2011).

No presente estudo, a utilização de ENZ e BUT não causaram mudanças significativas na digestibilidade dos nutrientes, bem como na dieta total, resultados semelhantes encontrados por Rice (2019), onde não obteve melhoras na digestibilidade dos nutrientes quando adicionado butirato de sódio na dose de 0,25g/kgPV de novilhas. Já Huhtanen et al. (1993) utilizando uma dose de 400g/d de butirato encontrou incrementos na digestibilidade da MS, FDN e proteína. Agindo negativamente sobre a população de bactérias proteolíticas encontradas no ambiente ruminal, o aumento no aproveitamento da proteína sugere efeitos do butirato ao longo do trato gastrointestinal, não limitando-se apenas a ação ruminal.

A adição de ENZ ou BUT não foi capaz de gerar diferenças na degradabilidade ruminal e digestibilidade dos nutrientes, entretanto a utilização de BUT evidencia um aumento numérico na degradabilidade potencial do amido e PB em relação aos outros tratamentos, uma vez que o principal agente responsável pela degradação da dieta é a microbiota ruminal, essa pequena diferença se dá através da sucinta modificação gerada na microfauna ruminal pelo efeito de BUT. A digestibilidade do FDN foi a que mais se diferenciou das demais, obtendo resultados numericamente superior do tratamento CON em relação aos tratamentos ENZ e BUT, resultado também encontrado por Stahl (2020), onde utilizando dose de 0,75g/kgPV notou tendência de acréscimo na digestibilidade do tratamento controle em relação a BUT. Uma vez que a maior parte do volumoso utilizado na dieta era composto por bagaço de cana, coproduto da indústria sucroalcooleira altamente lignificado, a ação do blend enzimático composto por glucanases e xilanases teve seu espectro de ação reduzido. Aranda (2010) em experimento *in vitro* utilizando ENZ elevou a digestibilidade do bagaço de cana bem como a quantidade de proteína microbiana, comprovando uma liberação de açúcares mais simples ao meio ruminal, entretanto Gómez (2011) indicou que para promover

uma elevação de 65% na digestibilidade do bagaço de cana seria necessária uma dosagem entre 15 e 30 g/dia, valores muito maiores que o utilizado no presente estudo.

## 5. Conclusão

É possível concluir que os aditivos testados não foram capazes de causar grandes impactos na fisiologia do rúmen ou metabolismo animal, onde ENZ gerou breves alterações metabólicas, enquanto BUT não se diferenciou de CON. Entretanto ambos apresentam alguns resultados capazes de evidenciar que a continuidade nos estudos envolvendo BUT e ENZ são promissores e ajudarão elucidar o modo de funcionamento e utilizações mais eficientes de tais aditivos alimentares.

## Referências

- Alvarez, G. et al. Effects of exogenous fibrolytic enzymes on ruminal digestibility in steers fed high fiber rations. *Livestock Science*, v. 121, n. 2-3, p. 150-154, 2009.
- Aranda I. E. M., Mendoza G. D. M., Ramos J. A. J., da Silva C., Vitti A. C. Efeito de enzimas fibrolíticas sobre a degradação microbiana ruminal da fibra de cana-de-açúcar. *Ciencia Animal Brasileira*. 2010;11(3):488–495.
- Association Of Official Analytical Chemists - AOAC. Official Methods Of Analysis. 16.Ed. Aoac, Washington, Dc. 1995.
- Bevans, D. W., Beauchemin, K. A; Schwartzkopf-Genswein, K. S. Effect Of Rapid Or Gradual Grain Adaptation On Subacute Acidosis And Feed Intake By Feedlot Cattle. *Journal Of Animal Science*. 83:1116-1132. 2005.
- Bohatier, J. The rumen protozoa: taxonomy, cytology and feeding behaviour. *Rumen microbial metabolism and ruminant digestion*. Paris: Inra, p. 27-38, 1991.
- Carrillo-Díaz MI, Miranda-Romero LA, Chávez-Aguilar G, et al. Improvement of Ruminal Neutral Detergent Fiber Degradability by Obtaining and Using Exogenous Fibrolytic Enzymes from White-Rot Fungi. *Animals (Basel)*. 2022;12(7):843. Published 2022 Mar 27
- Carvalho, S.; Rodrigo, M. T.; Branco, R. H. Comportamento Ingestivo De Cabras Alpinas Em Lactação Alimentadas Com Dietas Contendo Diferentes Níveis De Fibra Em Detergente Neutro Proveniente da Forragem. *Revista Brasileira Zootecnia*, Viçosa, Mg, V.35, P. 562-568, 2006.
- Cooke, R. F.; Arthington, J. D. Concentrations Of Haptoglobin In Bovine Plasma Determined By Elisa Or A Colorimetric Method Based On Peroxidase Activity. *Journal Of Animal Physiology And Animal Nutrition*, 97(3): 531-536. 2013.
- Dado, R. G.; Allen, M. S. Intake Limitations, Feeding Behavior, And Rumen Function Of Cows Challenged With Rumen Fill From Dietary Fiber On Inert Bulk. *Journal Of Dairy Science*, V. 78, P. 118-133, 1995.

- Dehority, B. A. Classification And Morphology Of Rumen Protozoa. Wooster: Ohio Agriculture Research And Development Center, 1977.
- Dieho K, Dijkstra J, Klop G, Schonewille JT, Bannink A. The effect of supplemental concentrate fed during the dry period on morphological and functional aspects of rumen adaptation in dairy cattle during the dry period and early lactation. *J Dairy Sci.* 2017;100(1):343-356. doi:10.3168/jds.2016-11575
- Dill-Mcfarland, K. A.; Breaker, J. D.; Suen, G. Microbial Succession In The Gastrointestinal Tract Of Dairy Cows From 2 Weeks To First Lactation. *Sci. Rep.* 7:40864, 2017.
- Emmanuel, D. G. V.; Dunn, S. M.; Ametaj, B. N. Feeding High Proportions Of Barley Grain Stimulates An Inflammatory Response In Dairy Cows. *Journal Of Dairy Science* 91(2): 606- 614. 2008.
- Erwin, E.S.; Marco, G.J.; Emery, E.M. Volatile Fatty Acid Analyses Of Blood And Rumen Fluid By Gas Chromatography. *Journal Of Dairy Science*, V.44, N.9, P.1768-1771. 1961.
- Eun J. S., ZoBell D. R., Dschaak C. M., Diaz D. E., Tricarico J. M. Case study: effects of supplementing a fibrolytic feed enzyme on the growth performance and carcass characteristics of beef steers. *The Professional Animal Scientist.* 2009;25(3):382–387
- Foldager, J. Protein Requirement And Non-Protein Nitrogen For High Producing Cow In Early Lactation. Tese (Doutorado Em Ciência Animal) – Michigan State University, East Lansing, Mi. 1977.
- Gómez V. A., Mendoza G. D., Aranda E., Pérez J., Hernández A., Pinos-Rodríguez J. M. Influence of fibrolytic enzymes on growth performance and digestion in steers grazing stargrass and supplemented with fermented sugarcane. *Journal of Applied Animal Research.* 2011;39(1):77–79
- Guzelbektes, H., Sen, I., Ok, M., Constable, P. D. Serum Amyloid A And Haptoglobin Concentrations And Liver Fat Percentage In Lactating Dairy Cows With Abomasal Displacement. *Journal Of Veterinary Internal Medicine* 24: 213–219. 2010.
- Heinrichs, J., Kononoff, P. In Evaluating Particle Size Of Forages And Tmr's Using The Penn State Particle Size Separator. *D. Anim. Sci.* 1-14. 1996.
- Herrick KJ, Hippen AR, Kalscheur KF, et al. Single-dose infusion of sodium butyrate, but not lactose, increases plasma  $\beta$ -hydroxybutyrate and insulin in lactating dairy cows. *J Dairy Sci.* 2017;100(1):757-768.
- Huhtanen P., Miettinen H., Ylinen M. Effect of increasing ruminal butyrate on milk yield and blood constituents in dairy cows fed a grass silage-based diet. *J. Dairy Sci.* 1993; 76: 1114-1124
- Izumi K, Fukumori R, Oikawa S, Oba M. Short communication: Effects of butyrate supplementation on the productivity of lactating dairy cows fed diets differing in starch content. *J Dairy Sci.* 2019;102(12):11051-11056.
- K.M. Krause, G.R. Oetzel Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 126 (2006), pp. 215-236
- Kowalski ZM, Górka P, Flaga J, et al. Effect of microencapsulated sodium butyrate in the close-up diet on performance of dairy cows in the early lactation period. *J Dairy Sci.* 2015;98(5):3284-3291.

- Krueger N. A., Adesogan A. T., Staples C. R., Krueger W. K., Kim S. C., Littell R. C., Sollenberger L. E. Effect of method of applying fibrolytic enzymes or ammonia to Bermudagrass hay on feed intake, digestion, and growth of beef steers. *Journal of Animal Science*. 2008;86(4):882–889. doi: 10.2527/jas.2006-717
- Kulasek, G. A. A Micromethod For Determination Of Urea In Plasma, Whole Blood Cells Using Urease And Phenol Reagent. *Pol. Arch. Weter*. 15:801-810. 1972.
- Kwon, I. H.; Kim, M. H.; Yun, C. H. Effects Of Fermented Soybean Meal On Immune Response Of Weaned Calves With Experimentally Induced Lipopolysaccharide Challenge. *Asian-Australasian J. Animal Sci*. 24: 957–964. 2011.
- Liu L, Sun D, Mao S, Zhu W, Liu J. Infusion of sodium butyrate promotes rumen papillae growth and enhances expression of genes related to rumen epithelial VFA uptake and metabolism in neonatal twin lambs. *J Anim Sci*. 2019;97(2):909-921. doi:10.1093/jas/sky459
- Ma L, Yang Y, Liu W, Bu D. Sodium butyrate supplementation impacts the gastrointestinal bacteria of dairy calves before weaning. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2023;107(10):3291-3304.
- Marino CT, Otero WG, Rodrigues PH, et al. Effects of adding polyclonal antibody preparations on ruminal fermentation patterns and digestibility of cows fed different energy sources. *J Anim Sci*. 2011;89(10):3228-3235. doi:10.2527/jas.2010-3062
- Mehres, A. Z.; Ørsvok, E. R. A Study Of The Artificial Fiber Bag Technique For Determining The Digestibility Of Feeds In The Rumen. *Journal Of Agricultural Science*. 88:645- 650. 1977.
- Nagaraja TG, Titgemeyer EC. Ruminal acidosis in beef cattle: the current microbiological and nutritional outlook. *J Dairy Sci*. 2007;90 Suppl 1:E17-E38. doi:10.3168/jds.2006-478
- Neogrády Z, Gálfi P, Kutas F. Effect of intraruminal butyrate infusion on the plasma insulin level in sheep. *Acta Vet Hung*. 1989;37(3):247-253.
- Odongo, N. E.; Alzahal, O.; Lindinger, M. I. Effects of mild heat Stress And Grain Challenge On Acid-Base Balance And Rumen Tissue Histology In Lambs. *Journal Of Animal Science*. 84:447-455. 2006.
- Ørskov, E. R.; McDonald, I. The Estimation Of Protein Degradability In The Rumen From Incubation Measurements Weighted According To Rate Of Passage. *The Journal Of Agricultural Science*, V. 92, N. 2, P. 499-503, 1979.
- Orskov, E.; Hovell, F.; Mould, F. Uso De La Técnica De La Bolsa De Nylon Para La Evaluación De Los Alimentos [Digestión, Rumen]. *Producción Animal Tropical*, V. 5, N. 3, P. 213- 233, 1980.
- Penner, G. B.; Beauchemin, K. A.; Mutsvangwa, T.. A Evaluation Of The Accuracy And Precision Of A Stand-Alone Submersible Continuous Ruminal Ph Measurement System. *Journal Dairy Science*.: 89:2133-2140. 2006.
- Peters A, Meyer U, Dänicke S. Effect of exogenous fibrolytic enzymes on performance and blood profile in early and mid-lactation Holstein cows. *Anim Nutr*. 2015;1(3):229-238.
- Pezzato, L.E. Et Al. Avaliação De Dois Métodos De Determinação Do Coeficiente De Digestibilidade Aparente Com A Tilápia Do Nilo (*Oreochromis Niloticus*). *Acta Scientiarum*, Maringá, V. 24, N. 4, P.965-971. 2002.

Pinos-Rodriguez, J. M. et al. Effects of exogenous fibrolytic enzymes on ruminal fermentation and digestibility of total mixed rations fed to lambs. *Animal feed science and technology*, v. 142, n. 3-4, p. 210-219, 2008.

Poore, M. H.; Moore, J. A.; Eck, T. P. Effect Of Fiber Source And Ruminal Starch Degradability On Site And Extent Of Digestion In Dairy Cows. *Journal Of Dairy Science*, Tucson, V.76, P.2244-2253, 1993.

Pryce, J. D. Modification Of The Barker-Summerson Method For The Determination Of Lactic Acid. *Analyst*. V.94, P.1151-1152. 1969.

Puchta M, Boczkowska M, Groszyk J. Low RIN Value for RNA-Seq Library Construction from Long-Term Stored Seeds: A Case Study of Barley Seeds. *Genes (Basel)*. 2020 Oct 13;11(10):1190. doi: 10.3390/genes11101190. PMID: 33066221; PMCID: PMC7650657.

Rice EM, Aragona KM, Moreland SC, Erickson PS. Supplementation of sodium butyrate to postweaned heifer diets: Effects on growth performance, nutrient digestibility, and health. *J Dairy Sci*. 2019;102(4):3121-3130. doi:10.3168/jds.2018-15525

Robles, V.; González, L. A.; Ferret, A. Effects Of Feeding Frequency On Intake, Ruminal Fermentation, And Feeding Behavior In Heifers Fed High-Concentrate Diets. *Journal Of Animal Science* 85:2538-2547. 2007

Sakata T, Tamate H. Rumen epithelial cell proliferation accelerated by rapid increase in intraruminal butyrate. *J Dairy Sci*. 1978;61(8):1109-1113. doi:10.3168/jds.S0022-0302(78)83694-7 Kowalski ZM, Górka P, Flaga J, et al. Effect of microencapsulated sodium butyrate in the close-up diet on performance of dairy cows in the early lactation period. *J Dairy Sci*. 2015;98(5):3284-3291. doi:10.3168/jds.2014-8688

Salem, A. Z. M. et al. Effects of exogenous enzymes on nutrient digestibility, ruminal fermentation and growth performance in beef steers. **Livestock Science**, v. 154, n. 1-3, p. 69-73, 2013.

Stahl TC, Hatungimana E, Klanderman KD, Moreland SC, Erickson PS. Sodium butyrate and monensin supplementation to postweaning heifer diets: Effects on growth performance, nutrient digestibility, and health. *J Dairy Sci*. 2020;103(11):10207-10218. doi:10.3168/jds.2020-18584

Van Soest, P. J.; Robertson, J. B.; Lewis, B. A. Symposium: Carbohydrate Methodology, Metabolism, And Nutritional Implications In Dairy Cattle. *Journal Of Dairy Science*, Champaign, V.74, N.10, P.3583-3597, 1991.

Vargas, J. M. et al. Effect of exogenous fibrolytic enzymes on the carcass characteristics and performance of grain-finished steers. **Animal Nutrition and Feed Technology**, v. 13, n. 3, p. 435-439, 2013.

Ware R. A., Calderon J. F., Corona L., Zinn R. A. Case study: comparative feeding value of rice straw in growing-finishing diets for calf-fed Holstein steers: fibrolytic enzyme supplementation. *The Professional Animal Scientist*. 2005;21(5):416-419

Weimer, P. J.; Cox, M. S.; Paula T. V.; Lin, M.; Hall, M. B. Suen, G. Transient Changes In Milk Production Efficiency And Bacterial Community Composition Resulting From NearTotal Exchange Of Ruminal Contents Between High- And Low-Efficiency Holstein Cows. *Journal Of Dairy Science*. 100:7165-7182. 2017.

Zarrin M, De Matteis L, Vernay MC, Wellnitz O, van Dorland HA, Bruckmaier RM. Long-term elevation of  $\beta$ -hydroxybutyrate in dairy cows through infusion: effects on feed intake, milk production, and metabolism. *J Dairy Sci.* 2013;96(5):2960-2972

Zarrin M, Wellnitz O, van Dorland HA, Gross JJ, Bruckmaier RM. Hyperketonemia during lipopolysaccharide-induced mastitis affects systemic and local intramammary metabolism in dairy cows. *J Dairy Sci.* 2014;97(6):3531-3541

Zhou F, Liu B, Liu X, Li Y, Wang L, Huang J, Luo G, Wang X. The Impact of Microbiome and Microbiota-Derived Sodium Butyrate on *Drosophila* Transcriptome and Metabolome Revealed by Multi-Omics Analysis. *Metabolites.* 2021 May 6;11(5):298.

## **6. Implicações**

O presente estudo trará diversas contribuições no estudo do metabolismo de bovinos de corte confinados, dado as diversas análises realizadas, envolvendo parâmetros ruminais, absorção, sanguíneos, microbiota e comportamento. Assim os resultados apresentados servem de base para pesquisas futuras buscando melhores índices zootécnicos e compreensão do metabolismo animal. Ao término do estudo completo conclusões em diversos espectros relacionados a nutrição de animais ruminantes poderão ser realizadas, auxiliando em posteriores tomadas de decisões.