

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
Programa de Pós-graduação em Zootecnia



Dissertação

**Suplementação com enzimas fibrolíticas em vacas lactantes e sua ação
no comportamento alimentar**

Joana Piagetti Noschang

Pelotas, 2020

JOANA PIAGETTI NOSCHANG

**Suplementação com enzimas fibrolíticas em vacas lactantes e sua ação
no comportamento alimentar**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Zootecnia, da Universidade Federal de Pelotas como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências (Área do conhecimento: Produção Animal).

Orientador: Dr. Cassio Cassal Brauner
Co-Orientador: Dr. Antônio Amaral Barbosa
Co-Orientador: Dr. Marcio Nunes Corrêa

Pelotas, 2020

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

N897s Noschang, Joana Piagetti

Suplementação com enzimas fibrolíticas em vacas lactantes e sua ação no comportamento alimentar / Joana Piagetti Noschang ; Cássio Cassal Brauner, orientador ; Marcio Nunes Corrêa, Antônio Amaral Brabosa, coorientadores. — Pelotas, 2020.

47 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2020.

1. Aditivos. 2. Bovinocultura de leite. 3. Digestibilidade. 4. Nutrição de precisão. 5. Ruminação. I. Brauner, Cássio Cassal, orient. II. Corrêa, Marcio Nunes, coorient. III. Brabosa, Antônio Amaral, coorient. IV. Título.

CDD : 636.234

Joana Piagetti Noschang

Suplementação com enzimas fibrolíticas em vacas lactantes e sua ação no
comportamento alimentar

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 14/02/2020

Banca examinadora:

Prof. Dr. Cássio Cassal Brauner (Orientador)
Doutor em Zootecnia pela Universidade Federal de Pelotas.

Prof. Dr. Francisco Augusto Burker Delpino
Doutor em Ciências biológicas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Raquel Fraga e Silva Raimondo
Doutora em Ciências pela FMVZ-USP

Prof. Dr. Josiane Feijó
Doutora em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Agradecimentos

Agradeço primeiramente aos meus pais, Rosa e Reinaldo pelo incentivo, motivação e todo amor destinado a mim. A eles agradeço por tudo o que sou e por estar onde estou.

Aos meus amigos de Pelotas que fizeram dos meus dias mais leves.

Aos colegas do NUPEEC pela amizade e convivência durante este período, especialmente à Fabi, minha parceira neste projeto e cuja ajuda foi fundamental para a realização deste trabalho.

A todos os professores do NUPEEC, pelo apoio, pelas oportunidades e pelos ensinamentos durante os 6 anos de permanência no grupo.

Em especial ao meu orientador Cássio Cassal Brauner e ao meu co-orientador Antônio Barbosa, pelo suporte e pela paciência nesta orientação.

Ao Eduardo Xavier, gerente da Granja 4 Irmãos, pela oportunidade de desenvolver este trabalho na Granja e a todos os funcionários que auxiliaram durante o período experimental.

A Capes pela bolsa concedida.

A todos que contribuíram na minha jornada acadêmica, e aos que me ajudaram na execução deste trabalho, minha gratidão!

*“Quando a inteligência e a bondade são usadas em conjunto,
todos os atos humanos passam a ser construtivos”*

Dalai Lama

Resumo

NOSCHANG, Joana Piagetti. **Suplementação com enzimas fibrolíticas em vacas lactantes e sua ação no comportamento alimentar.** 2020. 50f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Zootecnia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2020.

Palavras-chave: aditivos, bovinocultura de leite, digestibilidade, nutrição de precisão, ruminação

O uso de enzimas fibrolíticas é incluído nas dietas de vacas leiteiras como uma estratégia para melhorar a hidrólise da parede celular das forragens em substratos fermentáveis. O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da inclusão de um produto comercial, MaxFiber®, na ração mista total (TMR) de vacas Holandês sobre a digestibilidade e ingestão de matéria seca, comportamento alimentar e comportamento animal, desempenho do leite, peso e condição corporal. Para isso, foi conduzido um experimento durante 24 dias, utilizando 2 grupos de 18 vacas em lactação ($n = 36$), bloqueadas para número semelhante de lactações e produção média de leite, manejadas em sistema intensivo *compost barn* recebendo a mesma dieta duas vezes ao dia, com ad libitum água. O grupo identificado como Grupo Suplementado (GS) recebeu 10 g / animal / dia de enzimas fibrolíticas (MaxFiber®, Provitta Supplements, Pinneberg, Alemanha) incluídos na TMR, antes da alimentação. O grupo Controle (GC) foi alimentado com a TMR sem qualquer tratamento. Os parâmetros relacionados ao comportamento alimentar e ao comportamento animal foram determinados diariamente por meio de sistema de monitoramento eletrônico de alimentação (Intergado®, Betin, MG, Brasil) e colares de monitoramento CowMed (ChipInside® Technology, Santa Maria, RS, Brasil), respectivamente. A produção de leite diária e individual foi verificada através do sistema eletrônico de ordenha e a análise da digestibilidade foi realizada por um laboratório especializado. Os resultados mostraram que a inclusão do MaxFiber® na estratégia utilizada no presente estudo aumentou o tempo de atividade ($p < 0.05$) e apresentou tendência à diminuição no tempo de ruminação ($p < 1.0$) do GS. Assim como houve aumento no número de acessos aos alimentadores inteligentes ($p < 0.05$) e da produção de leite ($p = 0.05$).

Abstract

NOSCHANG, Joana Piagetti. **Supplementation with fibrolytic enzymes in lactating cows and their action on feeding behavior.** 2020. 50p. Dissertation (Master degree in Animal Sciences) - Postgraduate Program in Animal Science, Faculty of Agronomy Eliseu Maciel, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2020.

Key-words: additives, dairy cattle, digestibility, precision nutrition, rumination

The use of fibrolytic enzymes is included in the diets of dairy cows as a strategy to improve the hydrolysis of the cell wall of forages in fermentable substrates. The present study aimed to evaluate the effects of including a commercial product, MaxFiber®, in the total mixed feed (TMR) of Holstein cows on digestibility and dry matter intake, feeding and animal behavior, milk performance, weight and body condition. For this, an experiment was conducted for 24 days, using 2 groups of 18 lactating cows ($n = 36$), blocked for a similar number of lactations and average milk production, managed in an intensive compost barn system receiving the same diet twice a year. day, with water ad libitum. The group identified as Supplemented Group (GS) received 10 g / animal / day of fibrolytic enzymes (MaxFiber®, Provitta Supplements, Pinneberg, Germany) included in the TMR, before feeding. The Control group (CG) was fed with RMT without any treatment. The parameters related to feeding behavior and animal behavior were determined daily using an electronic feed monitoring system (Intergado®, Betim, MG, Brazil) and CowMed monitoring collars (ChipInside® Technology, Santa Maria, RS, Brazil), respectively. Daily and individual milk production was verified using the electronic milking system and the digestibility analysis was performed by a specialized laboratory. The results showed that the inclusion of MaxFiber® in the strategy used in the present study increased the activity time ($p < 0.05$) and showed a tendency to decrease the GS rumination time ($p < 1.0$). As well as an increase in the number of accesses to smart feeders ($p < 0.05$) and milk production ($p = 0.05$).

Lista de Figuras

- Figura 1: Efeito da suplementação com 10g/vaca/dia de enzimas fibrolítica exógena sobre o tempo de ruminação de animais do grupo suplementado (GS) (MaxFiber®, Provitta Supplements, Pinneberg/Germany) e Controle (GC) (n=36) avaliados diariamente através de coleiras de monitoramento (ChipInside®). 28
- Figura 2: Efeito da suplementação com 10g/vaca/dia de enzimas fibrolítica exógena sobre o consumo de animais do grupo suplementado (GS) (MaxFiber®, Provitta Supplements, Pinneberg/Germany) e Controle (GC) (n=36) avaliados diariamente através de coleiras de monitoramento (ChipInside®). 28
- Figura 3: Efeito da suplementação com 10g/vaca/dia de enzimas fibrolítica exógena sobre o número de visitas aos cochos de animais do grupo suplementado (GS) (MaxFiber®, Provitta Supplements, Pinneberg/Germany) e Controle (GC) (n=36) avaliados diariamente através de Alimentadores inteligentes (Intergado®). 29
- Figura 4: Efeito da suplementação com 10g/vaca/dia de enzimas fibrolítica exógena sobre o consumo de animais do grupo suplementado (GS) (MaxFiber®, Provitta Supplements, Pinneberg/Germany) e Controle (GC) (n=36) avaliados diariamente através de alimentadores inteligentes (Intergado®). 30
- Figura 5: Produção de leite de vacas (n=36) do grupo controle (GC) e do grupo suplementando (GS) com 10g/vaca/dia de enzimas fibrolítica exógena (MaxFiber®, Provitta Supplements, Pinneberg/Germany). 30

Lista de Tabelas

Tabela 1: Composição bromatológica da ração misturada total (TMR) dos animais (n=36) do grupo controle (GC) e grupo suplementado (GS) com 10g/vaca/dia de enzimas fibrolíticas exógenas (MaxFiber®, Provitta Supplements, Pinneberg/Germany). 25

Tabela 2: Médias de tempo (min) ± erro padrão (EP) para parâmetros do comportamento animal (atividade, ruminação e ócio) de animais do grupo suplementado (GS) com 10g/vaca/dia de enzimas fibrolíticas exógenas (MaxFiber®, Provitta Supplements, Pinneberg/Germany) e controle (GC) (n=36) avaliados diariamente através de coleiras de monitoramento (ChipInside®). 27

Tabela 3: Médias ± erro padrão (EP) do comportamento alimentar de animais do grupo suplementado (GS) com 10g/vaca/dia de enzimas fibrolíticas exógenas (MaxFiber®, Provitta Supplements, Pinneberg/Germany) e Controle (GC) (n=36) avaliados diariamente através de comedouros inteligentes (Intergado®). 29

Sumário

| | |
|--|-----------|
| 1 Introdução..... | 12 |
| 3 Objetivos | 19 |
| 3.1 Objetivo geral | 19 |
| 3.2 Objetivos específicos..... | 19 |
| 4 Hipótese | 19 |
| 5 Artigo..... | 20 |
| 6 Conclusão geral | 44 |
| Referências bibliográficas..... | 45 |

1 Introdução

As forragens são a base da alimentação dos ruminantes, uma vez que estes animais tem a capacidade de aproveitar os componentes da parede celular vegetal como fonte de energia. Sendo assim a eficiência produtiva em bovinos de leite se deve, principalmente, ao consumo e digestibilidade do alimento através da utilização dos carboidratos fibrosos presentes na parede celular das forragens (composta por celulose, hemicelulose e lignina) (SUJANI E SERESINHE, 2015).

A digestão destes compostos só é possível graças à interação com a população microbiana contida no rúmen, visto que mamíferos, de modo geral, não possuem enzimas digestivas para degradação destes substratos. O hospedeiro promove o ambiente ideal (ambiente anaeróbico, temperatura de 38 a 42 graus e pH entre 6 e 7) para a sobrevivência e desenvolvimento dos microrganismos que, por sua vez, degradam e sintetizam os compostos utilizados como fonte de energia para o ruminante, configurando uma relação simbiótica e mutualística (KOZLOSKI, 2016).

As bactérias ruminais são os microrganismos mais ativos no processo digestivo dos ruminantes e cada espécie se diferencia pela capacidade de degradação de determinado composto da dieta. Existem as bactérias hemicelulolíticas que degradam a hemicelulose, as celulolíticas que degradam celulose, as amilolíticas que hidrolisam o amido e proteolíticas que degradam proteínas. Todas essas espécies em conjunto degradam os compostos presentes na alimentação animal transformando partículas da digestão em moléculas menores, sintetizando as unidades fundamentais para absorção e fonte de energia do animal (SUJANI E SERESINHE, 2015).

As enzimas bacterianas degradam as células vegetais e fornecem carboidratos não fibrosos, que constituem o conteúdo celular, e os carboidratos fibrosos, localizados na parede celular das plantas. Três são os compostos que constituem a parede celular vegetal: celulose, hemicelulose e lignina. Esse conjunto de compostos bioquímicos confere resistência, rigidez, permeabilidade seletiva, flexibilidade e aderência.

A celulose é um homopolímero de glicose, ou seja, uma longa cadeia formada por moléculas de glicose unidas por ligações glicosídicas B-1,4. Constitui de 35 a 50% da parede celular e é hidrolizada por diversas celulases. Inicialmente, as endoglucanases agem na região interna da fibra de celulose e liberam cadeias menores de celulose, os oligossacarídeos.

As exoglucanases agem na extremidade das fibras e liberam celobiose, dissacarídeo formado por duas moléculas de glicose, que por sua vez serão hidrolizados por B-glicosídeos que quebram a ligação química existente entre essas duas moléculas de glicose liberando unidade livre (PALOHEIMO et al., 2010).

A hemicelulose é um heterossacarídeo formado por vários resíduos de açúcares, sendo principalmente xilose, arabinose e glicose. O xilano é o principal componente da hemicelulose que é, após a celulose, o polissacarídeo mais abundante na natureza, constituindo 20 a 35% da parede celular. Na degradação da hemicelulose são envolvidas enzimas endoxilases, arabinosídeos e xilobiases (SCHELLER & ULVSKOV, 2010).

A lignina é um polímero ramificado formado por quatro álcoois (coniferil, hidroxiconiferil, coumaryl e sinapil). Ela é depositada nas paredes celulares de acordo com a maturidade da planta detendo alto peso molecular e rigidez, fator esse limitante à digestibilidade, pois é resistente ao ataque das bactérias que não possuem enzimas específicas para sua degradação (TAIZ & ZEIGER, 2006).

A hidrólise destes compostos que constituem a parede vegetal ocorre assim que o animal ingere o alimento e este adentra ao rúmen. As bactérias livres no fluido ruminal colonizam as partículas do alimento recém-ingeridas, aderindo-se ao substrato e degradando-o progressivamente pela ação de enzimas extracelulares presentes na membrana das células bacterianas. Na superfície da membrana da célula bacteriana existe uma estrutura glicoproteica denominada de celulosoma. O mesmo é constituído por subunidades catalíticas (enzimas) e unidades não catalíticas, que são responsáveis pela ligação do complexo enzimático com a parede celular da bactéria e pela aderência específica ao substrato permitindo a aproximação das enzimas bacterianas às partículas do alimento (KOZLOSKI, 2016).

Inicia-se a degradação extracelular através de enzimas bacterianas que irão hidrolisar celulose e hemicelulose até monossacarídeos. Estes são capturados para dentro da célula bacteriana e são metabolizados intracelularmente através de rotas comuns (Glicólise e Ciclo de Krebs) originando os produtos finais e essenciais para os ruminantes (KOZLOSKI, 2016).

Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) são sintetizados pelas bactérias e a quantidade destas no ambiente ruminal é influenciada pela composição da dieta sendo isso determinante para o tipo de AGCC produzido. Uma dieta a base de grãos ou com maior porcentagem de concentrado, as bactérias amilolíticas irão se proliferar e como produto final de sua fermentação produzirão principalmente ácido propiônico. Já em uma alimentação a pasto ou a base de volumosos, são as bactérias fibrolíticas que terão maior atividade no rúmen, sintetizando os ácidos butírico e, principalmente, acético (NAGARAJA, 2007).

Todos estes produtos irão promover energia, mas o propionato configura-se como a principal fonte, pois é precursor da glicose no fígado e atuará na produção e rendimento do leite. O butirato, e principalmente acetato são precursores da lipogênese, incrementando a porcentagem de gordura no leite.

Em resumo, a digestão e a síntese de energia ocorre quando alimento ingerido é atacado pelas bactérias ruminais, que, após a degradação dos polissacarídeos da dieta, sintetizam AGCC, os quais são absorvidos pela parede ruminal, enviados ao fígado e pela corrente sanguínea dirigidos aos tecidos alvo (glândula mamária).

Contudo, as interações físico-químicas entre a matriz de celulose, hemicelulose e lignina e os aspectos relacionados ao animal, como mastigação, salivação e pH ruminal, podem limitar a digestão do alimento no rúmen (MARTINS et al., 2006). Isso porque o teor da parede celular do alimento é inversamente relacionado ao consumo e está associado à digestibilidade da dieta, que indica a capacidade do alimento a ser aproveitado pelo animal (WALDO & JORGENSEN, 1981).

Diante disso, para maximizar o aproveitamento das forragens com o intuito de aumentar o desempenho produtivo dos animais, novos programas

biotecnológicos associados à alimentação animal são interesse de estudos e atualmente disponibilizam produtos no mercado como objetivo de manipular o ambiente ruminal (PETERS et al., 2015).

Os aditivos destinados à alimentação animal são definidos pela Instrução Normativa 13/04 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) como “substância, microrganismo ou produto formulado, adicionado intencionalmente aos produtos, que não é utilizado normalmente como ingrediente, tenha ou não valor nutritivo e que melhore as características dos produtos destinados à alimentação animal dos produtos animais, melhore o desempenho dos animais sadios ou atenda às necessidades nutricionais”.

Antibióticos e ionóforos têm sido rotineiramente usados em dietas de ruminantes para melhorar a eficiência da produção e a utilização de nutrientes, no entanto seu uso restrito, em muitos países, tem fomentado a busca por estratégias alternativas.

Neste contexto, as enzimas fibrolíticas exógenas, leveduras vivas, óleos essenciais, extratos fitogênicos, ácidos orgânicos e outros aditivos vem sendo utilizados como alternativa ao uso de antibióticos como promotores de crescimento, pois os antimicrobianos são proibidos desde 2006 na União Europeia configurando-se como uma futura tendência em demais países.

As enzimas fibrolíticas exógenas (EFE) são uma alternativa para melhoria da degradação da fração fibrosa, como intuito potencializar a utilização dos nutrientes pelo animal e conseqüentemente seu desempenho. (MOHAMED et al., 2013). Os produtos comerciais a base de enzimas são extraídos da fermentação de fungos e bactérias dos gêneros *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Streptomyces*, *Ruminococcus*, *Fibrobacter* e *Bacillus* (SUBRAMANIYAM & VIMALA, 2012). Dois são os processos para realização da extração de enzimas: cultivo de fermentação submersa (melaço e caldos), comum em bactérias devido ao alto teor de umidade requerida; ou pela fermentação em estado sólido (farelos, baço e palhas), mais adequado para o cultivo de fungos, pois exigem menos umidade. Este último processo é amplamente utilizado, visto que os fungos possuem crescimento rápido e baixo custo de cultivo, possibilitando cultivos sob condições controladas em laboratório (MURAD & AZZAZ, 2010).

Enzimas de modo geral, são proteínas globulares, de estrutura terciária ou quaternária que agem como catalizadores biológicos, aumentando a velocidade das reações químicas no organismo, sem sofrerem alterações durante o processo. São altamente específicas para os substratos e conduzem todos os eventos metabólicos (LEHNINGER, 2013).

O uso das enzimas exógenas para ruminantes é favorável uma vez que a digestão da fração fibrosa no sistema digestivo atinge apenas 60-70%, mesmo em condições ideais (BEAUCHEMIN, et al., 2002). A taxa na qual a digesta passa através do trato digestivo pode ser muito rápida para que as enzimas nativas possam se fixar no substrato e iniciar a quebra de ligações entre as moléculas, decompondo todos os nutrientes consumidos pelo animal. Além disso, pode haver limitações na quantidade de enzimas produzidas pelos micróbios no trato digestivo, principalmente quando as condições ruminais não são favoráveis aos fibrolíticos, como a queda do pH e distúrbios digestivos, como a acidose ruminal.

As enzimas exógenas auxiliam a população microbiana na digestão da fibra, fazendo com que as bactérias poupem energia que normalmente iria para o trabalho de degradação e para sua própria atividade metabólica, podendo reverter para o animal para sua manutenção e produção. Uma vez que a enzima atua na degradação da parede celular vegetal há liberação de açúcares (monossacarídeos) facilitando a assimilação pelos microrganismos e, com isso, permitindo a liberação mais rápida dos AGCC para o animal. (ZILIO ET AL., 2019).

As EFE quando adicionadas na dieta tem a capacidade de remover as barreiras estruturais, formando ranhuras no alimento. Isso encurta o tempo de latência necessária para a colonização das bactérias, facilitando a adesão. Deste modo, confere maior estabilidade enzimática na formação do complexo enzima-substrato, dificultando a ação de proteases microbianas e aumentando seu tempo de permanência no rúmen, por não estar dissolvida no fluido ruminal. Conseqüentemente a liberação de açúcares aumenta a disponibilidade dos carboidratos solúveis (ARRIOLA ET AL., 2017).

Melhores resultados são observados quando as EFE são utilizadas em forragens de melhor qualidade por possuírem uma fração indigestível menor (MORENO et al, 2007). A fração indigestível está relacionada à lignina e a

quantidade de lignina negativamente relacionada com a digestibilidade. Isso porque a lignina forma complexos com carboidratos na parede celular das plantas. Esta “interferência” impede que as enzimas se liguem ao substrato, diminuindo assim a taxa na qual as enzimas podem funcionar. Arriola e colaboradores (2017) a partir de uma meta-análise em que verificaram métodos de administração (volumoso, concentrado e ou TMR) de EFE para vacas leiteiras observaram melhora na concentração de proteínas no leite ao aplicar a enzima na TMR e esse resultado não ocorreu na inclusão com volumoso ou concentrado separadamente.

Tem sido relatado que o uso de EFE melhora o estado energético do animal, reduzindo a concentração de betahidroxibutirato (BHBA) em função de menor mobilização de gordura, ocasionando melhora ou diminuição nos efeitos nocivos do balanço energético negativo (BEN) por promover nutrientes rapidamente absorvíveis (DEAN et al., 2013).

As enzimas favorecem a quebra do substrato liberando os monômeros que mais rapidamente são captados pelos microrganismos e consecutivamente aumentando a velocidade de síntese do AGCC, promovendo energia e diminuindo o BEN. Ainda, essa maior quantidade de partículas e de monômeros promove a proliferação da população bacteriana acarretando em maior síntese de proteína microbiana (BAAH et al., 2005). Giraldo et al. (2008) e Gado et al. (2009) verificaram que a inclusão de EFE às dietas para ovinos e vacas leiteiras, respectivamente, aumentam o crescimento microbiano e a produção de proteína microbiana com possibilidade de incremento na porcentagem de gordura do leite em função da maior produção de acetado pelas bactérias celulolíticas causada pela melhor disponibilidade da fibra.

Sendo assim maiores serão as fontes de energia para os microrganismos com maior síntese de AGCC, podendo refletir positivamente em produção de leite, devido ao aumento da digestibilidade e consumo de matéria seca. Silva et al (2016) ao suplementar EFE na dieta de vacas no meio de lactação observou aumento linear no consumo de MS, além de aumento na produção de AGCC e explica esses efeitos devido a melhorias na atividade enzimática ruminal e, conseqüentemente, maior disponibilidade de carboidratos solúveis fermentáveis.

Oh *et al.* (2019) encontraram maiores concentrações de AGCC no líquido ruminal de vacas holandesas lactantes que foram suplementadas com EFE em relação a animais não suplementados. Este aumento foi atribuído a uma maior fermentação de produtos fibrosos no rúmen dos animais. Esses dados corroboram com Abid *et al.* (2019), que também observaram aumento nos teores de AGCC na fermentação *in vitro* de subprodutos de palma tratados com EFE.

Lunagariya *et al.* (2019) constataram digestibilidade melhorada na dieta de vacas no período seco suplementadas com EFE misturadas a dieta total (TMR) além de maior ganho de peso, em virtude da maior disponibilidade de nutrientes. Porém Ran *et al.* (2019) não encontraram diferenças na digestibilidade da MS, MO, FDN e FDA.

Schingoethe *et al.* (1999) que observaram aumento de 10,8% na produção de leite, 20% no teor de gordura e 13% em proteínas no leite de vacas em lactação suplementadas com EFE na dieta a base de silagem de milho. Outros estudos com vacas em início de lactação relataram maior desempenho na produção de leite (GADO ET AL., 2009; SCHINGOETHE ET AL., 1999; YANG ET AL., 1999), mas contrariamente, estudos semelhantes não obtiveram tais resultados (ARRIOLA ET AL., 2011; BEAUCHEMIN ET AL., 2000; HOLTSHAUSEN ET., 2011) demonstrando que os efeitos da utilização de EFE em vacas leiteiras ainda apresentam variações.

Contudo, os benefícios causados pelo uso de EFE como aumento na produção de AGCC, na produção de leite, síntese de proteína microbiana, e o consumo estão relacionados com a melhora na digestibilidade da fração fibrosa em função do sinergismo e aumento da população microbiana. O modo de ação dos produtos enzimáticos ainda está por ser esclarecido necessitando estudos que comprovem a eficácia da utilização das EFE na nutrição de ruminantes.

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da inclusão de enzimas fibrolíticas sobre o consumo, a digestibilidade, o desempenho produtivo e o comportamento animal de vacas no pico de lactação.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a digestibilidade da dieta de vacas lactantes suplementadas com enzimas fibrolíticas;
- Avaliar o consumo de alimentos e o comportamento alimentar de vacas lactantes através de alimentadores inteligentes (Intergado®);
- Avaliar o comportamento animal (tempo de ruminação, atividade e ócio) de coleiras eletrônicas (Chip Inside, Brasil) de vacas lactantes suplementadas com enzimas fibrolíticas exógenas;
- Avaliar a produção de leite de vacas lactantes da raça Holandês suplementadas com enzimas fibrolíticas,
- Avaliar o peso através de fita de pesagem e o escore de condição corporal (ECC) de vacas lactentes suplementadas com enzimas fibrolíticas.

4 Hipótese

Hipotetizamos que a suplementação de enzimas fibrolíticas em vacas leiteiras diminui o tempo de ruminação e aumenta a produção de leite devido a melhora na digestibilidade da dieta e do aumento no consumo de matéria seca.

5 Artigo

Suplementação com enzimas fibrolíticas em vacas lactantes e sua ação no comportamento alimentar

Supplementation with fibrolytic enzymes in lactating cows and their action on feeding behavior

**Joana Piagetti Noschang¹ Magna Fabrícia Brasil Savela¹ Antônio Amaral Barbosa¹
Marcio Nunes Corrêa¹ Cássio Cassal Brauner^{2*}**

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da suplementação com enzimas fibrolíticas sobre o desempenho comportamental e produtivo de vacas em lactação. O estudo foi realizado em uma propriedade leiteira comercial no município de Rio Grande, Rio Grande do Sul, nas coordenadas geográficas 32°16'S, 52°32'L, durante 23 de setembro a 11 de novembro de 2019. A fazenda apresentava sistema de criação intensivo em galpão “*compost barn*” e ordenha mecânica realizada duas vezes ao dia. Foram utilizadas 36 vacas da raça Holandês divididas em dois grupos (controle e suplementado) avaliadas durante 24 dias. As enzimas testadas eram proveniente de fonte comercial MaxFiber® (Provitta Supplements, Pinneberg/Germany), sendo fornecidas na quantidade de 10 g/ animal/dia, misturado à ração total. Foi verificada a digestibilidade da ração misturada total, a produção de leite individual, o comportamento alimentar com a utilização de Alimentadores inteligentes (Intergado®), assim como o comportamento animal através de coleiras de monitoramento animal CowMed (ChipInside® Tecnologia/Santa Maria/RS/Brasil/). Não houve efeito da suplementação enzimática sobre o consumo, a digestibilidade, e produção de leite,

¹Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), Pelotas, RS, Brasil.

^{2*}Departamento de Zootecnia, Fundação Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), 96160-000, Pelotas, RS, Brasil. E-mail: joana.piagetti@hotmail.com. Autor para correspondência.

porém a adição de enzimas afetou o comportamento alimentar apresentando aumento no tempo em atividade e diminuição no tempo de ruminação.

Palavras-chave: aditivos, bovinocultura de leite, digestibilidade, nutrição de precisão, produção animal, ruminação

ABSTRACT

The objective of this experiment was to evaluate the effects of supplementation with exogenous fibrolytic enzymes on the productive and behavioral performance of lactating cows. The study was carried out in a commercial dairy farm in the city of Rio Grande, Rio Grande do Sul, in the geographic coordinates 32°16'S, 52 ° 32'E, during September 23 to November 11, 2019. The farm had an intensive shed rearing system. Compost barn and mechanical milking performed twice a day. Thirtysix Holstein cows divided into two groups (control and supplemented) were evaluated during 24 days. The enzymes tested came from a commercial MaxFiber® source (Provitta Supplements, Pinneberg / Germany) and were supplied in the amount of 10g/animal/day mixed with the total feed. Total mixed ration digestibility, individual milk yield, feeding behavior using smart feeders (Intergado®), as well as animal behavior through CowMed animal monitoring collars (ChipInside® Technology/Santa Maria/RS) were verified. /Brazil/. There was no effect of enzymatic supplementation on digestibility, dry matter intake and milk yield, however the addition of enzymes affected the feeding behavior presenting increase in activity time and decrease in rumination time.

Key words: additives, animal production, dairy cattle, digestibility, precision nutrition, rumination

INTRODUÇÃO

A evolução da produção de leite de vacas lactantes se deu, em grande parte, pelo progresso genético, visto que a produção aumentou em torno de 60% nos últimos 10 anos (USDA, 2017). Todavia, tal evolução fez com que ocorresse um notável aumento na necessidade energética desses animais para a síntese do leite. Aliado a isso, a intensificação dos sistemas produtivos objetivando maior controle da dieta e, por conseguinte, uma maior garantia do suprimento de energia disponível, resultou em vacas constantemente desafiadas (REFAT et al, 2018).

Através do aumento do aporte energético e da intensificação dos sistemas, as perdas de energia para atividade de manutenção, assim como o volume de matéria seca ingerida para produção de leite aumentaram, culminando com uma melhor eficiência alimentar. Por outro lado, isso acarreta maiores custos de produção, tanto para implantação do sistema quanto pelo custo das dietas energéticas (SUJANI & SERESINHE et al., 2015).

Apesar da grande importância do uso de concentrado na dieta as forragens são a base da alimentação de ruminantes, pois estes são capazes de transformar fibras de baixa qualidade em proteínas de alto valor biológico. Os teores de fibra representam 40 a 100% na dieta de vacas leiteiras e desempenham papel fundamental na produção, saúde e bem-estar animal, pois além de ser uma importante fonte de energia, estimulam a mastigação, salivação, ruminação, motilidade ruminal, além de regular o consumo produzindo ainda precursores de gordura no leite (ADESOGAN et al, 2019). Portanto, maximizar a utilização de forragens é essencial para manter a sustentabilidade do sistema, visto que a alimentação representa a maior proporção dos custos de produção.

O aproveitamento de alimentos fibrosos pelos ruminantes está relacionado à síntese e secreção de enzimas pelos microrganismos do rúmen, pois estes promovem a hidrólise da parede celular das plantas, as quais são constituídas por celulose, hemicelulose e lignina. No entanto, estes compostos estruturais podem sofrer resistência ao ataque enzimático realizado pelas bactérias ruminais, limitando a digestibilidade da fibra e a energia disponível para o animal (BEAUCHEMIN, et al., 2003) que, em condições ótimas, pode atingir até 70% da digestibilidade (SUJANI; SERESINHE, 2015).

Diante disso, as enzimas fibrolíticas exógenas (EFE) são uma alternativa para o maior aproveitamento da fração fibrosa da dieta e seu mecanismo de ação ocorre através da hidrólise de ligações específicas da fibra que normalmente são hidrolisados pelas enzimas endógenas. Este sinergismo entre as bactérias ruminais e as EFE, é capaz de reduzir os teores de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) aumentando a digestibilidade da dieta (ZILIO et al., 2019). Isso porque as EFE tem a capacidade de remover as barreiras estruturais do alimento, facilitando o acesso e a adesão das bactérias, liberando monossacarídeos para as bactérias converterem em AGCC (ARRIOLA et al., 2017).

Tal processo confere maior disponibilidade de monossacarídeos para a captação dos microrganismos e produção dos compostos utilizados como fonte de energia pelo animal resultando em maior produção de leite (SUJANI e SERESINHE, 2015; GANDRA et al., 2017). A melhora da eficiência alimentar proporcionada pela inclusão de aditivos alimentares tem efeitos diretos tanto metabólicos como comportamentais, visto que as mudanças em ruminação, ócio e marcadores séricos são evidentes nesses casos.

A observação do comportamento alimentar é uma ferramenta que auxilia na otimização da saúde e produção de leite, configurando-se como mais um instrumento da pecuária de precisão que possibilita ajustar, de forma eficaz, o manejo alimentar (BORCHERS et al, 2016; JOHNSTON, DEVRIES, T. J., 2018). A avaliação comportamental é constituída pelos tempos de atividade, ruminação e ócio e segundo achados de Steensels et al (2017) seus valores médios são variáveis e podem oscilar de 366 a 595,24 min/dia. Segundo Van Soest (1991), o tempo de ruminação é influenciado pela natureza da dieta e parece ser proporcional ao teor da parede celular dos volumosos.

Há escassez de estudos que avaliem o comportamento alimentar de animais suplementados com EFE e a eficácia dos produtos enzimáticos ainda está por ser esclarecida, devido a grande variabilidade de resultados. Diante disso o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da inclusão de enzimas fibrolíticas exógenas sobre o consumo, a digestibilidade, o desempenho produtivo e o comportamento animal de vacas no pico de lactação.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado em uma propriedade leiteira comercial no município de Rio Grande, Rio Grande do Sul, nas coordenadas geográficas 32°16'S, 52°32'L, durante o período de 23 de setembro à 11 de novembro de 2019.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (Cod. 46050-2019).

Foram utilizadas 36 vacas da raça Holandês criadas em sistema intensivo em galpão “*compost barn*” e ordenhadas duas vezes ao dia por ordenhadeira mecânica. Os animais foram segregados em dois grupos, grupo controle (GC) e grupo suplementado

(GS), ambos com 18 animais, acompanhadas durante 24 dias a partir dos 40 dias de lactação. Para o GS houve a inclusão de 10g/animal/dia de enzimas fibrolíticas, produzidas a partir das linhagens de *Aspergillus niger*, *Aspergillus tubingensis*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus sojae* e *Neurospora intermedia* (MaxFiber®, Provitta Supplements, Pinneberg/Germany), contendo atividades de xilanase, endoglucanase e exoglucanase, adicionada à ração misturada total (TMR) previamente antes da oferta matinal.

Os grupos foram manejados conjuntamente durante o período experimental e receberam a mesma dieta (Tabela 1), duas vezes ao dia, com água *ad libitum*. Para manter a homogeneidade dos grupos foi considerado número de lactações, entre duas e quatro, dias em lactação (DEL) de 40 a 70 dias, produção de leite média de 38 ± 4.10 kg, peso corporal médio de 700 ± 58 e 3 ± 0.44 de escore de condição corporal (ECC).

Tabela 1: Composição bromatológica da ração misturada total (TMR) dos animais (n=36) do grupo controle (GC) e grupo suplementado (GS) com 10g/vaca/dia de enzimas fibrolíticas exógenas (MaxFiber®, Provitta Supplements, Pinneberg/Germany).

| Composição da dieta (%MS) | | | | | | |
|---------------------------|-----------------|-----------------|-----------------------|------------------|------------------|------------------|
| Ingrediente | %MS | | Quant animal/dia (kg) | | | |
| Água | 0,01 | | 8 | | | |
| Milho Moído | 86,14 | | 1 | | | |
| Farelo de soja | 87,84 | | 2,9 | | | |
| Casca de soja | 89,86 | | 2,6 | | | |
| Farelo de arroz | 88,65 | | 1,9 | | | |
| Milho grão úmido | 70 | | 2 | | | |
| Silagem de milho | 44,85 | | 27 | | | |
| Pré secado Azevém | 44,37 | | 2 | | | |
| Resíduo de arroz | 89,2 | | 1 | | | |
| Bromatologia da TMR (%) | | | | | | |
| MS ¹ | MM ² | PB ³ | EE ⁴ | FDN ⁵ | FDA ⁶ | LIG ⁷ |
| 91,74 | 9,37 | 12,71 | 5,54 | 35,04 | 18,89 | 1,59 |

¹Matéria seca; ²Matéria mineral; ³Proteína bruta; ⁴Extrato etéreo; ⁵Fibra em detergente neutro; ⁶Fibra em detergente ácido; ⁷Lignina

Os rendimentos individuais e diários de leite foram gravados automaticamente pelo sistema de ordenha mecanizada (DeLaval®).

O comportamento alimentar foi avaliado diariamente através da utilização de alimentadores inteligentes (Intergado®) de forma automática e individualizada, os quais revelaram dados de consumo individual (kg/dia), tempo total de acesso ao cocho (min/dia), tempo de consumo (min/dia), número total de visitas ao cocho (número de acesso/dia).

O comportamento animal foi avaliado através de coleiras de monitoramento CowMed (ChipInside® Tecnologia – Santa Maria/RS/Brasil/) as quais indicavam o tempo em minutos em que o animal permanecia em atividade (social, sexual, busca por alimento, consumo de água), ruminação ou ócio diariamente durante 24h, por 24 dias.

Amostras da dieta total foram colhidas semanalmente e enviadas ao Laboratório de Bromatologia e Nutrição de Ruminantes, na cidade de Santa Maria/RS, onde foi realizada análise de digestibilidade *in vitro*. Também foi colhida amostra diária da ração total para avaliação do tamanho de partículas usando um sistema de peneiras (Pen State Particle Separator – Nasco, Fort Atkinson, WI) como descrito por Kononoff et al (2003).

Os animais foram pesados após a ordenha da manhã nos dias 0, 14, 19 e 24 do período experimental, através da fita de pesagem e verificado o escore de condição corporal (ECC) através da avaliação visual utilizando parâmetros de 1 a 5, com intervalos de 0,25 (Edmonson et al., 1989).

A análise estatística dos dados obtidos foi realizada através do programa Statistical Analysis System (SAS Institute Inc. Cary, NC, EUA). Para tal, foi utilizada análise de variância com Mixed Model para comparação dos grupos, coletas e sua

interação (grupo x coleta) através do teste de Tukey HS, sendo considerados significativos valores de $P < 0.05$ e tendenciosos valores de $P < 0.1$.

RESULTADOS

Na avaliação do comportamento o tempo de ruminação apresentou tendência ($P=0.08$; Figura 1) sendo menor no grupo suplementado (619.78 ± 5.42 vs 632.47 ± 4.8). Houve maior tempo de atividade (Figura 2) no grupo suplementado em relação ao grupo controle (199.60 ± 4.31 vs 183.79 ± 2.96 $P=0,026$) enquanto o tempo de ócio não apresentou diferença (Tabela 2).

Tabela 2: Médias de tempo (min) \pm erro padrão (EP) para parâmetros do comportamento animal (atividade, ruminação e ócio) de animais do grupo suplementado (GS) com 10g/vaca/dia de enzimas fibrolíticas exógenas (MaxFiber®, Provitta Supplements, Pinneberg/Germany) e controle (GC) (n=36) avaliados diariamente através de coleiras de monitoramento (ChipInside®).

| Parâmetro | GS ¹ | GC ² | Valor de P | | |
|--------------------|-------------------|-------------------|------------|--------|--------|
| | | | Grupo | Coleta | G*C |
| Atividade, min/dia | 199.60 \pm 4.31 | 183.79 \pm 2.96 | 0.0026 | 0.1380 | 1.0000 |
| Ruminação, min/dia | 619.78 \pm 5.42 | 632.47 \pm 4.83 | 0.0810 | <.0001 | 0.9980 |
| Ócio, min/dia | 615.56 \pm 6.07 | 623.73 \pm 5.97 | 0.3380 | <.0001 | 0.5915 |

¹GS: grupo suplementado

²GC: grupo controle

G*C: interação grupo e coleta

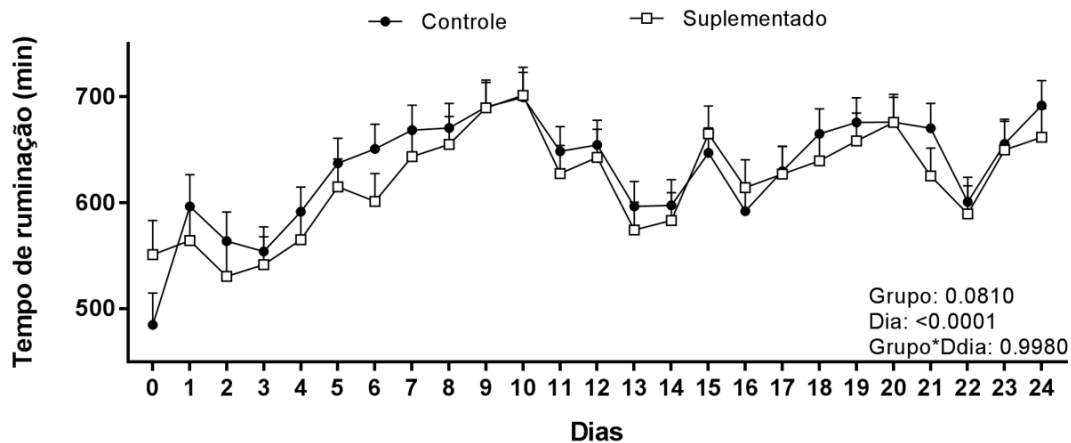


Figura 1: Efeito da suplementação com 10g/vaca/dia de enzimas fibrolítica exógena sobre o tempo de ruminação de animais do grupo suplementado (GS) (MaxFiber®, Provitta Supplements, Pinneberg/Germany) e Controle (GC) (n=36) avaliados diariamente através de coleiras de monitoramento (ChipInside®).

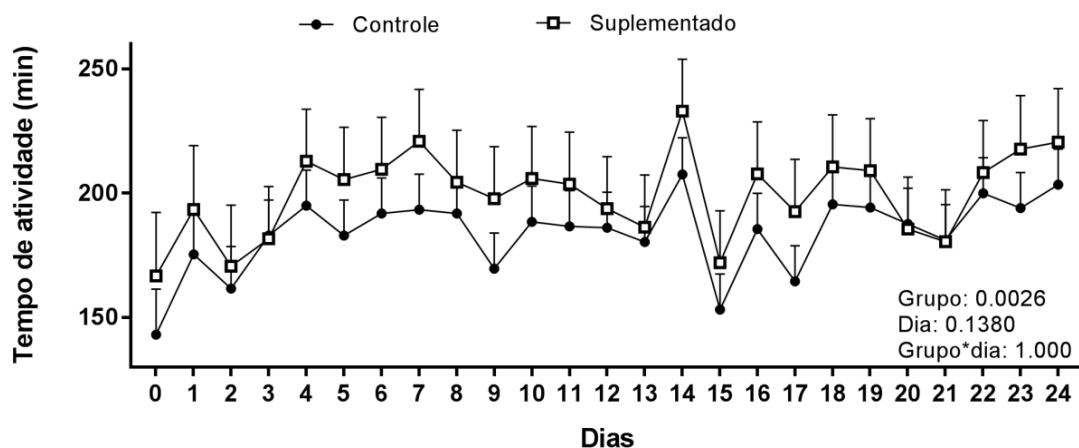


Figura 2: Efeito da suplementação com 10g/vaca/dia de enzimas fibrolítica exógena sobre o consumo de animais do grupo suplementado (GS) (MaxFiber®, Provitta Supplements, Pinneberg/Germany) e Controle (GC) (n=36) avaliados diariamente através de coleiras de monitoramento (ChipInside®).

Nos resultados do comportamento alimentar (Tabela 3) houve maior número de visitas aos cochos ($P=0.004$; Figura 3) no GS quando comparado ao GC. Não houve diferença entre os grupos no consumo (Figura 4).

Tabela 3: Médias \pm erro padrão (EP) do comportamento alimentar de animais do grupo suplementado (GS) com 10g/vaca/dia de enzimas fibrolíticas exógenas (MaxFiber®, Provitta Supplements, Pinneberg/Germany) e Controle (GC) (n=36) avaliados diariamente através de comedouros inteligentes (Intergado®).

| Parâmetro | GS | GC | Valor de P | | |
|--------------------------------------|-------------------|-------------------|------------|--------|--------|
| | | | Grupo | Coleta | G*C |
| Consumo, kgMS/dia | 19.24 \pm 0.30 | 19.34 \pm 0.28 | 0.4929 | <.0001 | 0.0130 |
| Tempo total acesso ao cocho, min/dia | 136.65 \pm 2.39 | 133.02 \pm 2.29 | 0.2732 | <.0001 | 0.8563 |
| Tempo de consumo, min/dia | 121.56 \pm 2.29 | 120.34 \pm 2.13 | 0.6973 | <.0001 | 0.4999 |
| Número de visitas com consumo | 27.50 \pm 0.70 | 24.92 \pm 0.57 | 0.0046 | <.0001 | 0.8395 |

¹GS: grupo suplementado

²GC: grupo controle

G*C: interação grupo e coleta

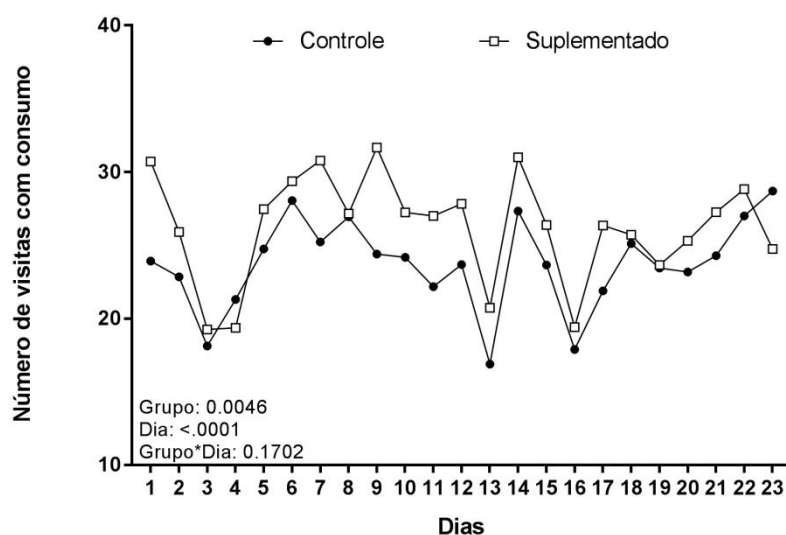


Figura 3: Efeito da suplementação com 10g/vaca/dia de enzimas fibrolítica exógena sobre o número de visitas aos cochos de animais do grupo suplementado (GS) (MaxFiber®, Provitta Supplements, Pinneberg/Germany) e Controle (GC) (n=36) avaliados diariamente através de Alimentadores inteligentes (Intergado®).

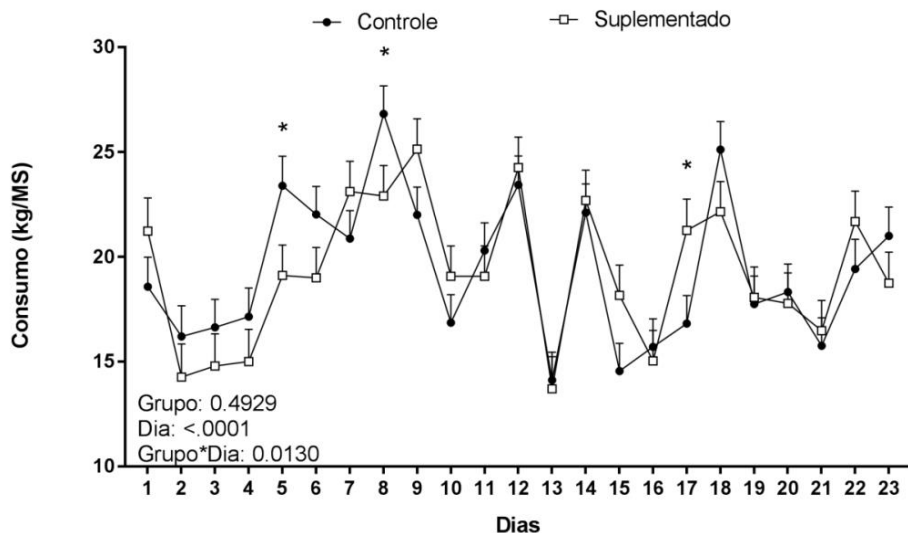


Figura 4: Efeito da suplementação com 10g/vaca/dia de enzimas fibrolítica exógena sobre o consumo de animais do grupo suplementado (GS) (MaxFiber®, Provitta Supplements, Pinneberg/Germany) e Controle (GC) (n=36) avaliados diariamente através de alimentadores inteligentes (Intergado®).

A produção de leite foi afetada pela suplementação com enzimas fibrolíticas (P=0.052; Figura 5), sendo observados valores de $40,53 \pm 0,42$ e $41,70 \pm 0,43$ para o GC e GS, respectivamente.

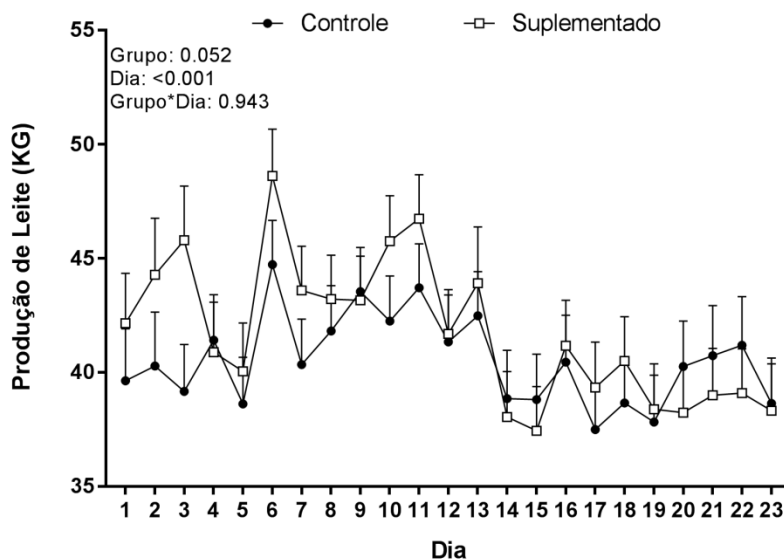


Figura 5: Produção de leite de vacas (n=36) do grupo controle (GC) e do grupo suplementando (GS) com 10g/vaca/dia de enzimas fibrolítica exógena (MaxFiber®, Provitta Supplements, Pinneberg/Germany).

Os resultados obtidos na análise de digestibilidade da TMR encontram-se na Tabela 4. A média de digestibilidade para as dietas dos grupos controle e suplementados foram 60.270 ± 4.99 e 62.014 ± 4.54 ($P=0.501$), respectivamente. Não houve diferença entre os grupos sobre o peso e o ECC ($P > 0.05$).

Tabela 4: Taxa de digestibilidade (%) das amostras de dieta total do grupo suplementado (GS) com 10g/vaca/dia de enzimas fibrolíticas exógenas (MaxFiber®, Provitta Supplements, Pinneberg/Germany) e controle (GC).

| Digestibilidade <i>in vitro</i> da dieta total | | | | | | | | | |
|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------------|------------|
| Amostras | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | Média | Valor de P |
| GC ¹ | 66,53 | 58,51 | 58,98 | 54,79 | 54,05 | 63,82 | 65,21 | 60.270 ± 4.99 | 0.501 |
| GS ² | 67,58 | 61,99 | 59,26 | 54,97 | 59,13 | 64,65 | 66,52 | 62.014 ± 4.54 | |

¹GC: grupo controle

²GS: grupo suplementado

DISCUSSÃO

Poucos são os trabalhos que avaliam o comportamento animal quando utilizadas EFE na dieta de vacas leiteiras e ainda, os trabalhos existentes analisaram apenas o tempo em ruminação (SILVA et al, 2016; PETERS et al., 2015). Ao avaliar o comportamento animal no presente estudo observamos uma tendência à redução no tempo de ruminação (TR) dos animais do GS e isso pode estar relacionado a um menor tamanho de partículas da dieta, causada pelo incremento da microbiota endógena e sua atividade enzimática. A média da porcentagem de fibra longa (>19mm) deste estudo encontrada através do separador de partículas *Pen State* foi de 11%. De acordo com Kononoff et al (2003) as diretrizes para TMR de vacas leiteiras de alta produção são de 2 a 8% das partículas na peneira superior. Sendo assim esta maior quantidade de

partículas longas deveria ter aumentado o TR, o que não aconteceu no estudo corrente, sugerindo que a tendência à diminuição da ruminação pode ter sido afetada por um efeito da EFE sobre a atividade enzimática endógena. SILVA et al (2016) encontraram aumento no TR de vacas que receberam enzimas fibrolíticas na dieta devido ao maior consumo de fibras longas observado no grupo suplementado.

De acordo com Mertens (1997) a ruminação é estimulada pela ingestão de fibra fisicamente efetiva (peNDF) definida por um tamanho de partícula maior que 8 mm. Krause et al. (2002) encontraram uma relação positiva entre consumo de matéria seca de partículas longas e o TR, pois é necessário maior tempo de ruminação para processar a fibra longa assim como uma quantidade crescente de alimentos. O TR verificado no presente estudo (GS = $619,78 \pm 5.42$ e GC = 632.47 ± 4.83) encontram-se dentro dos padrões verificados por Soriani et al (2012) que encontraram variação de 400 a 685 min/dia de vacas lactantes.

O tempo de atividade (TA) indica quanto o animal se moveu, mas sem especificar o tipo de ação, alguns autores reportam que o declínio no TA está associado com a presença de possíveis doenças, sendo utilizado como auxílio para diagnósticos precoces (KING et al, 2017). O tempo médio dispendido para atividade no GS foi 199,60 min, sendo 121,56 min destinados ao consumo restando 78 min para demais atividades. Enquanto que no GC foram encontrados valores de 183,70 minutos, onde 50,77 min dispendidos para as atividades quando excluído o tempo de consumo. O aumento no tempo de atividade no GS corrobora com o maior número de visitas aos cochos observados para este grupo, quando avaliados nos sistemas de Alimentadores inteligentes. Kondratovich et al (2019) não encontraram diferença na taxa de atividade de bovinos de corte suplementados com EFE, mas observaram aumento no tempo de ruminação justificado pelo aumento no consumo verificado no experimento.

O tempo em ócio (TO) é definido pelo tempo em que o animal não está ingerindo alimentos, nem ruminando ou ingerindo água. No presente estudo o TO não foi diferente entre os grupos, mas ambos permaneceram dentro dos valores médios relatados por Carvalho (2009) de 600min/animal/dia para vacas em lactação em sistemas de confinamento.

As atividades comportamentais são excludentes, uma vez que as vacas dispõem de 24 horas para o desenvolvimento de atividade, ruminação e ócio. Diante disso, com a tendência no TR, possivelmente ocasionado pelo efeito da enzima, houve aumento no tempo de atividades dos animais do GS, uma vez que o TO não foi alterado.

O maior número de visitas aos cochos no GS pode estar relacionado a uma taxa de passagem mais rápida da digesta pelo trato gastrointestinal, uma vez que verificamos o aumento no TA e uma tendência no TR, sugerindo que os animais necessitaram de menos tempo para fracionar as partículas da dieta e se movimentaram mais vezes até os alimentadores inteligentes. DeVries (2019) salientou que refeições menores e mais frequentes são benéficas para maximizar a fermentação ruminal, pois a maior frequência de alimentação favorece o tamponamento do rúmen e a atividade de bactérias fibrolíticas.

No presente estudo a suplementação com EFE não alterou o consumo (19.34 ± 0.28 e 19.24 ± 0.30 para o GC e GS, respectivamente), o que corrobora com Refat et al., (2018) que verificaram maior acessos aos cochos de alimentação sem alterar o consumo. Com a suplementação de EFE esperava-se o aumento na IMS, uma vez que as enzimas podem aumentar a velocidade de hidrólise da fibra e digestão dos nutrientes, o que por sua vez, retroalimenta a ingestão de matéria seca por permitir uma maior taxa de passagem de nutrientes digeridos através de seus efeitos benéficos em

parâmetros de cinética de fermentação ruminal (ELGHANDOUR et al., 2013; KONDRATOVICH et al, 2019).

Clément et al (2014) verificaram um maior consumo, bem como, maior tempo de consumo em vacas de alta produção de leite. Em contraste, Holstshausen et al (2011) encontraram diminuição do consumo de MS com a inclusão de produtos enzimáticos nas dietas, especulando ser devido ao aumento da eficiência no uso dos nutrientes levando a saciedade dos animais. He et al. (2015) verificaram que o tempo de alimentação aumentou quando enzimas fibrolíticas foram adicionados à dieta de novilhas de corte. No estudo corrente a utilização de EFE aumentou o número de visitas aos cochos, demonstrando que os animais do grupo suplementado tornaram-se mais ativos. Tais achados estão de acordo com o estudo de Silva (2014) onde constatou que os animais apresentaram mais visitas aos cochos de alimentação.

O consumo de matéria seca em ruminantes pode ser regulado pelo estado energético do animal sobre estimulação do centro da saciedade do cérebro (ALLEN et al., 2009). Embora uma maior digestibilidade dos nutrientes possa aumentar a taxa de passagem do alimento e promover o consumo de ração, essa também tem a capacidade de fornecer maiores quantidades de combustíveis oxidáveis para os hepatócitos, resultando em depressão no consumo de ração (GRANDA, et al., 2017). Allen (2000) ao infundir propionato ou acetato no retículo-rúmen de vacas em lactação observou redução da IMS em 33% e 14%, respectivamente quando comparado ao grupo controle.

Com o possível incremento da microbiota e/ou sua atividade enzimática, sugerimos que possa ter ocorrido um aumento na síntese de Ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), proporcionando maior energia disponível para o animal. Essa maior energia disponível manda sinais ao centro da saciedade no hipotálamo, cessando o consumo. Este possível aumento na disponibilidade de energia ocasionado pela EFE

pode ter causado o incremento da produção de leite observados no GS do estudo corrente. Muitos estudos com EFE observaram aumento na síntese de AGCC (OH et al., 2019; Abid et al, 2019) especulando ser devido a maior atividade enzimática ruminal.

Gado (2009) verificou aumento de 3kg de leite em vacas suplementadas com enzimas fibrolíticas especulando ser devido ao aumento da digestibilidade, ingestão, bem como alteração da relação acetato / propionato no rúmen, o que aumentou a energia disponível para a produção de leite.

A utilização das EFE na dieta de vacas leiteiras tem potencial de reduzir o nível de concentrado na dieta reduzindo custos com alimentação em função da maior disponibilidade de nutrientes, porém a variabilidade nas repostas sobre seus efeitos é grande. A incerteza na eficácia dos produtos enzimáticos está atribuída às necessidades nutricionais do animal, estágio de lactação, composição da dieta, atividade enzimática, dose e método de utilização (RAN et al., 2019).

CONCLUSÃO

A suplementação de enzimas fibrolíticas em dietas para vacas em lactação alterou o comportamento de vacas leiteiras, aumentando o tempo dispendido para atividade, a frequência de alimentação e a produção de leite. Assim como uma tendência para diminuição do tempo de ruminação.

REFERÊNCIAS

ABID, K. et al. Influence of adding fibrolytic enzymes on the ruminal fermentation of date palm by-products. **Archives Animal Breeding**, v.62,p1-8, 2019. Available from: <

<https://www.arch-anim-breed.net/62/1/2019/>> Accessed: Ago. 13, 2019. Doi: 10.5194/aab-62-1-2019

ADESOGAN, A.T. et al Symposium review: Technologies for improving fiber utilization. **Journal of Dairy Science**, v.102,p.1–30, 2019. Available from: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030219302954>> Accessed: Ago. 13, 2019. Doi: 10.3168/jds.2018-15334

ALLEN, M.S. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.83,p. 1598–1624, 2000. Available from: <[https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(00\)75030-2/pdf](https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(00)75030-2/pdf)> Doi: 10.3168/jds.S0022-0302(00)75030-2

ALLEN, M.S. et al. The hepatic oxidation theory of the control of feed intake and its application to ruminants. **Journal of Animal Science**, v.87,p.3317–3334, 2009. Available from: <http://www.uky.edu/Ag/AnimalSciences/instruction/asc684/PDF/JAS87_3317.pdf> Accessed: Sep. 15, 2019. Doi:10.2527/jas.2009-1779

ARRIOLA, K. G. et al. Effect of fibrolytic enzyme application to low and high concentrate diets on the performance of lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.94,p.832–841, 2011. Available from: <www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21257052> Accessed: Ago,10. 2019. Doi: 10.3168/jds.2010-3424

ARRIOLA, K. G. et al. A meta-analysis on the effect of dietary application of exogenous fibrolitic enzymes on the performance of dairy cow. **Journal of Dairy Science**, v.100,p.1-1, 2017. Available from:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28365114>> Accessed: Ago 10, 2019. doi : 10.3168/jds.2016-12103.

BEAUCHEMIN, K. A.; COLOMBATO, D.; MORGAVI, D. P.; YANG, W. Z. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve animal feed utilization by ruminants. **Journal Animal of Science**, v.81,p.37-47, 2003. Available from:<https://academic.oup.com/jas/article-abstract/81/14_suppl_2/E37/4789761> Accessed: Jul.30, 2019. doi:10.2527/2003.8114.

BORCHERS, M. R. et al. A validation of technologies monitoring dairy cow feeding, ruminating, and lying behaviors. **Journal of Dairy Science**, Missouri, v.99,p.7458–7466, 2016. Available from: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27423949>> Accessed: Out, 3. 2019. Doi: 10.3168/jds.2015-10843

CARVALHO, P.C.F. et al. Managing grazing animals to achieve nutrient cycling and soil improvement in no-till integrated systems. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v.88,p.259–273, 2009. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/225327734_Managing_grazing_animals_to_achieve_nutrient_cycling_and_soil_improvement_in_no-till_integrated_systems> Accessed: Out, 10, 2019. Doi: 10.1007/s10705-010-9360-x

CLEMENT, P. et al. *Short communication*: added value of rumination time for the prediction of dry matter intake in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.97,p.6531–6535, 2014. Available from: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25129493>> Accessed: Jul, 7. 2019.
Doi:10.3168/jds.2013-7860

DEAN, D. B. et al. Effect of method of adding a fibrolytic enzyme to dairy cow diets on feed intake digestibility, milk production, ruminal fermentation, and blood metabolite. **Animal Nutrition and Feed Technology**, v.13,p.337–357, 2013. Available from: <
https://www.researchgate.net/publication/260001238_Effect_of_Method_of_Adding_a_Fibrolytic_Enzyme_to_Dairy_Cow_Diets_on_Feed_Intake_Digestibility_Milk_Production_Ruminal_Fermentation_and_Blood_Metabolites> Accessed, Jul, 10. 2019.

DEVRIES, T. **Feeding Behavior, Feed Space, and Bunk Design and Management for Adult Dairy Cattle**. v.35,p.61–76, 2019. Available from: <
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0749072018300549?via%3Dihub>> Accessed, Jan, 2020. Doi: 10.1016/j.cvfa.2018.10.003

ELGHANDOUR, M. M. Y. et al. Effects of exogenous enzymes on in vitro gas production kinetics and ruminal fermentation of four fibrous feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v.179,p.46-5, 2013. Available from: <
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840112003951>> Accessed: Sep, 15. 2019. Doi: 10.1016/j.anifeedsci.2012.11.010

GADO, H. M. et al. Influence of exogenous enzymes on nutrient digestibility, extent of ruminal fermentation as well as milk production and composition in dairy cows. **Animal Feed Science and Tecnology**, v.154, p.36-46, 2009. Available from: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840109002545?via%3Dihub>>

Accessed: Sep, 16. 2019. Doi: 10.1016/j.anifeedsci.2009.07.006

HE, Z. X. et al. Effect of wheat dried distillers grains with solubles and fibrolytic enzymes on ruminal fermentation, digestibility, growth performance, and feeding behavior of beef cattle. *Journal of Animal Science*, v.93,p.1218–1228, 2015. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26020898> > Accessed: Sep, 13. 2019. Doi: 10.2527/jas.2014-8412.

HOLTSHAUSEN, L. et al. Improved milk production efficiency in early lactation dairy cattle with dietary addition of a developmental fibrolytic enzyme additive. **Journal of Dairy Science**, v. 94,p.899–907, 2011. Available from:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21257058>> Accessed: Ago, 02. 2019. Doi:

10.3168/jds.2010-3573

JOHNSTON, C.; DEVRIES, T. J. Short communication: Associations of feeding behavior and milk production in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.101,p.3367–3373, 2018. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29397173>>

Accessed: Out, 20. 2019. DOI:[10.3168/jds.2017-13743](https://doi.org/10.3168/jds.2017-13743)

KING, M. T. M. et al. Deviations in behavior and productivity data before diagnosis of health disorders in cows milked with an automated system. **Journal of Dairy Science**, v.100,p.1–14, 2017. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28755933>> Accessed: Jul, 30. 2019. DOI: 10.3168/jds.2017-12723

KONONOFF, P. J.; BUCKMASTER, D. R. Modification of the Penn State Particle Separator and the effects of moisture on its measurements. **Journal of Dairy Science**, v.86,p.1858–1863, 2003. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12778598>> Accessed: Oct, 25. 2019. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(03)73773-4

KRAUSE, K. M. et al. Effects of forage particle size and grain fermentability in midlactation cows. II. Ruminal pH and chewing activity. **Journal of Dairy Science**, v.85,p.1947–1957, 2002. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12214987>> Accessed: Oct, 27.2019. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(02)74271-9

KONDRATOVICH, L. B. et al. Effects of dietary exogenous fibrolytic enzymes on ruminal fermentation characteristics of beef steers fed high- and low-quality growing diets. **Journal of Animal Science**, v.97,p.3089–3102, 2019. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31095316>> Accessed: Jul, 30. 2019. DOI: 10.1093/jas/skz165.

MERTENS, D. R. Creating a system for meeting the requirements of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v80,p.1463–1481, 1997. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9241608>> Accessed: Jul, 15. 2019. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(97)76075-2

OH, J. et al. Effects of *Saccharomyces cerevisiae*-based direct-fed microbial and exogenous enzyme products on enteric methane emission and productivity in lactating dairy cows. **Journal of dairy science**, v.102,p.6065–6075, 2019. Available from: <[https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(19\)30374-1/fulltext](https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(19)30374-1/fulltext)> Accessed: Ago, 10. 2019. DOI: 10.3168/jds.2018-15753

PETERS, A. et al. Effect of exogenous fibrolytic enzymes on performance and blood profile in early and mid lactation cows. **Animal Nutrition**, v.1,p.229–238, 2015. Available from:<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405654515300202>> Accessed: Jul.15. 2019. Doi: 10.1016/j.aninu.2015.09.001

RAN, T. et al. Effects of a recombinant fibrolytic enzyme on fiber digestion, ruminal fermentation, nitrogen balance, and total tract digestibility of heifers fed a high forage diet. **Journal of animal science**, v. 97,p.3578-3587, 2019. Available from: <<https://academic.oup.com/jas/article/97/8/3578/5525078>> Accessed: Sep, 12. 2019
[DOI: 10.1093/jas/skz216](https://doi.org/10.1093/jas/skz216)

REFAT, B. et al. Effect of fibrolytic enzymes on lactational performance, feeding behavior, and digestibility in high-producing dairy cows fed a barley silage–based diet.

Journal of Dairy Science, v.101,p.1-9, 2018. Available from: <
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030218306040> : Accessed:
Ago, 3. 2019. DOI: 10.3168/jds.2017-14203

SILVA, T. H. et al. Effects of dietary fibrolytic enzymes on chewing time, ruminal fermentation, and performance of mid-lactating dairy cows. **Journal Animal Feed Science and Technology**, v.221,p.35-43, 2016. Available from: <
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037784011630503X> > Accessed:
Ago, 3. 2019. DOI:10.1016/j.anifeedsci.2016.08.013.

SILVA, J. et al. Feedlot performance, feeding behavior and rumen morphometrics of Nelore cattle submitted to different feeding frequencies. **Scientia Agricola**. v.75,p.121-128, 2018. Available from: <
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-90162018000200121>
Accessed: Ago, 4. 2019. DOI: 10.1590/1678-992x-2016-0335

SORIANI, N. et al. Relationships between rumination time, metabolic conditions, and health status in dairy cows during the transition period. **Journal of Dairy Science**, v.90,p.4544–4554, 2012. Available from: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23255819>> Accessed: Sep, 4. 2019. DOI:
10.2527/jas.2012-5064.

SUJANI, S.; SERESINHE, R. T. Exogenous enzymes in ruminant nutrition: A review. **Asian Journal of Animal Science**, v.93,p.85-99, 2015. Available from: <

<https://scialert.net/abstract/?doi=ajas.2015.85.99> > Accessed: Jul, 10. 2019 DOI: 10.3923/ajas.2015.85.99.

STEENSELS, M. et al. Towards practical application of sensors for monitoring animal health: the effect of post-calving health problems on rumination duration, activity and milk yield. **Journal of Dairy Research**, v.84,p.132–138, 2017. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28524016>> Accessed: Jul, 10. 2019. DOI: 10.1017/S0022029917000176.

USDA-UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Agricultural Statistics, 2017

VAN SOEST, P. J. et al. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and no starch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, v.74,p.3583-3597, 1991. Available from: <www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030291785512> Accessed: Ago, 20. 2019. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2.

ZILIO, E.M.C. et al. Effects of exogenous fibrolytic and amylolytic enzymes on ruminal fermentation and performance of mid-lactation dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.102,p.1–11, 2019. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30879828>> Accessed: Jul, 20. 2019 DOI: 10.3168/jds.2018-14949

6 Conclusão geral

A inclusão de enzimas fibrolíticas exógenas na dieta de vacas em lactação apresentou alterações no comportamento animal, aumentando a taxa de atividade destes animais e o número de acessos aos alimentadores. Além de causar incremento na produção de leite. As EFE apresentaram tendência a diminuição no tempo de ruminação o qual foi diminuído possivelmente pela ação das enzimas exógenas na degradação da parede celular das forragens ofertadas aos animais. A digestibilidade da dieta total não foi influenciada pelas EFE.

Referências bibliográficas

ABID, K.; JABRI, J. BECKERS, Y.; YAICH, H.; MALEK, A.; REKHIS, J.; KAMOUN, M. Influence of adding fibrolytic enzymes on the ruminal fermentation of date palm by-products. **Archives Animal Breeding**, 62,1-8, 2019.

ARRIOLA, K. G.; OLIVEIRA, A. S.; MA, X. Z.; LEAN, I. J.; GIURCANU, M. C.; ADESOGAN, A. T. A meta-analysis on the effect os dietary application of exogenous fibrolitic enzymes on the performance of dairy cow. **Journal of Dairy Science**, v. 100, p.1-15, 2017.

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, 832–841, 2011.

BAAH, J.; SHELFORD, J. A.; HRISTOV, A. N.; MCALLISTER, T. A.; CHENG, K. J. Effects of Tween 80 and fibrolytic enzymes on ruminal fermentation and digestibility of feeds in Holstein cows. **Asian- Australasian Journal of Animal Sciences**, vol. 18, no. 6, p.816– 824, 2005.

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

BEAUCHEMIN, K. A.; YANG, W. Z. AND RODE, L. M. Effects of barley grain processing on the site and extent of digestion of beef feedlot finishing diets. **Journal of Animal Science**, vol. 79, no. 7, pp. 1925–1936, 2001.

DEAN, D. B.; STAPLES, C. R.; LITTELL, R. C.; KIM, S.; ADESOGAN, A. T. Effect of method of adding a fibrolytic enzyme to dairy cow diets on feed intake digestibility, milk production, ruminal fermentation, and blood metabolite. **Animal Nutrition and Feed Technology**, vol. 13, no. 3, p.337–357, 2013.

EDMONSON, A. J.; LEAN, I. J.; WEAVER, L. D.; FARVER, T.; WEBSTER, G. A body condition scoring chart for Holstein Dairy cows. **Journal of Dairy Science**, 702 v.72, p. 68-78, 1989.

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

GIRALDO, L.A.; TEJIDO, RANILLA,M.J.; RAMOS, S.; CARRO, M.D. Influence of direct-fed fibrolytic enzymes on diet digestibility and ruminal activity in sheep fed a grass hay-based diet. **Journal Animal Science**, v. 86p. 1617–1623, 2008.

HOLTSHAUSEN, L., Y. H. CHUNG, H. GERARDO-CUERVO, M. OBA, AND K. A. BEAUCHEMIN. Improved milk production efficiency in early lactation dairy cattle with dietary addition of a developmental fibrolytic enzyme additive. **Journal of Dairy Science**. 94:899–90, 2011.

KOZLOSKI, G. B. Bioquímica dos ruminantes. Santa Maria: **Universidade Federal de Santa Maria**, 212p. 2016.

LEHNINGER, A. L., NELSON, D. L., COX, M. M. Lehninger **Principles of Biochemistry**. 6th ed. New York: Freeman, W. H. & Company, 1340 p. 2013.

LUNAGARIYA, P. M.; GUPTA, R. S.; SHAH, S. V.; PATEL, I. G. Digestibility of Nutrients as Influenced by Supplementation of Exogenous Fibrolytic Enzymes in Dry Non-pregnant Cows. **The Indian Journal of Veterinary Sciences and Biotechnology**, v. 14, n. 04, p. 45-48, 2019.

MARTINS, A.S.; VIEIRA, P.F.; BERCHIELLI, T.T.; PRADO, I.N.; MOLETTA, J.L. Consumo e digestibilidade aparente total em bovinos sob suplementação com enzimas fibrolíticas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.5, p.2118-2124, 2006.

MORENO, R.; PINOS, J. M.; GONZÁLEZ, S. Efecto de enzimas fibrolíticas exógenas en la degradación ruminal in vitro de dietas para vacas lecheras. *Interciencia*, vol. 32, no. 12, pp. 850– 853, 2007.

MURAD, H. A. AND AZZAZ, H. H. Cellulase and dairy animal feeding. *Biotechnology*, 9: 238-256, 2010.

NAGARAJA, T. G.; TITGEMEYER, E. C. Ruminal acidosis in beef cattle: the current microbiological and nutritional outlook. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, sup., p. E17-E38, 2007

OH, J.; HARPER, M. MELGAR, A.; COMPART, D. M. P.; HRISTOV, A. N. Effects of *Saccharomyces cerevisiae*-based direct-fed microbial and exogenous enzyme products on enteric methane emission and productivity in lactating dairy cows. **Journal of dairy science**, 102:6065–6075, 2019.

PALOHEIMO, M.; PIIRONEN, J.; VEHEMAANPERÄ, J. Xylanases and celulasas as Feed Additives. *Enzymes in Farn Nutricion*, v.2, p.12-54, 2010.

PETERS, A., M. ULRICH, AND S. DANICKE. Effect of exogenous fibrolytic enzymes on performance and blood profile in early and midlactation cows. **Animal Nutrition**. 1:229–238, 2015.

RAN, T.; SALEEM, A. M.; SHEN, Y.; RIBEIRO, G. O.; BEAUCHEMIN, K. A.; TSANG, A.; YANG, W.; MCALLISTER, T. A. Effects of a recombinant fibrolytic enzyme on fiber digestion, ruminal fermentation, nitrogen balance, and total

tract digestibility of heifers fed a high forage diet. **Journal of animal science**, v. 97, n. 8, p. 3578-3587, 2019.

SCHELLER, H .V. AND ULVSKOV, P. "Hemicelluloses," **Annual Review of Plant Biology**, vol. 61, no. 1, pp. 263–289, 2010.

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

SILVA, T. H., C. S. TAKIYA, T. H. A. VENDRAMINI, E. FERREIRA DE JESUS, F. ZANFERARI, AND F. P. RENNO. Effects of dietary fibrolytic enzymes on chewing time, ruminal fermentation, and performance of mid-lactating dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**. 221:35–43, 2016.

SUJANI, S.; SERESINHE, R. T. Exogenous enzymes in ruminant nutrition: A review. **Asian Journal of Animal Science**, v.93,p.85-99, 2015

TAIZ, L. AND ZEIGER, E. "Compuestos fenólicos," in *Fisiología Vegetal*, **Universitat Jaume I de Castellón, Castellon**, pp. 542–55. 7Spain, 2006.

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**. 82, 391–403, 1999.

WALDO, D.R.; JORGENSEN, N.S. Forages for high animal production: nutritional factors and effects of conservation. **Journal of Dairy Science**, v.64, n.6, p.1207-1229, 1981.