

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

USO DE ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS EXÓGENAS
EM ALIMENTOS PARA RUMINANTES

Autora: Erica Machado
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Lúcia Maria Zeoula
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Paula Toshimi Matumoto-Pintro

MARINGÁ
Estado do Paraná
Maio-2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

USO DE ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS EXÓGENAS
EM ALIMENTOS PARA RUMINANTES

Autora: Erica Machado

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Lúcia Maria Zeoula

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Paula Toshimi Matumoto-Pintro

Tese apresentada, como parte das exigências para a obtenção do título de DOUTORA EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá - Área de concentração Produção Animal.

MARINGÁ
Estado do Paraná
Maio-2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

Machado, Erica

M149u Uso de enzimas lignocelulolíticas exógenas em
alimentos para ruminantes/ . -- Maringá, 2017.
79 f. : il. , figs. , tabs.

Orientadora: Prof.a. Dr.a. Lúcia Maria Zeoula.
Coorientadora: Paula Toshimi Matumoto-Pintro.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de
Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia, 2017.

1. Enzimas lignocelulolíticas - Avaliação. 2.
Alimentos ricos em fibras. 3. Nutrição de
ruminantes. .I. Zeoula, Lúcia Maria, orient. II.
Matumoto-Pintro, Paula Toshimi, coorient. III.
Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências
Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia.
IV. Título.

CDD 22. ED.636.085
JLM000188



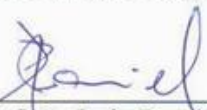
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**USO DE ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS EXÓGENAS
EM ALIMENTOS PARA RUMINANTES**

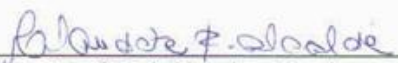
Autora: Erica Machado
Orientadora: Prof^ª Dr^ª Lúcia Maria Zeoula

TITULAÇÃO: Doutora em Zootecnia - Área de Concentração Produção
Animal

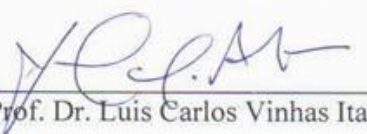
APROVADA em 03 de maio de 2017.



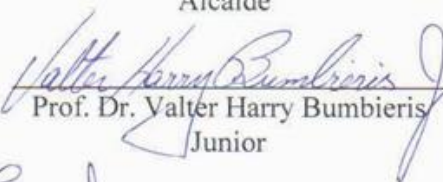
Prof. Dr. João Luiz Pratt Daniel



Prof^ª Dr^ª Claudete Regina
Alcalde



Prof. Dr. Luís Carlos Vinhas Itavo



Prof. Dr. Valter Harry Bumbieris
Junior



Prof^ª Dr^ª Lúcia Maria Zeoula
Orientadora

Tenho a impressão de ser uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.

Isaac Newton

À Minha avó materna, Palmira Bravo (*In Memoriam*) que sempre me apoiou e me deu os maiores ensinamentos que alguém poderia dar.

Aos

Meus pais, José Paulo Machado e Sílvia Helena Bravo Machado, que foram a base de tudo para mim, apoiando-me nos momentos difíceis, com força, confiança, amor, ensinando-me a persistir nos meus objetivos e ajudando-me a alcançá-los.

Às

Minhas irmãs Flávia Machado e Izabela Machado que são minha fortaleza.

Aos

Meus sobrinhos, Beatriz e Arthur por encherem minha vida de alegria.

Aos

Amigos e familiares pelas orações e apoio.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-Graduação, por viabilizar a realização deste projeto;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela bolsa de estudos;

À profa e orientadora Dra. Lúcia Maria Zeoula, pelo carinho, paciência, respeito, oportunidades, conselhos, ensinamentos, pela confiança no meu trabalho e, sobretudo, pela colaboração para o meu crescimento tanto pessoal quanto profissional ao longo desses 8 anos em que trabalhamos juntas.

À profa Paula Toshimi Matumoto Pinto, pela orientação, por toda ajuda, ensinamentos e conselhos que foram extremamente importantes para a execução deste projeto.

Às profas Sandra Maria Gomes da Costa e Kátia Regina Freitas Schwan-Estrada pela contribuição importantíssima no desenvolvimento deste projeto, especialmente na fase inicial.

Ao prof Clóves Cabreira Jobim, pelo empréstimo dos equipamentos e materiais para a confecção das silagens;

Ao prof Luís Carlos Vinhas Ítavo pela disponibilidade e pela realização das análises referentes aos parâmetros fermentativos *in vitro*;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia pelos conhecimentos repassados, pelos exemplos e pela dedicação;

Aos meus pais, José Paulo Machado e Sílvia Helena Bravo Machado, sem os quais nada disso seria possível, pelo apoio, incentivo, paciência, amor imenso, carinho, conforto e orações;

Às minhas irmãs, Flávia Machado e Izabela Machado pelo incentivo, companheirismo, amizade e confiança em mim depositada;

Aos meus sobrinhos, Beatriz Nasorri e Arthur Nasorri por renovarem minhas energias, sempre que necessário durante a realização deste trabalho e por serem minha fonte infinita de amor;

À minha grande amiga, Livia Domeneghetti, por todo apoio, pela amizade incondicional e por ter sido minha família durante todos esses anos;

Aos amigos e companheiros de pesquisa, Emerson Henri Yoshimura, Nadine Woruby Santos, Bruna Calvo Agostinho e Jessyca Caroline Rocha Ribas que foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho, muito obrigada por toda a ajuda, todas as risadas, todos os conselhos e ensinamentos, enfim, por tudo, sem vocês nada disso seria possível.

Às bolsistas e colegas de grupo de trabalho, Janaína, Mariana, Talita, Fernanda e Fábio pela agradável convivência, pela ajuda e pelos momentos agradáveis;

Ao colega Matheus Gonçalves Ribeiro por toda ajuda durante a confecção das silagens e pelas discussões sempre muito produtivas a respeito do assunto abordado na tese ;

Aos colegas de pós graduação pela breve, porém agradável convivência, pela troca de experiências, pelo aprendizado e pelos bons momentos compartilhados;

Aos funcionários do Laboratório de Alimentos e Nutrição Animal da Universidade Estadual de Maringá Osvaldo Tarelho Junior e Hermógenes Augusto de C. Neto;

Ao funcionário da secretaria da Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá, Denílson Vicentin, e Solange pelos serviços prestados;

E aos que não foram citados, mas que contribuíram de forma direta ou indireta para a conclusão de mais essa etapa e estão no meu coração.

Meus sinceros agradecimentos!

BIOGRAFIA

ERICA MACHADO, filha de José Paulo Machado e Sílvia Helena Bravo Machado, nasceu em Ariranha, São Paulo, no dia 27 de janeiro de 1987.

No ano de 2007, iniciou o Curso de Graduação em Zootecnia, na Universidade Estadual de Maringá.

Em dezembro de 2011, cumpriu as exigências para obtenção do título de “zootecnista” pela mesma instituição.

Em 2012, iniciou o curso de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá, em nível de Mestrado, área de concentração Produção Animal, realizando estudos na sub-área de Nutrição de ruminantes.

Em março de 2014, cumpriu as exigências para obtenção do título de “MESTRE EM ZOOTECNIA” pela mesma instituição.

Em 2014, iniciou o curso de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá, em nível de Doutorado, área de concentração Produção Animal, realizando estudos na sub-área de Nutrição de ruminantes.

Em Janeiro de 2017, submeteu-se à banca examinadora para o exame geral de qualificação da presente tese.

Em Maio de 2017, submete-se à banca examinadora para a defesa da presente tese.

ÍNDICE

| | Página |
|---|--------|
| LISTA DE TABELAS | ix |
| RESUMO | xi |
| ABSTRACT | xiii |
| INTRODUÇÃO | 15 |
| REFERÊNCIAS | 28 |
| OBJETIVOS GERAIS | 32 |
| CAPÍTULO II | 33 |
| CAPÍTULO III..... | 61 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 79 |
| CAPÍTULO II – Redução da lignina e aumento da capacidade antioxidante em silagens de milho e de cana-de-açúcar tratadas com complexo enzimático produzido pelo fungo da podridão branca | |
| Resumo | 34 |
| Introdução | 35 |
| Material e métodos | 36 |
| Resultados | 42 |
| Discussão | 46 |
| Conclusões | 50 |
| Referências | 51 |
| CAPÍTULO III – Efeito da ação de enzimas lignocelulolíticas provenientes do fungo da podridão branca em fontes de alimentos ricos em fibra | |
| Resumo | 62 |
| Introdução | 63 |
| Material e métodos | 64 |

| | |
|-------------------|----|
| Resultados | 68 |
| Discussão | 71 |
| Conclusões | 74 |
| Referências | 75 |

LISTA DE TABELAS

CAPITULO II

- TABELA 1. Composição do complexo de enzimas (% em relação às 6 enzimas avaliadas) produzido pelo fungo da podridão branca utilizadas nas silagens.....53
- TABELA 2. Recuperação das frações (%) dos carboidratos das silagens tratadas com complexo enzimático lignocelulolítico.....54
- TABELA 3. Composição química e fracionamento dos carboidratos da silagem de milho (g.kg^{-1}) tratada com complexo enzimático lignocelulolítico.....55
- TABELA 4. Composição química (g.kg^{-1}) e fracionamento dos carboidratos da silagem de cana de açúcar tratada com complexo enzimático lignocelulolítico.....56
- TABELA 5. Composição monomérica da lignina ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de parede celular isenta de proteína) das silagens de milho e cana-de-açúcar tratadas com complexo enzimático lignocelulolítico.57
- TABELA 6. Digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e da fibra em detergente neutro (DIVFDN) das silagens tratadas com complexo enzimático lignocelulolítico (g.kg^{-1} MS).....58
- TABELA 7. Produção cumulativa de gases *in vitro* das silagens tratadas com complexo enzimático lignocelulolítico.....59
- TABELA 8. Polifenóis, flavonóides, capacidade antioxidante e poder redutor de silagens tratadas com complexo enzimático lignocelulolítico.....60

CAPITULO III

- Tabela 1. Teores de fibra em detergente neutro e fibra em detergente ácido de silagem de milho e feno de coast cross tratados com 20 mg.kg^{-1} MN de um composto de enzimas lignocelulolíticas produzidas pelo fungo da podridão branca, durante 30, 60 e 120 minutos.....65

- Tabela 2. Composição química, fracionamento dos carboidratos e digestibilidade da matéria seca (DIVMS) e da fibra em detergente neutro (DIVFDN), expressos em g.kg^{-1} , da silagem de milho pré tratada com enzimas lignocelulolíticas produzidas pelo fungo da podridão branca.....68
- Tabela 3. Composição química, fracionamento dos carboidratos e digestibilidade da matéria seca (DIVMS) e da fibra em detergente neutro (DIVFDN), expressos em g.kg^{-1} , da cana-de-açúcar pré tratada com enzimas lignocelulolíticas produzidas pelo fungo da podridão branca.....69
- Tabela 4. Composição química, fracionamento dos carboidratos e digestibilidade da matéria seca (DIVMS) e da fibra em detergente neutro (DIVFDN), expressos em g.kg^{-1} , do feno de coast cross pré tratado com enzimas lignocelulolíticas produzidas pelo fungo da podridão branca.....70
- Tabela 5. Composição química, fracionamento dos carboidratos e digestibilidade da matéria seca (DIVMS) e da fibra em detergente neutro (DIVFDN), expressos em g.kg^{-1} , da palha de arroz pré tratada com enzimas lignocelulolíticas produzidas pelo fungo da podridão branca.....71

RESUMO

Após a produção do complexo enzimático lignocelulolítico a partir do crescimento de fungos da podridão branca em meio contendo feno de coast-cross durante 12 dias foram realizados dois estudos experimentais. Sendo que, no primeiro experimento, avaliou-se a ação do complexo enzimático em material fermentado e no segundo avaliou-se a adição do complexo enzimático em fontes de alimentos ricos em fibras, simulando um pré tratamento antes de fornecer os alimentos aos animais. No primeiro ensaio avaliou-se a ação do complexo enzimático, em concentrações crescentes (0, 10, 20 e 30 mg.kg⁻¹ MN) sobre a composição química, digestibilidade *in vitro*, parâmetros fermentativos *in vitro* e compostos antioxidantes das silagens de milho e de cana-de-açúcar. O milho e a cana-de-açúcar foram picados tratados com o complexo enzimático e acondicionado em sacos plásticos selados à vácuo. Após 60 dias os mini silos foram abertos e as amostras foram secas em estufa de ventilação forçada a 55°C para análise dos parâmetros propostos. Houve efeito da adição das enzimas sobre as forragens avaliadas, em que, a melhor concentração foi, em média, 20 mg.kg⁻¹ MN para a silagem de milho, e 10 mg.kg⁻¹ MN para a silagem de cana-de-açúcar. Na silagem de milho verificou-se redução linear na concentração de lignina, redução de 27% na concentração de hemicelulose e diminuição de 6% no teor de celulose em relação ao tratamento controle. Na silagem de cana-de-açúcar verificou-se redução de 12% na concentração de lignina, redução linear no teor de hemicelulose e diminuição de 8% na concentração de celulose. Os monômeros da lignina também responderam à adição do complexo enzimático com aumentos lineares para a

razão siringil:guaiacil. Estas alterações da composição química da parede celular refletiram em aumentos significativos nas concentrações dos carboidratos não fibrosos. Foi verificado aumento de 7% na DIVMS na DIVFDN e aumentos de 30% na produção de gases para ambas as silagens. Os compostos fenólicos e a capacidade antioxidante aumentaram linearmente com a adição das enzimas nas silagens, com destaque para a silagem de milho que, na concentração de 20 mg.kg^{-1} MN, verificou-se um aumento de 56% na capacidade antioxidante em relação ao controle. Portanto, a adição das enzimas lignocelulolíticas nas silagens ocasionou melhorias na DIVMS e DIVFDN, bem como nos parâmetros fermentativos *in vitro* além do efeito adicional na capacidade antioxidante. No segundo ensaio, objetivou-se avaliar o efeito da adição do complexo enzimático lignocelulolítico em alimentos ricos em fibras, com a intenção de simular um pré tratamento dos alimentos antes de fornecê-los aos animais. Foram utilizadas silagem da planta inteira de milho, cana de açúcar integral, feno de coast cross e palha de arroz tratadas com o equivalente a 20 mg.kg^{-1} de matéria natural (MN) de um complexo enzimático lignocelulolítico. O complexo enzimático ficou em contato com as amostras moídas a 1 mm durante 30 minutos e posteriormente foram realizadas as análises químicas e os ensaios *in vitro* para determinação da digestibilidade da matéria seca (DIVMS) e da fibra em detergente neutro (DIVFDN). O tratamento enzimático não alterou os teores de MS, MO, PB, EE, CT e a fração B2 dos carboidratos presentes na parede celular em nenhum dos alimentos avaliados. Entretanto, em todos os alimentos, houve diminuição significativa ($P < 0,05$) nos teores de FDN, FDA, lignina, celulose e na fração C (indisponível) dos carboidratos. Aumentos significativos nos teores de hemicelulose, nos carboidratos não fibrosos e na fração A+B1 dos carboidratos (solúveis) foram registrados. A adição do complexo enzimático lignocelulolítico por 30 minutos sobre os alimentos aumentou a DIVMS e a DIVFDN de todas as fontes de fibras testadas. Assim, recomenda-se a utilização do complexo enzimático para melhorar a qualidade dos alimentos, tanto fermentados quanto *in natura*. Uma vez que houve melhorias, especialmente, na fração fibrosa, com redução significativa da lignina e aumento da digestibilidade *in vitro* em todos os alimentos avaliados.

Palavras-chave: Celulase, Digestibilidade, Lacase, Lignina Peroxidase, Mananase, Xilanase

ABSTRACT

After the production of the lignocellulolytic enzyme complex from the growth of fungi of the white rot in medium containing coast-cross hay for 12 days two experimental studies were carried out. In the first experiment, the enzyme complex was evaluated in fermented material and in the second, the addition of the enzyme complex was evaluated in sources of fiber-rich foods, simulating a pre-treatment before feeding the animals. In the first experiment the enzymatic activity was evaluated in increasing concentrations (0, 10, 20 and 30 mg.kg⁻¹ NM) on the chemical composition, in vitro digestibility, in vitro fermentative parameters and antioxidant compounds of maize silages and sugarcane. Corn and sugarcane were minced treated with the enzymatic complex and packed in vacuum-sealed plastic bags. After 60 days the mini silos were opened and the samples were dried in a forced ventilation oven at 55°C for analysis of the proposed parameters. There was an effect of the addition of the enzymes on the evaluated fodder, where the best concentration was, on average, 20 mg.kg⁻¹ NM for corn silage, and 10 mg.kg⁻¹ NM for sugarcane silage. In the corn silage there was a linear reduction in the lignin concentration, a reduction of 27% in the hemicellulose concentration and a 6% decrease in the cellulose content in relation to the control treatment. In the sugarcane silage, there was a 12% reduction in lignin concentration, a linear reduction in the hemicellulose content and a decrease of 8% in the cellulose concentration. The lignin monomers also responded to the addition of the enzyme complex with linear increases for the syringyl: guaiacil ratio. These changes in the chemical composition of the cell wall reflected significant increases in the concentrations of non-fibrous carbohydrates. There was a 7% increase in IVDDM in IVNDF and a 30% increase in gas production for both silages. The phenolic compounds and the antioxidant capacity increased linearly with the addition of the enzymes in the

silages, especially corn silage, which showed a 56% increase in antioxidant capacity in the concentration of 20 mg.kg⁻¹ MN to control. Therefore, the addition of lignocellulolytic enzymes in silages resulted in improvements in IVDDM and IVNDF, as well as in *in vitro* fermentation parameters, besides the additional effect on antioxidant capacity. In the second assay, the objective of this study was to evaluate the effect of the addition of the lignocellulolytic enzyme complex on fiber-rich foods, with the intention of simulating a pre-treatment of the food before supplying it to the animals. Whole plant silage of corn, whole sugarcane, coast cross hay and rice straw treated with the equivalent of 20 mg.kg⁻¹ of natural matter (NM) of a lignocellulolytic enzyme complex were used. The enzyme complex was in contact with the samples ground at 1 mm for 30 minutes and the chemical analyzes and the *in vitro* tests were carried out to determine dry matter digestibility (IVDDM) and neutral detergent fiber (IVNDF). The enzymatic treatment did not alter the contents of DM, OM, CP, EE, TC and the B2 fraction of the carbohydrates present in the cell wall in any of the evaluated foods. However, in all foods, there was a significant decrease ($P < 0.05$) in the contents of NDF, ADF, lignin, cellulose and the C fraction (unavailable) of carbohydrates. Significant increases in hemicellulose, non-fibrous carbohydrate and A + B1 fractions of the carbohydrates (soluble) were recorded. Addition of the lignocellulolytic enzyme complex for 30 minutes over food increased the IVDDM and the IVNDF of all fiber sources tested. Thus, it is recommended to use the enzymatic complex to improve the quality of the food, both fermented and *in natura*. Since there were improvements, especially in the fibrous fraction, with significant reduction of lignin and increase in *in vitro* digestibility in all evaluated foods.

Key words: Cellulase, Digestibility, Lacase, Lignin Peroxidase, Mannase, Xylanase, Mannase, Xylanase

1 I. INTRODUÇÃO

2 O aproveitamento da fração fibrosa dos alimentos pelos ruminantes está relacionado
3 à capacidade que os microrganismos do rúmen têm de sintetizar e secretar enzimas que
4 hidrolisam a parede celular das plantas (Martins et al., 2006).

5 Entretanto, em dietas com alto teor de fibra, o aproveitamento dos alimentos tem
6 sido pouco eficiente (Varga and Kolver, 1997). Uma das soluções encontradas para
7 tentar resolver parte desse problema é a utilização de enzimas fibrolíticas exógenas na
8 alimentação de ruminantes, especialmente, em materiais ensilados.

9 A maioria das enzimas usadas como aditivos é subproduto ou extrato fermentativo
10 microbiano (*Bacillus spp*) ou fúngico (*Trichoderma sp* e *Aspergillus sp*) que possui um
11 ou vários tipos de atividade enzimática; Os fungos de podridão branca, além de
12 degradarem celulose e hemicelulose, também possuem a capacidade de degradarem a
13 lignina. A lignina promove uma barreira física contra a entrada de microrganismos
14 devido à sua estreita relação com a celulose e hemicelulose (Boudet, 2007) e pode
15 causar uma limitação na digestão dos polissacarídeos.

16 Assim, o entendimento do efeito de enzimas associadas a alimentos fibrosos se faz
17 necessário a fim de obter novas fontes de enzimas fibrolíticas, principalmente, com ação
18 sobre a lignina.

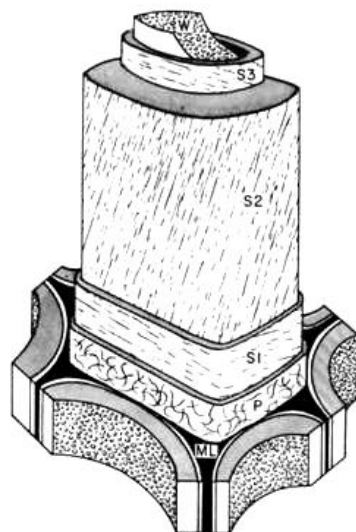
19 *Parede celular vegetal*

20
21 A parede celular vegetal consiste em uma estrutura muito bem organizada, forte
22 e possui uma rigidez quase impenetrável (Scheller e Ulvskov, 2010), além disso, é
23 importante para a estrutura e proteção da planta e dos tecidos (Doblin *et al.*, 2010). É
24 composta basicamente por polissacarídeos, proteínas e alguns compostos como a lignina
25 (Scheller e Ulvskov, 2010), e as concentrações desses compostos variam de acordo com
26 a espécie, tipo, idade e região na parede celular. Além disso, a parede celular apresenta,
27 basicamente, dois tipos de parede: primária e secundária.

28 As paredes primárias são mais finas (menos de 1µm) e caracterizam células em
29 crescimento. A união da parede celular de uma célula à parede de outra célula adjacente
30 é realizada por uma camada conhecida por lamela média, composta, principalmente, de
31 substâncias pécticas. Já as paredes secundárias são mais espessas e resistentes que as
32 primárias, se desenvolvem internamente a essas e são depositadas quando parte do
33 crescimento já está concluído. Além disso, são mais rígidas que as paredes primárias

34 por causa da presença da lignina (Taiz e Zeiger, 2006), e possui 3 camadas: S1, S2 e S3
 35 (figura 1) que se diferenciam pela orientação das microfibrilas de celulose.

36
 37



38

39 Figura 1. Estrutura da parede celular (Sjostrom, 1993). P: parede primária; S1,
 40 S2 e S3: Camadas da parede secundária segundo a orientação das microfibrilas da
 41 celulose; W: camada interna denominada de camada verrugosa; ML: Lamela Media.

42

43 A camada mais externa (S1) e a interna (S3) possuem microfibrilas orientadas
 44 transversalmente; a camada intermédia (S2) é mais grossa que as outras duas e
 45 apresenta microfibrilas orientadas longitudinalmente em relação ao comprimento da
 46 célula. Estas orientações proporcionam à célula grande resistência à tensão e à
 47 compressão (Fengel e Wegener, 1984).

48 Geralmente, S3 e a parte interior de S2 têm um conteúdo em celulose mais
 49 elevado. Enquanto S1 e a camada exterior de S2 são relativamente ricas em
 50 hemiceluloses. Os tipos celulares que apresentam parede secundária se lignificam em
 51 maior ou menor grau (Wilson, 1994), e isso tem grande influência na digestibilidade dos
 52 alimentos pelos animais.

53

54 *Celulose*

55 A celulose é o composto orgânico mais abundante na natureza, na célula vegetal
 56 possui função estrutural, sendo um componente importante da parede celular. É um
 57 polímero linear de moléculas de D-glicose unidas por ligações glicosídicas β (1-4). As
 58 moléculas de celulose estão interligadas por meio de pontes de hidrogênio entre grupos

59 OH, que é responsável pela rigidez das cadeias unitárias, ou entre moléculas adjacentes
60 que são responsáveis pela estrutura supramolecular.

61 A celulose apresenta regiões cristalinas, que são altamente ordenadas,
62 intermediadas por regiões amorfas, que são menos ordenadas. Assim, as regiões
63 amorfas são mais acessíveis ao ataque de reagentes, enzimas e a absorção da água
64 (Kadla e Gilbert, 2000). O índice de cristalinidade da celulose, definido pela proporção
65 de regiões cristalina e amorfa, em conjunto com a orientação desses domínios nas
66 fibras, afetam as propriedades mecânicas das fibras de celulose (Hu e Hsieh, 2001)

67

68 *Hemicelulose*

69 As hemiceluloses estão entre os principais constituintes dos materiais
70 lignocelulósicos. São componentes estruturais importantes que possuem íntima
71 associação com a lignina e a celulose, e interagem covalentemente com a pectina.
72 Também, constituem um grupo de polissacarídeos heterogêneos altamente ramificados,
73 cuja sua classificação é feita de acordo com o açúcar presente em sua molécula.

74 Quimicamente, os polímeros das hemiceluloses são polissacarídeos
75 heterogêneos formados por vários resíduos de açúcares: pentoses (D-xilose, L-
76 arabinose), hexoses (D-galactose, L-galactose, D-manose, L-raminose, L-fucose) e
77 ácidos urônicos (ácido D-galacturônico) (Hendriks e Zeeman, 2009).

78 A xilana, que é o principal polissacarídeo presente na hemicelulose, é um
79 homopolímero linear formado por monômeros de β -D-xilopiranosil unidos por ligações
80 glicosídicas β -1,4 (Wu *et al.*, 2008). São encontradas principalmente na parede celular
81 secundária dos vegetais associada à celulose por meio de fortes interações estabelecidas
82 por pontes de hidrogênio e forças de van der Waal. Devido a sua estrutura heterogênea,
83 a degradação da xilana requer a ação de várias enzimas, ou seja, de um sistema
84 enzimático que se encontra presente em fungos e bactérias.

85

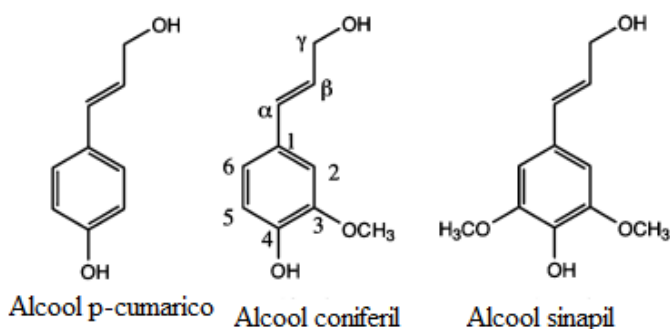
86 *Lignina*

87 A lignina é um polímero fenólico altamente complexo, que confere rigidez às
88 plantas, fornece resistência contra fitopatógenos e estresse oxidativo (Hendriks e
89 Zeeman, 2009). É considerada uma macromolécula amorfa, resultado da condensação

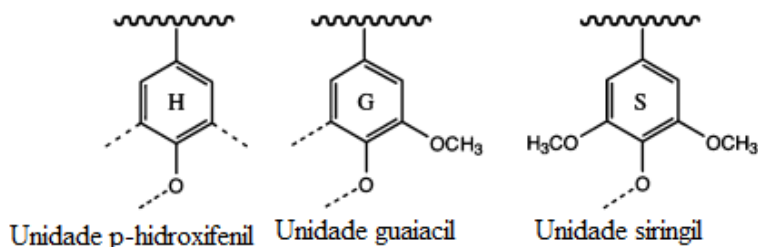
90 de unidades fenilpropanóides (álcool coniferílico, álcool sinapílico e álcool p-
91 cumarílico) derivadas do aminoácido fenilalanina.

92 Esses alcoóis que dão origem à lignina se diferem entre si pelo grau de
93 metoxilação. Quando são incorporados ao polímero de lignina, produzem,
94 respectivamente, as unidades p-hidroxifenil (H) que possui radical metoxi (OCH₃),
95 guaiacil (G), que possui 1 radical metoxi e siringil (S), que possui 2 radicais metoxi
96 (Boerjan *et al.*, 2003), como mostra a figura 2.

Monômeros primários da lignina



Unidades estruturais correspondentes



97

98 Figura 2. Monômeros primários da lignina e suas unidades correspondentes
99 (Wong, 2009).

100

101 O processo de lignificação tem início durante a formação da lamela média e da
102 parede primária, em seguida, atinge a parede secundária com maior intensidade e se dá
103 pela junção e combinação dos monolignóis (álcoois p-coumaril, coniferil e sinapil). A
104 mediação dessas junções é realizada por oxidases da parede celular, que transformam
105 estes monolignóis em radicais livres. As oxidases que atuam na lignificação podem ser
106 independentes (lacases) ou dependentes (peroxidases) de H₂O₂ (Karlsson *et al.*, 2005).
107 As peroxidases catalisam a oxidação dos monolignóis, utilizando o H₂O₂ como aceptor

108 de elétrons (Chen *et al.*, 2002), isso sugere que a formação da lignina pode ser induzida
109 pelo suprimento de H₂O₂.

110 No processo de biossíntese da lignina, os radicais se unem e formam uma única
111 molécula em cada espécie vegetal. A lignina presente nas madeiras contém,
112 basicamente, unidades guaiacil e siringil. Já a lignina de plantas herbáceas contém as 3
113 unidades: guaiacil, siringil e ρ -hidroxifenil (Buranov e Mazza, 2008).

114 As forragens contém a lignina core e não core. A lignina core consiste em áreas
115 altamente condensadas e mais resistentes a degradação dos compostos fenólicos que
116 podem ser extraídos da amostra e é composta por unidades p-hidroxifenila (H),
117 guaiacila (G) e siringila (S) (Jung, 1989). A lignina não core é representada por ácidos
118 p-hidroxicinâmico éster-ligados e é composta por compostos fenólicos de baixo peso
119 molecular e que são liberados da parede celular por meio de hidrólise (Saliba *et al.*,
120 2001).

121 No processo de digestão da parede celular pelos microrganismos presentes no
122 rúmen, a lignina é considerada um fator limitante, pois age como uma barreira física,
123 principalmente em forragens de clima tropical, que apresentam grandes quantidades de
124 parede celular e menores teores de proteínas, diminuindo a digestibilidade.

125 A lignificação da parede celular pode limitar a digestão dos polissacarídeos por
126 meio de três possíveis mecanismos: 1) efeito tóxico de componentes da lignina (ácido
127 coumárico, p-cumarico) aos microrganismos do rúmen; 2) impedimento físico causado
128 pela ligação lignina-polissacarídeo, que limita o acesso das enzimas fibrolíticas ao
129 centro de reação de um carboidrato específico; e 3) limitação da ação de enzimas
130 hidrofílicas causada pela hidrofobicidade criada pelos polímeros de lignina (Hatfield,
131 1993).

132

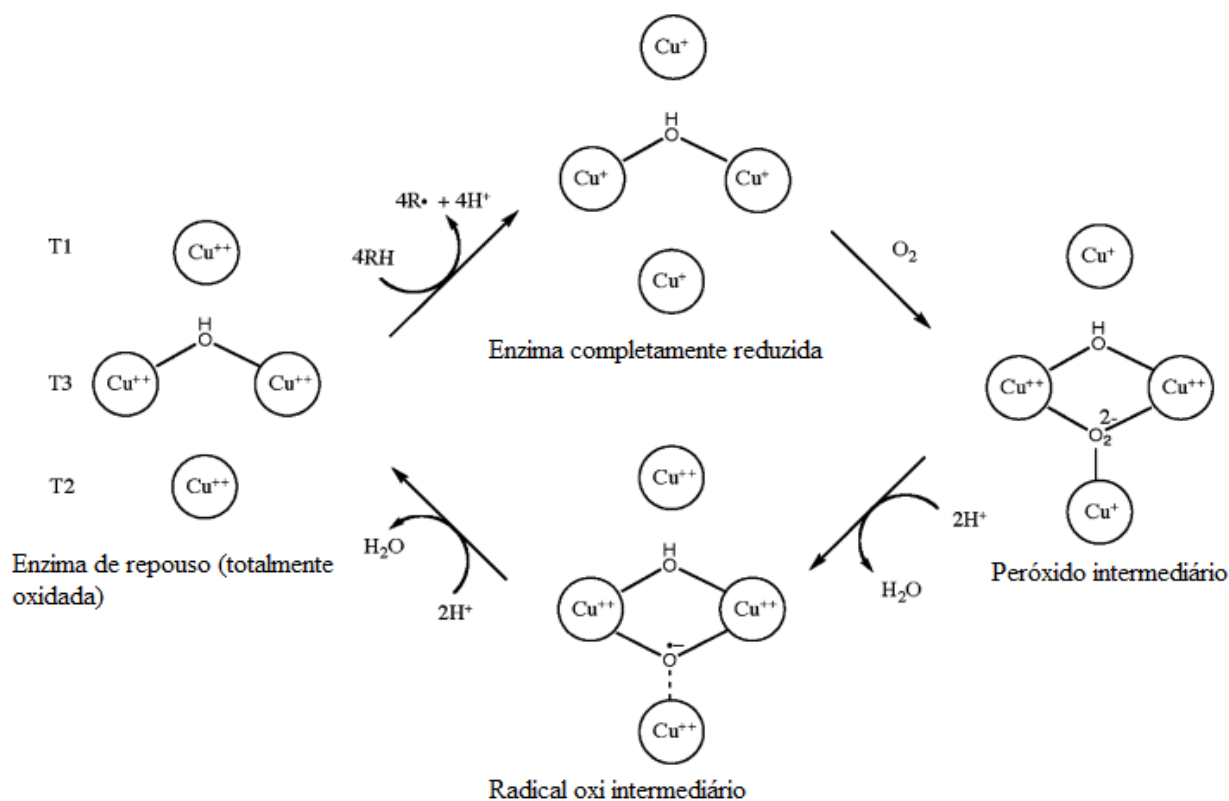
133 *Enzimas lignofibrolíticas*

134 *Lacase*

135 As lacases são definidas como glicoproteínas polifenoloxidasas que possuem
136 quatro átomos de cobre (Cu) no seu sítio ativo, classificados em três tipos (um átomo de
137 cobre T1, um T2 e dois átomos T3) de acordo com suas diferentes propriedades e
138 características específicas (Wong, 2009). Além disso, as lacases podem atuar
139 diretamente sobre estruturas fenólicas, oxidando-as pela abstração de um elétron
140 associada à redução de Cu⁺² em Cu⁺. A enzima retorna à sua forma nativa (Cu⁺²)

141 promovendo a redução de O_2 em H_2O por meio de sucessivas oxidações no substrato
 142 (Wong, 2009).

143 O ciclo catalítico das lacases, como demonstrado na figura 3, se inicia com a
 144 redução do substrato redutor pelo cobre (Cu^{2+} para Cu^+), em T1, que é o acceptor
 145 primário de elétrons. Posteriormente, os elétrons extraídos são transferidos para o sítio
 146 trinuclear T2 / T3, convertendo a enzima totalmente oxidada (em repouso) em um
 147 estado totalmente reduzido (Huang *et al.*, 1999). A estequiometria é de quatro
 148 moléculas de substrato redutor para cada oxigênio molecular, envolvendo uma
 149 transferência total de quatro elétrons [$4 RH + O_2 \rightarrow 4R + 2H_2O$].



153 Figura 3. Ciclo catalítico da lacase (Wong, 2009).

154 As lacases são encontradas, principalmente nos vegetais e em alguns
 155 microrganismos, especialmente nos fungos filamentosos causadores da podridão branca,
 156 em que são sintetizadas formas induzíveis e/ ou constitutivas das enzimas e estão
 envolvidas, principalmente, na degradação da lignina (Wong, 2009).

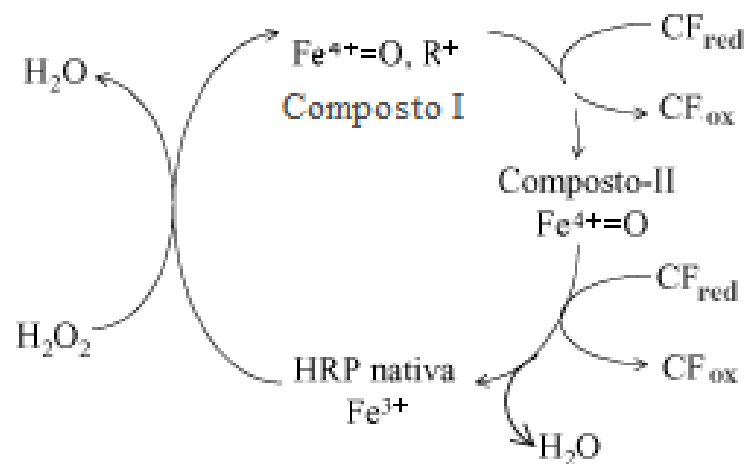
157 Com relação aos compostos fenólicos, as oxidações resultantes da atividade das
 158 lacases podem ocorrer diretamente, através da interação entre enzima e substrato. Porém
 159 quando se trata de compostos aromáticos não fenólicos, devido ao seu baixo potencial
 160 de oxidorredução, estas enzimas são incapazes de atuar diretamente sobre eles, sendo

161 necessário que haja molécula mediadora para que ocorra a degradação destes compostos
 162 (Baldrian, 2006).

163 *Lignina peroxidase*

164 A lignina peroxidase (LiP) é uma enzima muito importante no sistema de
 165 degradação da lignina devido à sua grande capacidade de oxidar os compostos
 166 aromáticos não fenólicos, que corresponde até 85% da molécula de lignina.

167 Durante o ciclo catalítico (figura 4), o Fe contido no grupo heme da LiP passa
 168 por diferentes estados de oxidoredução . Primeiramente, o Fe^{3+} contido no sítio ativo da
 169 enzima é oxidado a Fe^{4+} , pela ação do H_2O_2 , formando o composto I, que é um
 170 composto intermediário, contendo 2 elétrons oxidados. O composto I, oxida o álcool
 171 veratrílico ou outro substrato, gerando um radical livre e o Composto II, cujo ferro
 172 ainda está presente como Fe^{4+} . Finalmente, a enzima completa seu ciclo catalítico,
 173 retornando a sua forma nativa, ao oxidar um substrato e originar outro radical livre
 174 (Hammel e Cullen, 2008).



175

176 Figura 4. Ciclo catalítico da enzima lignina peroxidase (Rosatto *et al.*, 2001).

177

178 Na ausência do substrato redutor, que neste caso, pode ser o álcool veratrílico, o
 179 composto II é oxidado pelo H_2O_2 para o composto III, uma forma da LiP que tem uma
 180 capacidade catalítica limitada na presença de H_2O_2 em excesso (Wong, 2009).

181

182

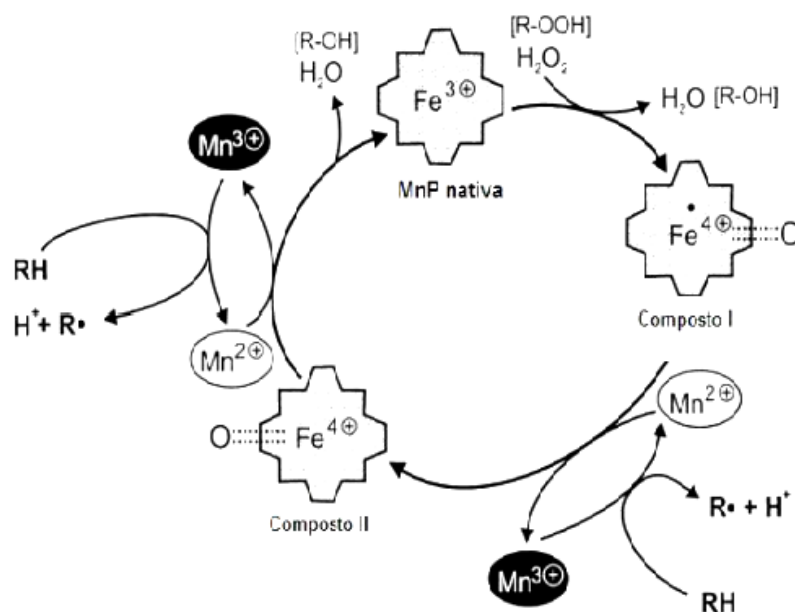
183

184

185 *Manganês peroxidase*

186 A manganês peroxidase (MnP) é uma enzima extracelular que tem como
 187 substrato redutor o Mn^{+2} , que é oxidado a Mn^{+3} e oxida estruturas fenólicas a radicais
 188 fenoxi (Valli *et al.*, 1990). É uma glicoproteína que depende do peróxido de hidrogênio
 189 e da disponibilidade de íons de manganês para oxidar a lignina. A MnP possui a
 190 capacidade de oxidar grande quantidade de compostos de lignina agindo,
 191 principalmente, em compostos fenólicos, embora a oxidação de substratos não fenólicos
 192 tenha sido verificada durante o processo conhecido como peroxidação lipídica (Wariishi
 193 *et al.*, 1992).

194 O ciclo catalítico das MnPs, como demonstrado na figura 5, é semelhante ao das
 195 LiPs e inicia-se com a sua oxidação por H_2O_2 ou peróxidos orgânicos, que levam a
 196 enzima à um estado de oxidação deficiente em dois elétrons denominado composto I. A
 197 redução da enzima até a forma nativa ocorre através de dois passos sucessivos, por meio
 198 da formação de um intermediário denominado composto II. Enquanto o composto I
 199 pode ser convertido em composto II tanto na presença de Mn^{2+} quanto de outros
 200 doadores de elétrons com potencial redox apropriado, a conversão do composto II até a
 201 enzima nativa ocorre somente na presença de Mn^{2+} . Além disso, elevadas concentrações
 202 de H_2O_2 podem inativar reversivelmente a enzima através da formação de outro
 203 intermediário denominado composto III (Hammel e Cullen, 2008).



204

205 Figura 5. Ciclo catalítico das peroxidases dependentes de manganês (Hofrichter, 2002).

206 A atuação da MnP na degradação da lignina esta ligada diretamente a ação de
207 mediadores de baixa massa, entre os quais Mn^{3+} que age diretamente sobre estruturas
208 fenólicas. Porém, essas enzimas também possuem ação em um sistema baseado na
209 mediação por ácidos graxos insaturados, que pela geração de radicais intermediários
210 reativos (radicais peroxil) têm sido relacionados com a degradação de estruturas não
211 fenólicas (Hammel e Cullen, 2008).

212

213 *Celulases*

214 As celulases são produzidas por um grande número de fungos, principalmente
215 ascomicetos e basidiomicetos. O sistema enzimático das celulases é constituído de um
216 conjunto de hidrolases glicosídicas, que envolvem três tipos de enzimas:
217 endoglucanases, exoglucanases e β -1,4-glucosidase que atuam na hidrólise de celulose
218 (Zhang *et al.*, 2004).

219 As regiões de menor organização das microfibrilas da celulose são os locais de
220 ação de endoglucanases. Como resultado, diminui a polimerização das microfibrilas,
221 disponibilizando mais substratos para ação das exoglucanases (Beauchemin *et al.*,
222 2004). Em geral, endoglucanases hidrolisam aleatoriamente as cadeias de celulose,
223 produzindo oligômeros de celulose de vários graus de polimerização. As exoglucanases
224 hidrolisam a cadeia de celulose a partir da extremidade não redutora para produzir
225 celobiose. E, por fim, as β -glucosidases liberam glicose a partir da celobiose e
226 hidrolizam cadeias curtas de celoligossacarídeos a partir de extremidades redutoras ou
227 não (Beauchemin *et al.*, 2004).

228 As celulases são inibidas na presença de altas concentrações de seus produtos de
229 hidrólise, endo e exoglucanases são geralmente inibidas pela celobiose e β -glucosidases
230 são inibidas pela glicose (Paloheimo *et al.*, 2010).

231

232 *Hemicelulases*

233 A hemicelulose, devido à sua natureza amorfa e por ser um polímero menor, é
234 mais fácil de ser degradada que a celulose. Entretanto, sua estrutura ramificada e
235 variável necessita de um sistema enzimático específico para sua completa degradação
236 (Shallom e Shoham, 2003).

237 A classificação das hemicelulases é feita de acordo com o seu modo de ação em
238 diferentes substratos. Sendo as endoxilanases, responsáveis pela clivagem de ligações
239 glicosídicas internas da cadeia principal da xilana, que diminui o grau de polimerização
240 do substrato e produz xilooligômeros e xilobiose que, por sua vez, são hidrolisados por
241 β -xilosidases, liberando xilose a partir da extremidade não redutora (Alves-Prado *et al.*,
242 2010).

243

244 *Enzimas fibrolíticas na alimentação animal*

245 Algumas espécies forrageiras apresentam baixo teor de açúcares, como é o caso
246 de algumas leguminosas e gramíneas, e, para solucionar esse problema, na confecção de
247 silagens, a utilização de enzimas fibrolíticas pode ser uma alternativa para aumentar a
248 quantidade de carboidratos solúveis (Beauchemin *et al.*, 1995). Porém, em espécies
249 ricas em açúcares, como por exemplo, o milho, a adição dessas enzimas pode ter efeito
250 negativo, pois o excesso de açúcares pode estimular a produção de álcool por leveduras,
251 comprometendo a qualidade da silagem e aumentando as perdas (Beauchemin *et al.*,
252 1995).

253 Desde o final da década de 1960, estudos vêm sendo realizados com o uso de
254 enzimas fibrolíticas exógenas na ensilagem, com o objetivo de melhorar o processo
255 fermentativo das forrageiras ensiladas e melhorar a eficiência produtiva dos ruminantes
256 (Beauchemin *et al.*, 2004). A adição de enzimas fibrolíticas na nutrição de ruminantes
257 tem sido proposta como uma estratégia para melhorar a disponibilidade do substrato e
258 contribuir para o aumento da fermentação láctica da silagem, bem como aumentar seu
259 valor nutritivo (Loures *et al.*, 2005).

260 Foi observado aumento da digestibilidade da forragem quando utilizou-se uma
261 mistura de enzimas fibrolíticas comerciais (Jalilvand *et al.*, 2008). Entretanto, a
262 utilização de inoculante enzimático-bacteriano (hemicelulase, celulase e amilase e cepas
263 tropicalizadas de *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium* e *Pediococcus spp*),
264 em capins Tanzânia e Mombaça não proporcionaram melhores características
265 qualitativas, fermentativas e nutricionais das silagens avaliadas (Coan *et al.*, 2005).

266 Com relação à utilização de enzimas em alimentos fermentados, foram
267 observados aumento na produção total de gás *in vitro*, melhoria na digestibilidade e nos
268 parâmetros fermentativos de silagem de cana-de-açúcar inoculada com *Pleurotus*
269 *sapidus* (Acero *et al.*, 2008). Ao avaliar o efeito de níveis de enzimas fibrolíticas (0, 5,

270 10 e 20 mg de enzimas por kg de matéria natural) sobre a composição bromatológica da
271 silagem de milho foi verificado aumento da proteína bruta no nível de 20 mg, em
272 relação ao controle e redução da FDN no nível de 10 mg, em relação ao tratamento
273 testemunha (Cysneiros *et al.*, 2006).

274 Aditivos enzimáticos podem conter um único grupo de enzimas, uma
275 combinação de vários grupos de enzimas ou combinações de enzimas e inoculante
276 bacteriano. A maior parte dos aditivos comerciais para ensilagem, em geral, contém
277 enzimas fibrolíticas combinadas a bactérias homoláticas.

278 Existem vários tipos de enzimas disponíveis para serem utilizadas como aditivos
279 em silagens: hemicelulases, celulasas, amilases, pectinases, e proteases. A maioria das
280 enzimas usadas como aditivos é subproduto ou extrato fermentativo microbiano
281 (*Bacillus ssp*) ou fúngico (*Trichoderma sp e Aspergillus sp*) que possui um ou vários
282 tipos de atividade enzimática (Zopollatto *et al.*, 2009). Desse modo, uma preparação
283 enzimática com atividade predominante de xilanase poderá, também, conter outras
284 atividades, como protease, celulase, pectinase e beta-glucanase, o que pode acarretar no
285 comprometimento da utilização desses substratos, caso a atividade enzimática não esteja
286 adequadamente estabelecida.

287 A termoestabilidade das enzimas tem muita variação em função da sua origem,
288 sendo as enzimas produzidas por fungos as que possuem maior estabilidade em
289 temperatura e maior resistência às variações de pH (Colombatto *et al.*, 2004). Além
290 disso, a atividade ótima de endo e exoglucanases de fungos varia entre pH 5,0 e 6,0 e
291 apresentam boa atividade na faixa de temperatura entre 55 a 80° C e de 50 a 75° C,
292 respectivamente (Maheshwari *et al.*, 2000).

293 Resultados mostram maior atividade da celulase de *Cellulomonas sp* em pH 6,0
294 (Emtiazi e Nahvi, 2000) que também foi obtido para celulase de *Neocallimastix sp*
295 (Lowe *et al.*, 1987). As xilanases produzidas por fungos, normalmente, são estáveis em
296 amplas faixas de pH (3,0-10,0), exibindo pH ótimo na faixa de 4,0 a 7,0 (Kulkarni *et al.*,
297 1999). Boa parte das β -glicosidases fúngicas conhecidas apresentam pH ideal entre 4,0
298 e 6,5. A temperatura ideal para β -1,4-exoglucanases e β -1,4-endoglucanases de
299 *Humicola insolens*, é de 50° C, permanecendo estáveis a 65°C para celulase e xilanase
300 (Cysneiros *et al.*, 2013).

301 Desse modo, a procura por enzimas com ação eficiente sobre a fração fibrosa
302 dos alimentos é cada vez maior. É constante a exploração dos organismos dotados

303 potencial de degradação de materiais orgânicos, graças à sua capacidade de produzir e
304 secretar enzimas importantes para seu crescimento.

305

306

307

308 *Fungos*

309 Os fungos são organismos eucariontes, unicelulares ou multicelulares, haploides
310 com parede celular contendo quitina e α -glucano e não apresentam plastos ou pigmentos
311 fotossintéticos. Todos os fungos conhecidos, com poucas exceções, tem origem nos
312 esporos (reprodução sexuada) ou conídios (reprodução assexuada), que são corpúsculos
313 e podem ser comparados às sementes das plantas superiores, embora não sejam
314 morfológicamente semelhantes a estas (Moraes *et al.*, 2009). Os fungos terrestres são
315 representados, basicamente pelas leveduras, bolores, orelhas-de-pau, bufa-de-lobo,
316 fungos em forma de taça e os cogumelos. Todos esses fungos, exceto as leveduras, se
317 nutrem através da absorção dos nutrientes dissolvidos no ambiente (Souza, 2012).

318 Os fungos de podridão branca (*Ganoderma australe*, *Phlebia tremellosa*, *C.*
319 *subvermispora*, *Pleurotus* spp., *Phellinus pin*), além de degradarem celulose e
320 hemicelulose, também possuem a capacidade de degradarem a lignina. São chamados
321 assim devido à coloração da madeira que é atacada por esse tipo de fungo e perde seu
322 aspecto lustroso e sua cor natural, se tornando esbranquiçada, como resultado da
323 destruição de seus pigmentos. Já os fungos da podridão parda (*Aureobasidium*
324 *pullulans*, *Phialophora* spp., *Trichoderma* spp.) não possuem habilidade para
325 degradarem a lignina e degradam principalmente celulose e hemicelulose. São
326 conhecidos assim por que a madeira atacada por fungos de podridão parda, apresenta
327 aspecto de estar levemente queimada, adquirindo coloração parda (Moreschi, 2013).

328 A degradação da lignina pelos fungos da podridão branca ocorre devido à ação
329 de enzimas que abstraem elétrons do substrato e formam espécies de radicais que atuam
330 na despolimerização da molécula de lignina (Fabbrini *et al.*, 2002). A produção dessas
331 enzimas envolve grande demanda energética. Além disso, pode ser responsável pela
332 ativação do metabolismo secundário dos fungos quando o ambiente em que estão é
333 desfavorável ao seu crescimento.

334

335 *Antioxidantes*

336 A deslignificação envolve a clivagem das ligações covalentes da lignina, que
337 resulta na formação de unidades de baixo peso molecular e fenólicas com potencial de
338 melhorar a qualidade do resíduo lignocelulósico, aumentando sua propriedade
339 antioxidante (Pouteau et al, 2003).

340 Os antioxidantes servem para estabilizar radicais livres altamente reativos,
341 mantendo, assim, a estrutural e funcional integridade das células. Uma variedade de
342 polifenóis contribui como antioxidante potencial para os alimentos (Gladine et al,
343 2007). Deste modo, juntamente com a alimentação nutritiva, os antioxidantes são muito
344 importantes para o sistema imunitário e saúde dos animais (Weiss, 2005).

345 Os radicais livres são produzidos constantemente no metabolismo fisiológico
346 normal dos tecidos e podem prejudicar moléculas biologicamente importantes, tais
347 como, o DNA, proteínas, lipídios e carboidratos.

348 Deste modo, no presente trabalho, a hipótese foi de que, a utilização de enzimas
349 lignofibrolíticas produzidas pelos fungos da podridão branca, quando em contato com
350 material fibroso, poderia levar a um aumento do seu valor nutritivo (valor energético).
351 Este efeito da utilização do complexo enzimático, poderia ser resumido nos seguintes
352 passos: quebra de matriz de ligação lignina-polissacarídeo, redução no teor de lignina,
353 aumento da área de superfície para o melhor acesso as frações digestíveis da fibra
354 (hemicelulose e celulose), conversão de polissacarídeos complexos em açúcares
355 simples, aumento no teor de proteína proveniente do nitrogênio lignificado e aumento
356 dos compostos fenólicos da lignina degradada com aumento da ação antioxidante.

357 Assim, o presente estudo visa avaliar os efeitos das enzimas produzidas pelo
358 fungo da podridão branca em materiais fermentados (silagem de milho e cana-de-
359 açúcar) e em alimentos ricos em fibra, simulando um pré tratamento antes de fornecer
360 os alimentos aos animais. O objetivo é avaliar o efeito da utilização das enzimas
361 lignocelulolíticas sobre a composição química, digestibilidade *in vitro* da matéria seca e
362 da fibra em detergente neutro dos alimentos, parâmetros fermentativos *in vitro*,
363 composição monomérica da lignina e atividade antioxidante nos alimentos.

Referências Bibliográficas

364

365

366 ACERO, A. P. et al. Ventajas De La Fermentación Sólida Con *Pleurotus Sapidus* En
367 Ensilajes De Caña De Azúcar. **Revista Archivos De Zootecnia**, v. 57, n. 217, p. 25 -
368 33, 2008.

369

370 ALVES-PRADO, H. F. et al. Screening and Production Study of Microbial Xylanase
371 Producers from Brazilian Cerrado. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 161,
372 n. 1, p. 333 - 346, 2010.

373

374 BALDRIAN, P. Fungal laccases - occurrence and properties. **FEMS Microbial
375 Review**, v. 30, p. 215 - 242, 2006.

376

377 BEAUCHEMIN, K. A. et al. Mode of action of exogenous cell wall degrading
378 enzymes for ruminants. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 84, p. 13-22, 2004.

379

380 BEAUCHEMIN, K. A.; RODE, L. M.; SEWALT, V. J. H. Fibrolytic enzymes increase
381 fiber digestibility and growth rate of steers fed dry forages. **Canadian Journal of
382 Animal Science**, v. 75, p. 641 - 644, 1995.

383

384 BOERJAN, W.; RALPH, J.; BAUCHER, M. Lignin biosynthesis. **Annual Review of
385 Plant Biology**, v. 54, p. 519 - 546, 2003.

386

387 BURANOV, A. U.; MAZZA, G. Lignin in straw of herbaceous crops. **Industrial crops
388 and products**, v. 28, p. 237-259, 2008.

389

390 CHEN, K.-C. et al. Degradation of phenol by PAA-immobilized *Candida tropicalis*.
391 **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 490 - 497, 2002.

392

393 COAN, R. M. et al. Inoculante enzimático-bacteriano, composição química e
394 parâmetros fermentativos das silagens dos capins Tanzânia e Mombaça. **Revista
395 Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 2, p. 416 - 424, 2005.

396

397 COLOMBATTO, D. et al. In vitro evaluation of fibrolytic enzymes as additives for
398 maize (*Zea mays* L.) silage: III. Comparison of enzymes derived from psychrophilic,
399 mesophilic or thermophilic sources. **Animal Feed Science and Technology**, v. 111, n.
400 1-4, p. 145 - 159, 2004.

401

402 CYSNEIROS, C. D. S. S. et al. Produção, Caracterização E Avaliação De Enzimas
403 Fibrolíticas Na Digestibilidade Da Forragem De Milho **Ciência Animal Brasileira**, v.
404 14, n. 4, p. 1-5, 2013.

405

406 _____. Efeito de enzimas fibrolíticas sobre a composição química da silagem de milho.
407 **Ciência Animal Brasileira**, v. 7, n. 4, p. 339 - 34, 2006.

408

409 DOBLIN, M. S.; PETTOLINO, F.; BACIC, A. Plant cell walls: the skeleton of the plant
410 world. **Functional Plant Biology**, v. 37, p. 357 - 381, 2010.

411

- 412 EMTIAZI, G.; NAHVI, I. Multi-enzyme production by *Cellulomonas* sp. grown on
413 wheat straw. **Biomass and Bioenergy**, v. 19, n. 1, p. 31 - 37, 2000.
- 414
- 415 FABBRINI, M.; GALLI, C.; GENTILI, P. Comparing the catalytic efficiency of some
416 mediators of laccase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 16, n. 5-6, p.
417 231-240, 2002.
- 418
- 419 FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood—chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin
420 and New York: 1984. 613.
- 421
- 422 HAMMEL, K. E.; CULLEN, D. Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis.
423 **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, p. 349 - 355, 2008.
- 424
- 425 HATFIELD, R. D. Cell Wall Polysaccharide Interactions and Degradability. In: JUNG,
426 H. G.;BUXTON, D. R., *et al* (Ed.). **Forage Cell Wall Structure and Digestibility**.
427 Madison: American Society of Agronomy, Crop Sci. Society of America, Soil Sci.
428 Society of America, 1993. cap. Cell Wall Polysaccharide Interactions and Degradability
429 p.315 - 346.
- 430
- 431 HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of
432 lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 1, p. 10 - 18, 2009.
- 433
- 434 HOFRICHTER, M. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP).
435 **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 454 - 466, 2002.
- 436
- 437 HU, X.-P.; HSIEH, Y.-L. Effects of Dehydration on the Crystalline Structure and
438 Strength of Developing Cotton Fibers. **Textile Research Journal**, v. 71, n. 3, p. 231 -
439 239, 2001.
- 440
- 441 HUANG, H.-W.; ZOPPELLARO, G.; SAKURAI, T. Spectroscopic and Kinetic Studies
442 on the Oxygen-centered Radical Formed during the Four-electron Reduction Process of
443 Dioxygen by *Rhus vernicifera* Laccase. **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL**
444 **CHEMISTRY**, v. 274, n. 12, p. 32718 - 32724, 1999.
- 445
- 446 JALILVAND, G. *et al*. Rumen Degradation Kinetics Of Alfalfa Hay, Maize Silage And
447 Wheat Straw Treated With Fibrolytic Enzymes. **Revista Archivos De Zootecnia**, v. 57,
448 p. 155 - 164, 2008.
- 449
- 450 JUNG, H. G. Forage Lignins and Their Effects on Fiber Digestibility. **Agronomy**
451 **Journal**, v. 81, p. 33-38, 1989.
- 452
- 453 KADLA, J. F.; GILBERT, R. D. Cellulose structure: a review. **Cellulose Chemistry**
454 **and Technology**, v. 34, n. 3, p. 197 - 216, 2000.
- 455
- 456 KARLSSON, M. *et al*. Hydrogen peroxide and expression of hipI-superoxide
457 dismutase are associated with the development of secondary cell walls in *Zinnia*
458 *elegans*. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 2085 - 2093, 2005.
- 459
- 460 KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of
461 xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 23, p. 411 - 456, 1999.

- 462
463 LOURES, D. R. S. et al. Efeito de enzimas fibrolíticas e do teor de matéria seca em
464 silagens de capim-tanzânia sobre os parâmetros ruminais, o comportamento ingestivo e
465 a digestão de nutrientes, em bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 3, p.
466 736 - 745, 2005.
- 467
468 LOWE, S. E.; THEODOROU, M. K.; TRINCI, A. P. Cellulases and xylanase of an
469 anaerobic rumen fungus grown on wheat straw, wheat straw holocellulose, cellulose,
470 and xylan. **Applied and Environmental Microbiology** v. 53, n. 6, p. 1216 - 1223,
471 1987.
- 472
473 MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BHAT, M. K. Thermophilic Fungi: Their
474 Physiology and Enzymes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 3,
475 p. 461 - 488, 2000.
- 476
477 MORAES, A. M. L. D.; PAES, R. D. A.; HOLANDA, V. L. D. Micologia. In: (Ed.).
478 **Conceitos e Métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde:**
479 **volume 4** Rio de Janeiro: Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio, v.4, 2009.
- 480
481 MORESCHI, J. C. **Biodegradação e Preservação da Madeira**. Curitiba 2013.
- 482
483 PALOHEIMO, M.; PIIRONEN, J.; VEHEMAANPERA, J. Xylanases and Cellulases as
484 Feed Additives. In: BEDFORD, M. R. e PARTRIDGE, G. G. (Ed.). **Enzymes in farm**
485 **Animal Nutrition**. Oxford, UK: CABI Publishing, v.2, 2010. cap. 2, p.12 - 53.
- 486
487 ROSATTO, S. S. et al. Biossensores amperométricos para determinação de compostos
488 fenólicos em amostras de interesse ambiental. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 77 - 86,
489 2001.
- 490
491 SALIBA, E. D. O. S. et al. Ligninas – Métodos De Obtenção E Caracterização
492 Química. **Ciência Rural - UFSM**, v. 31, n. 5, p. 917 - 928, 2001.
- 493
494 SCHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. **Annual Review of Plant Biology**,
495 v. 61, p. 263 - 289, 2010.
- 496
497 SHALLOM, D.; SHOHAM, Y. Microbial hemicellulases. **Current Opinion in**
498 **Microbiology**, v. 6, p. 219 - 228, 2003.
- 499
500 SJOSTROM, E. **Wood Chemistry: Fundamentals and Applications**. San Diego:
501 1993.
- 502
503 SOUZA, G. D. **Produção, extração e estabilidade de enzimas lignocelulolíticas para**
504 **uso em degradação de compostos poluentes**. 2012. 112 Biologia na agricultura e no
505 ambiente, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- 506
507 TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 2006.
- 508
509 VALLI, K.; WARIISHI, H.; GOLD, M. H. Oxidation of monomethoxylated aromatic
510 compounds by lignin peroxidase: role of veratryl alcohol in lignin biodegradation
511 **Biochemistry**, v. 29, n. 37, p. 8535 - 8539, 1990.

- 512
513 WARIISHI, H.; VALLI, K.; GOL, M. H. Manganese(II) Oxidation by Manganese
514 Peroxidase from the Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **THE JOURNAL**
515 **OF BIOLOGICAL CHEMISTRY** v. 267, n. 33, p. 23689-23695, 1992. Disponível
516 em: < <http://www.jbc.org/content/267/33/23688.long> >.
- 517
518 WILSON, J. R. Cell wall characteristics in relation to forage digestion by ruminants.
519 **Journal of Agricultural Science**, v. 122, n. 2, p. 173 - 181, 1994.
- 520
521 WONG, D. W. S. Structure and Action Mechanism of Ligninolytic Enzymes. **Applied**
522 **Biochemistry Biotechnology**, v. 157, p. 174 - 209, 2009.
- 523
524 WU, H. et al. Overexpression of GH10 endoxylanase XynB from *Thermotoga maritima*
525 in *Escherichia coli* by a novel vector with potential for industrial application. **Enzyme**
526 **and Microbial Technology**, v. 42, n. 3, p. 230 - 234, 2008.
- 527
528 ZHANG, C.; XING, X.-H.; LIU, M.-S. Production of multienzymes consisting of
529 alkaline amylase and cellulase by mixed alkalophilic culture and their potential use in
530 the saccharification of sweet potato. **Biochemical Engineering Journal**, v. 19, p. 181 -
531 187, 2004.
- 532
533 ZOPOLLATTO, M.; DANIEL, J. L. P.; NUSSIO, L. G. Aditivos microbiológicos em
534 silagens no Brasil: revisão dos aspectos da ensilagem e do desempenho de animais.
535 **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, p. 170 - 189, 2009.
- 536

OBJETIVOS GERAIS

537

538

539 1) Avaliar a ação da adição de níveis crescentes um complexo enzimático
540 lignocelulolítico (0, 10, 20 e 30 mg.kg⁻¹ de MN), produzido pelo fungo da
541 podridão branca sobre a composição química, digestibilidade *in vitro* da matéria
542 seca e da fibra em detergente neutro, parâmetros fermentativos *in vitro*,
543 composição monomérica da lignina e atividade antioxidante em silagem de
544 milho e cana-de-açúcar. Além de determinar o melhor nível de inclusão do
545 complexo enzimático lignofibrolítico para as diferentes silagens.

546

547 2) Avaliar o efeito da utilização de enzimas lignocelulósicas produzidas por fungo
548 da podridão branca, aplicadas em alimentos ricos em fibra (silagem da planta
549 inteira de milho, cana de açúcar integral, feno de coast cross e palha de arroz),
550 simulando um pré tratamento antes de fornecer os alimentos aos animais sobre a
551 composição química e digestibilidade *in vitro*.

1 **II. Redução da lignina e aumento da capacidade antioxidante em silagens de milho e**
2 **de cana-de-açúcar tratadas com complexo enzimático produzido pelo fungo da**
3 **podridão branca**
4 (Normas: Journal of Animal Science)

5

6 **Resumo**

7 Objetivou-se avaliar o efeito da adição de concentrações crescentes (0, 10, 20 e 30 mg.kg⁻¹
8 MN) de um complexo de enzimas lignocelulósicas produzidas pelo fungo da podridão
9 branca sobre a composição química, digestibilidade *in vitro*, parâmetros fermentativos *in*
10 *vitro* e compostos antioxidantes das silagens de milho e cana-de-açúcar. A planta inteira
11 do milho e a cana-de-açúcar, após serem picados e tratados com o complexo enzimático,
12 foram acondicionados em sacos plásticos de polietileno (mini bags) e selados a vácuo.
13 Após 60 dias os mini silos foram abertos e as amostras foram secas em estufa de
14 ventilação forçada a 55°C para análise dos parâmetros propostos. Houve efeito da adição
15 das enzimas sobre as forragens avaliadas, em que, a melhor concentração foi, em média,
16 20 mg.kg⁻¹ MN para a silagem de milho, e 10 mg.kg⁻¹ MN para a silagem de cana de
17 açúcar. Na silagem de milho verificou-se redução linear na concentração de lignina,
18 redução de 27% na concentração de hemicelulose e diminuição de 6% no teor de celulose
19 em relação ao tratamento controle. Na silagem de cana-de-açúcar verificou-se redução de
20 12% na concentração de lignina, redução linear no teor de hemicelulose e diminuição de
21 8% na concentração de celulose. Os monômeros da lignina também responderam à
22 adição do complexo enzimático com aumentos lineares para a razão siringil:guaiacil.
23 Estas alterações da composição química da parede celular refletiram em aumentos
24 significativos nas concentrações dos carboidratos não fibrosos e da fração A+B1 dos
25 carboidratos. Foi verificado aumento de, em média, 7% na DIVMS na DIVFDN e
26 aumentos de 30% na produção de gases para ambas as silagens. Os compostos fenólicos e
27 a capacidade antioxidante aumentaram linearmente com a adição das enzimas nas
28 silagens, com destaque para a silagem de milho que, na concentração de 20 mg.kg⁻¹ MN,
29 verificou-se um aumento de 56% na capacidade antioxidante em relação ao controle.
30 Portanto, a adição das enzimas lignocelulolíticas nas silagens ocasionou melhorias na
31 DIVMS e DIVFDN, bem como nos parâmetros fermentativos *in vitro* além do efeito
32 adicional na capacidade antioxidante. As melhores doses foram 20 mg.kg⁻¹ MN para a
33 silagem de milho, e 10 mg.kg⁻¹ MN para a silagem de cana-de-açúcar.

34

35 **Palavras chave:** Celulases, Digestibilidade, Hemicelulases, Lacases, Monômeros da
36 lignina

37

38

39 **Introdução**

40 O aproveitamento da fração fibrosa dos alimentos pelos ruminantes está
41 relacionado à capacidade que os microrganismos do rúmen têm de sintetizar e secretar
42 enzimas que hidrolisam a parede celular das plantas (Martins *et al.*, 2006). Entretanto, em
43 dietas com alto teor de fibra e matéria seca, o aproveitamento dos alimentos tem sido
44 pouco eficiente (Varga and Kolver, 1997). Uma das soluções encontradas para tentar
45 resolver parte desse problema é a utilização de enzimas fibrolíticas exógenas na
46 alimentação de ruminantes, especialmente, em materiais ensilados. Essa alternativa tem
47 sido proposta como uma estratégia para melhorar a disponibilidade do substrato e
48 contribuir para o aumento da fermentação láctica da silagem, bem como aumentar seu
49 valor nutritivo (Loures *et al.*, 2005).

50 Os aditivos enzimáticos podem conter um único grupo de enzimas, uma
51 combinação de vários grupos de enzimas (hemicelulases, celulasas, amilases, pectinases e
52 proteases) ou combinações de enzimas e inoculante bacteriano para uso no processo de
53 ensilagem. A maioria das enzimas usadas como aditivos é proveniente de subproduto ou
54 extrato fermentativo microbiano (*Bacillus ssp*) ou fúngico (*Trichoderma sp* e *Aspergillus*
55 *sp*) que possui um ou diversos tipos de atividade enzimática (Zopollatto *et al.*, 2009).

56 Entretanto, os complexos enzimáticos com ação sobre a parede celular que são
57 comercializados atualmente são compostos, basicamente, por celulasas e hemicelulasas e
58 não contem enzimas que possuem ação sobre a lignina. A lignina representa uma barreira
59 física contra a entrada de microrganismos devido à sua estreita relação com a celulose e
60 hemicelulose (Boudet, 2007), e pode causar limitação na digestão dos polissacarídeos.

61 Dessa forma, além de melhorar a qualidade nutricional dos alimentos, a quebra da
62 lignina envolve a clivagem das ligações covalentes da lignina, resultando na formação de
63 unidades com baixo peso molecular e fenólicas que possuem grande potencial de
64 melhorar a qualidade do alimento, aumentando sua propriedade antioxidante (Pouteau
65 *et al.*, 2003).

66 Assim, a hipótese do presente trabalho é de que presença de enzimas que
67 degradam a lignina nos complexos enzimáticos lignocelulolíticos, além de aumentar o
68 valor energético das forragens ensiladas utilizadas na alimentação dos ruminantes,
69 também pode agregar efeito antioxidante a esses alimentos. Para isso, objetivou-se avaliar
70 o efeito da adição de concentrações crescentes (0, 10, 20 e 30 mg.kg⁻¹ MN) de um
71 complexo de enzimas lignocelulósicas produzidas pelo fungo da podridão branca sobre a

72 composição química, produção de gases e digestibilidade *in vitro* e compostos
73 antioxidantes em silagens de milho e da cana-de-açúcar.

74

75 **Material de Métodos**

76 O experimento foi conduzido no Departamento de Zootecnia da Universidade
77 Estadual de Maringá (UEM), Maringá – PR, as atividades de campo aconteceram no
78 setor de Nutrição de Bovídeos da Fazenda Experimental de Iguatemi e no Laboratório
79 de Análises de Alimentos e Nutrição Animal. As análises referentes aos parâmetros
80 fermentativos *in vitro* foram realizadas na Universidade Federal do Mato Grosso do Sul
81 (UFMS).

82 O complexo enzimático lignocelulolítico utilizado neste experimento foi produzido
83 utilizando o fungo da podridão branca, que cresceu em meio contendo feno de Coast
84 Cross, durante 12 dias para a produção das enzimas (tabela 1). O complexo enzimático
85 foi utilizado após liofilização e, como excipiente, foi utilizado amido de milho ou
86 açúcar, para adição na silagem de milho e de cana-de-açúcar, respectivamente. Deste
87 modo todos os tratamentos receberam a adição de 15 cm³ de complexo enzimático. E as
88 concentrações adicionadas às forragens (0, 10, 20 e 30 mg.kg⁻¹ MN) foram calculadas
89 de acordo com a atividade de proteína total da cultura do fungo.

90 O milho (planta inteira) foi colhido com 31% de matéria seca e a cana-de-açúcar
91 (variedade CTC 25), foi colhida por corte manual, com 18,4 °Bx e foram desintegrados
92 em ensiladora estacionária regulada para cortar a forragem em pedaços de
93 aproximadamente 2 cm de comprimento. A cana-de-açúcar foi tratada com inoculante
94 bacteriano contendo *Lactobacillus buchneri* a fim de reduzir a fermentação alcoólica.

95 Ambas as forrageiras foram pesadas (aproximadamente 500g) e tratadas com o
96 complexo enzimático lignocelulolítico. Foram acondicionadas em sacos de polietileno
97 (mini bags) e selados à vácuo para garantir a ausência de oxigênio no interior dos mini
98 bags. As forragens ensiladas permaneceram armazenadas nos mini silos durante 60 dias
99 e, posteriormente, foram realizadas as amostragens das silagens para posteriores
100 análises bromatológicas.

101 As amostras do material antes de ser ensilado e das silagens foram secas em estufa
102 de circulação forçada a 55°C por 72 horas e moídas em moinho de faca tipo “Wiley” de
103 modo que o tamanho das partículas foi de aproximadamente 1 mm. Em seguida, foram
104 submetidas às análises para determinação da composição química, em que: a MS das

105 amostras foi determinada em estufa de ventilação forçada de acordo com o
106 procedimento de 934.01(AOAC, 1990). As cinzas foram determinadas por combustão a
107 600°C por 6 horas de acordo com o método da AOAC 924.05 (1990). A determinação
108 no N total seguiu o procedimento 990.03 da AOAC (1990). As concentrações de fibra
109 em detergente neutro (FDN) foram medidas com uso de amilase termoestável, sem
110 sulfito de sódio (Mertens, 2002). As concentrações de fibra em detergente ácido (FDA),
111 sem correção do teor de cinzas, foram determinadas de acordo com o procedimento
112 973.18 AOAC (1990). O extrato etéreo (EE) foi determinado de acordo com o método
113 de 7.060 AOAC (1990). Para a determinação do nitrogênio insolúvel em detergente
114 ácido foi utilizado o resíduo da FDA para a determinação do nitrogênio total, segundo
115 AOAC (1990).

116 A lignina foi determinada através de duas metodologias: lignina solúvel em
117 brometo de acetila (LSBA) e lignina solúvel em permanganato de potássio (LSPP). Para
118 determinação da LSBA, a fim de se obter a fração da parede celular livre de proteínas as
119 amostras secas (0,3 g) foram homogeneizadas em 7 mL de tampão fosfato de sódio e
120 potássio (50 mM, pH 7,0) e transferido para tubos de centrifuga de 15 mL . O
121 precipitado foi centrifugado (1.400g, 2 min) sucessivamente como segue: mais 4 vezes
122 com 7 mL de tampão fosfato (50 mM, pH 7,0); 3 vezes com 1% (v/v) Triton® em
123 tampão fosfato pH 7,0 (7 mL); 3 vezes com 1 M NaCl em tampão pH 7,0 (7 mL); 3
124 vezes com água destilada (7 mL) e 2 vezes com acetona (5 mL), a fim de se obter a
125 parede celular isenta de proteínas. O precipitado foi seco em estufa (60 °C, 24 horas) e
126 resfriado em dessecador a vácuo. A MS foi definida como a fração da parede celular
127 livre de proteínas. Posteriormente, 20mg da parede celular isenta de proteína foram
128 colocadas em tubos de vidro com rosca e adicionou-se 0,5 ml do reagente brometo de
129 acetila 25% , preparado em ácido acético. Os tubos foram tampados, agitados e levados
130 ao banho-maria por 30 minutos a 70° C. Em seguida, as amostras foram resfriadas em
131 banho de gelo e adicionou-se 0,9 ml de NaOH 2M, 0,1 ml de hidroxilamina –HCl 7,5M
132 e 2 ml de ácido acético. As amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 2400 RPM. O
133 sobrenadante foi diluído em ácido acético e a leitura da absorbância foi realizada em
134 espectrofotômetro a 280 nm. A concentração de lignina foi determinada de acordo com
135 uma curva padrão e expressa em mg lignina.g⁻¹ de parede celular. A LSPP foi
136 determinada segundo metodologia descrita por (Van-Soest and Wine, 1968).

137 A composição monomérica da lignina, foi realizada através da oxidação com
138 nitrobenzeno. Uma fração da parede celular livre de proteínas (50 mg) foi colocada em

139 ampola Pyrex® contendo 1 mL de NaOH 2 M e 100 µL de nitrobenzeno. A ampola foi
 140 selada e aquecida a 170°C por 2,5 h, com agitação na metade do tempo de reação. Após
 141 oxidação, a amostra foi resfriada, lavada duas vezes com clorofórmio, acidificada com
 142 HCl 5 M e extraída duas vezes com clorofórmio. Os extratos orgânicos foram
 143 combinados, secos e ressuspensos em metanol. Todas as amostras foram filtradas
 144 em filtro de 0,45 µm e analisadas por HPLC. A fase móvel utilizada foi metanol/ácido
 145 acético 4% em água (20/80, v/v), com fluxo de 1,2 mL min⁻¹ para análise isocrática de
 146 20 min. As quantificações de p-hidroxibenzaldeído (H), isovanilina (I), guaiacil (G) e
 147 siringaldeído (S) foram realizadas a 290 nm utilizando os padrões correspondentes. Os
 148 resultados serão expressos como mg do monômero g⁻¹ de parede celular. Através desses
 149 resultados foi calculada a relação S/G.

150 A fração hemicelulose foi obtida pela diferença da FDN e FDA, e a celulose, pela
 151 diferença da FDA e lignina, Os carboidratos totais (CT) foram obtidos por intermédio da
 152 seguinte equação: $CT = 100 - (\%PB + \%EE + \%Matéria\ Mineral)$, (Sniffen *et al.*, 1992).
 153 Os carboidratos não-fibrosos (CNF) foram determinados pela diferença entre CT e FDN
 154 e o fracionamento dos carboidratos foi realizado segundo System CNCPS, em que:

$$155 \quad CT = MO - (EE + PB)$$

$$156 \quad \text{Fração A} + B1 = 100 - (C + B2)$$

$$157 \quad \text{Fração B2} = 100 \times ((FDN(\%MS)) - PIDN(\%PB) \times 0,01 \times PB(\%MS) -$$

$$158 \quad FDN(\%MS) \times 0,01 \times LIGNINA(\%FDN) \times FDNi) / CT(\%MS)$$

$$159 \quad \text{Fração C} = (100 \times FDN(\%MS) \times 0,01 \times LIGNINA(\%FDN) \times$$

$$160 \quad FDNi / CT(\%MS))$$

161 Para a quantificação da FDN indigestível (FDNi) utilizado no cálculo do
 162 fracionamento dos carboidratos, as amostras foram incubadas, *in situ* em 2 búfalas
 163 mestiças, durante 288 horas. Os animais foram alimentados com dietas a base de silagem
 164 de milho (70%) e concentrado (30%) formulado para atender as exigências nutricionais
 165 (Paul and Lal, 2010). Após a incubação, as amostras foram colocadas no analisador
 166 automático de fibras Ankom, juntamente com a adição de detergente neutro, para a
 167 quantificação da FDN (Silva and Queiroz, 2002).

168 A recuperação dos carboidratos foi estimada pela adaptação da equação proposta
 169 por Jobim et al. (2007):

$$170 \quad RFPC = (MFab \times MSab) \times 100 (MFfe \times MSfe)$$

171 Em que:

172 RFPC = índice de recuperação da fração da parede celular;
173 MFab= massa de forragem na abertura;
174 FPCab= fração da parede celular na abertura;
175 MFfe = massa de forragem no fechamento;
176 FPCfe = Fração da parede celular da forragem no fechamento.

177 Para os ensaios de digestibilidade *in vitro*, foram utilizadas duas búfalas mestiças
178 canuladas no rúmen como doadoras de líquido ruminal para as incubações *in vitro*. Os
179 animais foram alimentados com dietas a base de silagem (70%) e concentrado (30%)
180 formulado para atender as exigências nutricionais (Paul and Lal, 2010). As coletas de
181 conteúdo ruminal (fase líquida e sólida) das búfalas foram realizadas, manualmente,
182 antes da alimentação da manhã, em diferentes pontos no rúmen, para determinação da
183 digestibilidade *in vitro*. Esse conteúdo foi homogeneizado em liquidificador e filtrado
184 através de quatro camadas de panos de gaze e colocado em garrafas térmicas mantidas à
185 temperatura de 39°C, com adição de CO₂.

186 A digestibilidade *in vitro* de MS (DIVMS) foi determinada por meio da pesagem de
187 0,5 g de amostra pré-seca em tubos de centrifuga previamente secos e calibrados. Aos
188 tubos foram adicionados 12,5 mL de inóculo de rúmen e 37,5 mL de saliva artificial,
189 que foi preparada inicialmente com a solução tampão de McDougall (NaHCO₃,
190 Na₂HPO₄ 7H₂O, KCl, NaCl, MgSO₄ 7H₂O, CaCl₂) e mais duas soluções, sendo uma
191 de uréia (5,5 g 100 mL⁻¹ de H₂O destilada) e outra de glicose (5,5g 100 mL⁻¹ H₂O
192 destilada) e anteriormente à incubação *in vitro*, foram adicionados a cada 300 mL da
193 solução de McDougall, 5 mL da solução tampão de ureia e 5 mL da solução tampão de
194 glicose, permanecendo em uma estufa a 39°C até a sua utilização (Tilley and Terry,
195 1963). Em seguida, acrescentou-se CO₂ sobre a superfície dos tubos, que foram
196 fechados imediatamente com rolhas de borracha equipadas com válvula de Bunsen.
197 Após este procedimento, os tubos permaneceram em banho-maria por 48 horas de
198 incubação a 39°C, com agitação constante. As amostras foram analisadas com três
199 repetições a campo (3 baterias) em duplicata. Em cada incubação, foram adicionados
200 dois tubos brancos (sem amostras) e dois tubos com forragem índice, para avaliar a
201 interferência de efeitos durante o processo de fermentação ruminal. Após 48 horas de
202 incubação, a fermentação foi interrompida, colocando os tubos em gelo moído durante
203 10 minutos. O conteúdo dos tubos foram filtrados em papel filtro quantitativo (faixa
204 preta). Os filtros com os resíduos foram colocados em estufa, a 105°C, onde

205 permaneceram por 24 horas. Após este período, os filtros foram colocados em um
206 dessecador para posterior pesagem e determinação da MS.

207 A digestibilidade da FDN foi determinada de acordo com metodologia descrita por
208 (Tilley and Terry, 1963) modificada por (Holden, 1999), utilizando o rúmen artificial
209 (DaisyII Fermenter®, Ankom). Foram pesados 0,5 gramas de amostra em saquinhos F-
210 57®, Ankom, que foram distribuídos nos jarros onde foi adicionado 1600mL de solução
211 tampão e 400 mL de inóculo de rúmen, em seguida, foi acrescentado CO₂ para manter
212 as condições anaeróbias e as amostras permaneceram incubadas por 48 horas com
213 agitação contínua e temperatura controlada (39°C). Após as 48 horas de incubação, os
214 jarros foram drenados e lavados com água da torneira entre 5 a 6 vezes até a água sair
215 limpa. Em seguida os saquinhos foram congelados e, posteriormente, colocados no
216 analisador automático de fibras Ankom, juntamente com a adição de detergente neutro,
217 para a quantificação da FDN. As amostras foram analisadas com três repetições a
218 campo (3 baterias) em duplicata. Em cada incubação, foram adicionados dois saquinhos
219 brancos (sem amostras) e dois saquinhos com forragem índice, para avaliar a
220 interferência de efeitos durante o processo de fermentação ruminal.

221 Para análise da produção cumulativa de gases *in vitro*, foram utilizados três bovinos
222 canulados no rúmen como doadores de líquido ruminal. Foram realizadas duas
223 repetições de campo (2 baterias) no aparelho, com líquido ruminal de bovinos mantidos
224 em pastagens de *Brachiaria brizantha* com suplementação volumosa de silagem de
225 milho e concentrado a base de milho e farelo de soja e mineral à vontade.

226 A cada rodada, pesou-se 0,5 g de amostra, em triplicata, que foram incubadas com
227 saliva artificial (100 mL em cada frasco) e líquido ruminal (25 mL em cada frasco).
228 Antes do fechamento dos módulos do aparelho, foi injetado CO₂, para melhor
229 simulação do ambiente ruminal. A cinética da digestão foi avaliada nas 48 horas de
230 incubação, por intermédio da produção cumulativa de gases *in vitro* no processo
231 fermentativo de cada alimento por meio do sistema computadorizado sem fio, dotado de
232 transdutor de pressão, com comunicação feita por rádio frequência (ANKOM® RF –
233 Gas production system).

234 Os dados de pressão, em psi, foram coletados a cada 5 minutos, e foram
235 transformados para mL de gás/100 mg de matéria seca incubada. Os parâmetros da
236 fermentação, correspondentes às diferentes frações analisadas, foram obtidos segundo
237 modelo logístico bicompartimental proposto por (Schofield *et al.*, 1994):

$$Y = [A/(1+\exp(2+4*B*(Lag - tempo)))] + [D/(1+\exp(2+4*E*(Lag - tempo)))]$$

Em que:

A: volume de gás das frações de degradação rápida (açúcares solúveis e amido);

B: taxa de degradação por hora da fração rápida;

Lag: tempo de colonização e início de fermentação em horas;

D: volume de gás das frações de degradação lenta (celulose e hemicelulose); E= taxa de degradação por hora da fração lenta;

Total: produção cumulativa de gases in vitro (mL/100 mg MS incubada)

Para a realização das análises referentes aos compostos antioxidantes, as moléculas bioativas das amostras foram extraídas utilizando-se acetona 40% durante 4 horas em agitador de tubos, posteriormente, o extrato foi centrifugado por a 3000 rpm durante 10 minutos. Tais condições de extração foram determinadas previamente em um estudo piloto, visando obter os melhores resultados para a maioria das variáveis antioxidantes nas amostras deste estudo.

A análise de polifenóis totais foi realizada pelo método colorimétrico descrito por (Singleton and Rossi, 1965) em que com uma alíquota de 125µL do extrato de cada amostra, 125µL de Folin-Ciocalteu (50% com água deionizada) e 2,25mL de Na₂CO₃ (28g/L). Depois de um repouso de 30min no escuro, a leitura foi realizada em espectrofotômetro UV/Vis a 725nm. Os resultados obtidos estão expressos em mg de EAG (equivalentes ao ácido gálico).

Para a quantificação dos flavonoides, uma alíquota (300µL)do extrato de cada amostra foi misturada com 150 µL de AlCl₃ e 2,55 mL metanol (90%) e incubada, por 30minutos, sendo a leitura realizada em espectrofotometria na absorbância de 425nm para os flavonóides Woisky & (Woisky and Salatino, 1998) com modificações (Sánchez *et al.*, 2010). Os resultados obtidos estão expressos em mg de EQ (equivalentes a quercetina).

O poder redutor das amostras foi determinado de acordo com (Zhu *et al.*, 2002), com modificações (Santos *et al.*, 2014) em que uma alíquota de 250µL do extrato de cada amostra foi colocada em tubo de vidro envolto com papel alumínio, adicionando-se 1,25mL de tampão fosfato (50mmol/L, pH 7) e 1,25mL da solução de ferricianeto de potássio (1%). A mistura foi homogeneizada e incubada a 50°C durante 20min e resfriada em água. Em seguida foi adicionado 2,5mL de ácido

270 tricloroacético (10%) e a amostra foi homogenizada. Posteriormente, a amostra foi
271 centrifugada por 10 minutos a 3000 rpm, e recuperou-se 2,5 mL do sobrenadante em
272 tubo de vidro envolto de papel alumínio, foi adicionando 500 µL de FeCl₃ (0,1%) no
273 momento da leitura à 700 nm. Foi utilizado o ácido gálico como referência.

274 A capacidade antioxidante utilizando o reagente ABTS foi determinada como
275 descrito por (Rufino *et al.*, 2007) com a adição do radical ABTS* à 40 µL de extrato. A
276 leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro UV-Vis à 734 nm após 6
277 minutos de reação. Os resultados estão expressos em função do Trolox.

278 O experimento foi conduzido segundo o delineamento inteiramente casualizado, com
279 4 repetições por tratamento. A análise estatística das variáveis estudadas foi realizada
280 através da análise de regressão usando o pacote estatístico SAS (Statistical Analysis
281 System, versão 9.0.) para avaliar as respostas (linear e quadrática) ao aumento dos níveis
282 de complexo enzimático nas silagens.

283

284 **Resultados**

285 Foram identificadas 6 enzimas no complexo enzimático produzido pelo fungo da
286 podridão branca, como observado na tabela 1, sendo: 12,3% de lignases (lacase,
287 manganês peroxidase e Lignina peroxidase), 33,2% de celulase e 54,5% de hemicelulases
288 (mananase e xilanase).

289 Os resultados da recuperação dos carboidratos das silagens de milho e cana-de-
290 açúcar, após o processo de fermentação, estão apresentados na tabela 2. A recuperação da
291 parede celular do milho (FDN) diminuiu linearmente em 0,62 g para cada mg de
292 acréscimo do complexo enzimático, como mostrada na equação de regressão. Essa
293 diminuição se deve, principalmente, à lignina, que teve a recuperação diminuída em
294 1,01 g para cada mg de adição do complexo enzimático.

295 Na silagem de cana-de-açúcar, a recuperação da fibra em detergente neutro
296 apresentou comportamento quadrático, com diminuição de 14% no ponto de inflexão na
297 concentração de 13,8 mg.kg⁻¹ MN, em relação ao tratamento controle. Essa redução
298 também foi reflexo da redução do teor de lignina, pois foi verificado um decréscimo de
299 18%, na concentração de 18,7 mg.kg⁻¹ MN, em relação ao controle.

300 Assim, a adição do complexo de enzimas lignocelulósicas na silagem de milho
301 (nos níveis de 0 a 30 mg.kg⁻¹ MN) ocasionou efeitos lineares e quadráticos positivos

302 sobre a composição química (Tabela 3), em especial sobre as frações da parede celular
303 ($P < 0,05$).

304 A adição do complexo enzimático na silagem de milho não alterou o pH das
305 silagens, bem como os teores de matéria orgânica, proteína e extrato etéreo, entretanto
306 diminuiu os teores de matéria seca, que apresentou comportamento quadrático, cujo
307 ponto de inflexão foi na concentração de $20,3 \text{ mg.kg}^{-1}$ MN do complexo enzimático.
308 Também houve diminuição do nitrogênio insolúvel em detergente ácido (NIDA) em
309 22%, que apresentou comportamento quadrático, com ponto de inflexão em $22,3 \text{ mg.kg}^{-1}$
310 MN.

311 Os teores de FDN e FDA apresentaram comportamentos quadráticos, com
312 redução de 12% na concentração de $19,8 \text{ mg.g}^{-1}$ MN para a FDN e de 13 % na
313 concentração de $20,2 \text{ mg.kg}^{-1}$ MN para a FDA, em relação ao tratamento controle na
314 silagem de milho.

315 A concentração de hemicelulose apresentou diminuição linear de 1,0 g para cada
316 mg de adição do complexo enzimático. A celulose na silagem de milho apresentou
317 comportamento quadrático, com ponto de inflexão em $20,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ MN com redução de
318 6% em relação ao tratamento controle.

319 O fracionamento dos carboidratos da silagem de milho apresentou comportamento
320 linear em todas as frações, sendo que as frações digestíveis (A+B1) apresentou aumento
321 linear de 0,35g, a fração com potencial de degradação (B2) apresentou redução de 0,20g e
322 a fração considerada totalmente indigestível (C) apresentou redução de 0,14g para cada
323 mg de adição do complexo enzimático.

324 A concentração de lignina apresentou redução linear de 0,09g (LSBA) e 0,10g
325 (LSPP) para cada mg de aumento do complexo enzimático. Vale destacar que os teores
326 de lignina obtidos por meio do permanganato de potássio (LSPP) foi subestimado em
327 relação aos teores obtidos usando o brometo de acetila (LSBA) em ambos os materiais
328 ensilados.

329 Para a silagem de cana-de-açúcar foi necessária menor quantidade de enzimas
330 para produzir efeitos benéficos semelhantes ao da silagem de milho (tabela 4).

331 A adição do complexo enzimático nas silagens de cana-de-açúcar não alterou os
332 teores de matéria seca, matéria orgânica e extrato etéreo, entretanto, os CNF
333 apresentaram comportamento quadrático, com aumento 7 % no ponto de inflexão ($10,5$
334 mg.kg^{-1} MN) em relação ao tratamento controle, de acordo com as equações de
335 regressão.

336 Os teores de FDN e FDA apresentaram comportamentos quadráticos, com
337 redução de 6% na concentração de 10,9 mg.g⁻¹ MN para a FDN e de 5 % na concentração
338 de 10,7 mg.kg⁻¹ MN para a FDA, em relação ao tratamento controle.

339 A concentração de hemicelulose teve redução linear de 0,05g para cada mg de
340 adição do complexo enzimático. O teor de celulose apresentou comportamento
341 quadrático, cujo ponto de inflexão foi em 10,3 mg.kg⁻¹ MN, com diminuição de 3% em
342 relação ao controle. Houve diminuição do NIDA em 57 %, na concentração de 18,7
343 mg.kg⁻¹ MN, em relação ao controle.

344 O fracionamento dos carboidratos da silagem de cana-de-açúcar apresentou
345 comportamento quadrático, sendo que as frações mais digestíveis (A+B1) aumentaram
346 em 20 % no ponto de inflexão (11,3 mg.kg⁻¹ MN), a fração menos digestível com
347 potencial de degradação (B2), diminuiu em 7 % no ponto de inflexão (11,9 mg.kg⁻¹ MN)
348 e a fração considerada totalmente indigestível (C) reduziu em 9 % no ponto de inflexão
349 (12,7 mg.kg⁻¹ MN). Os valores em percentuais foram obtidos a partir do ponto de inflexão
350 em relação ao tratamento controle.

351 Na silagem de cana-de-açúcar, foram observados efeitos quadráticos sobre a
352 concentração de lignina, com ponto de inflexão em 15,4 mg.kg⁻¹ MN (P<0,05) com
353 redução de 12,5% em relação ao controle, que refletiu na composição monomérica.

354 A composição monomérica da lignina, de ambas as silagens, foi alterada pela ação
355 do complexo enzimático (tabela 5).

356 Na silagem de milho, o monômero p-hidroxifenil (H) aumentou linearmente em
357 0,51g, o guaiacil (G) aumentou 1,44g e o siringil aumentou 1,63g para cada mg de adição
358 do complexo enzimático, de acordo com as equações de regressão apresentadas na tabela
359 4A. Na silagem de cana-de-açúcar, todos os monômeros apresentaram comportamento
360 quadrático, em que, o ponto de inflexão ocorreu, próximo à concentração de 20mg.kg⁻¹
361 MN. O monômero p-hidroxifenil (H) aumentou 97%, no ponto de inflexão (16,7 mg.kg⁻¹
362 MN) em relação ao controle, o guaiacil (G) aumentou 23 % na concentração de 18,8
363 mg.kg⁻¹ MN e o siringil aumentou 140% na concentração de 19,3 mg.kg⁻¹ MN, em
364 relação ao tratamento controle.

365 Para os parâmetros de digestibilidade *in vitro* da MS e da FDN verificou-se
366 aumentos na digestibilidade pela adição das enzimas lignofibrolíticas nas silagens
367 (Tabela 6). A adição do complexo enzimático na silagem de milho apresentou
368 comportamento quadrático para as DIVMS e DIVFDN, com aumentos de 6 % nos pontos

369 de inflexão, respectivamente, 15,2 mg.kg⁻¹ MN e 21,1 mg.kg⁻¹ MN, em relação ao
370 controle.

371 Na silagem de cana-de-açúcar, a DIVMS apresentou aumento linear de 0,09g para
372 cada mg de adição do complexo enzimático. A DIVFDN da cana-de-açúcar apresentou
373 efeito quadrático, com aumento de 6% no ponto de inflexão (10,6 mg.kg⁻¹ MN) em
374 relação ao tratamento controle. Os efeitos da adição do complexo enzimático na
375 digestibilidade foram, de modo geral, de menor magnitude do que os observados na
376 composição química.

377 A tabela 7 mostra os resultados referentes à produção de gases *in vitro* das
378 silagens de milho e de cana-de-açúcar. Para as frações de rápida degradação da silagem
379 de milho, foram observados aumentos de 70% na produção de gás, em relação ao
380 controle, no ponto de inflexão (11,2 mg.kg⁻¹ MN). A taxa de degradação apresentou
381 aumento linear de 0,004 horas para cada unidade percentual de inclusão do completo
382 enzimático.

383 O tempo de colonização e início da fermentação *in vitro* (lag time), na silagem de
384 milho, reduziu linearmente em 0,02 hora para cada mg de adição do complexo
385 enzimático. As frações de lenta degradação ruminal na silagem de milho apresentaram
386 aumentos de 14% na produção de gás e de 36% na taxa de degradação, respectivamente,
387 nos pontos de inflexão de 19,8 mg.kg⁻¹ MN e 11,2 mg.kg⁻¹ MN em relação ao controle. E
388 a produção cumulativa total de gás na silagem de milho teve aumento de 32% no ponto
389 de inflexão (17,2 mg. kg⁻¹ MN) em relação ao tratamento controle.

390 Na silagem de cana-de-açúcar, houve efeito quadrático na produção de gás para a
391 fração de rápida degradação, com aumento de 18%, no ponto de inflexão 9,8 mg.kg⁻¹ MN
392 do complexo enzimático. O tempo de colonização e início da fermentação *in vitro*
393 diminuiu em 89% , no ponto de inflexão 17,3 mg.kg⁻¹ MN. Para as frações de degradação
394 lenta, houve comportamento quadrático, no ponto de inflexão de 10,2 mg.kg⁻¹ MN, com
395 aumento de 43% na produção de gás e não houve efeito da adição das enzimas sobre a
396 taxa de degradação dessas frações. A produção cumulativa de gases na silagem de cana-
397 de-açúcar aumentou 28% em relação ao controle, no ponto de inflexão 13,79 mg.kg⁻¹
398 MN.

399 Na Tabela 8 estão apresentados, respectivamente, as concentrações de polifenóis
400 e flavonóides e a capacidade antioxidantes das silagens de milho e cana-de-açúcar. Estes
401 parâmetros foram influenciados de forma linear crescente com a adição do complexo
402 enzimático nas concentrações de 0 a 30 mg.kg⁻¹.

403 Na silagem de milho, houve aumento linear de 0,68 mg de polifenóis, 0,06 mg de
404 flavonoides, 3,76 uM da capacidade antioxidante e 0,09mg no poder redutor para cada
405 mg de inclusão do complexo enzimático .

406 Na silagem de cana-de-açúcar, houve aumento linear de 3,97 mg de polifenóis,
407 0,42 mg de flavonoides, 18,18 uM da capacidade antioxidante e 0,47mg no poder redutor
408 para cada mg de inclusão do complexo enzimático.

409

410 **Discussão**

411 A ação das enzimas lignocelulósicas adicionadas na silagem de milho, diminuíram
412 as concentrações dos principais componentes da parede celular, como pode ser observado
413 na recuperação das frações referentes aos carboidratos, apresentado na tabela 2.
414 Observando a recuperação de FDN no tratamento controle (sem adição de enzimas), é
415 possível notar que durante o processo fermentativo, os microrganismos consomem parte
416 dos carboidratos. Porém, quando o complexo enzimático foi adicionado, a degradação da
417 parede celular foi maior durante a fermentação, resultando em aumento na recuperação
418 dos carboidratos não fibrosos.

419 Essas modificações refletiram na composição química das silagens, sendo que a
420 variação na extensão da redução para as diferentes frações da parede celular deve estar
421 relacionada à composição do complexo enzimático (Tabela 1) e à estabilidade das
422 enzimas, que atuam em amplas faixas de pH e temperatura.

423 No processo de digestão da parede celular pelos microrganismos presentes no
424 rúmen, a lignina é considerada um fator limitante devido à sua estreita relação com a
425 celulose e hemicelulose, que cria uma barreira física, dificultando a ação dos
426 microrganismos que degradam essas frações da parede (Hatfield, 1993). As enzimas que
427 atuam sobre a lignina (lacase, Mn peroxidase e lignina peroxidase) representam a menor
428 fração do complexo enzimático (12%). Mesmo assim, a lignina foi a fração que,
429 proporcionalmente, sofreu maior efeito da adição do complexo enzimático, tanto na
430 silagem de milho quanto na silagem de cana-de-açúcar. Provavelmente isso ocorreu
431 devido às características das enzimas que atuam sobre a lignina, que, embora tenham um
432 pH ótimo para exercer o máximo de sua atividade, continuam agindo mesmo em meios
433 mais ácidos, como é o meio dentro do silo, se mostrando mais resistentes nessas
434 condições.

435 A composição monomérica da lignina também foi modificada em ambas as
436 silagens, com adição do complexo enzimático, em que o monômero guaiacil (G)

437 apresentou maior quantidade, seguido pelo siringil (S) e pelo p-hidroxifenil (H).
438 Entretanto, o monômero S teve aumento maior, em relação aos outros monômeros, isso
439 fez com que a razão S/G ficasse maior. Esse aumento na razão S/G sugere que a
440 composição da lignina, após o tratamento enzimático, ficou menos condensada
441 (Medeiros-Neto et al., 2014), o que provavelmente facilitou a entrada dos
442 microrganismos para acessar os componentes nutritivos. Esses resultados estão em
443 concordância com as melhorias observadas nos resultados referentes à DIVMS, DIVFDN
444 e pelo aumento da produção cumulativa de gases, que está diretamente relacionada à
445 degradação do líquido ruminal.

446 É importante ressaltar que, com a diminuição da lignina, seria natural que os
447 monômeros também diminuíssem, o que não ocorreu. Porém, isso pode ter acontecido
448 devido à técnica utilizada para a quantificação monomérica da lignina, que é oxidada pelo
449 nitrobenzeno, entretanto, por se tratar de uma molécula heterogênea, sua oxidação não é
450 completa (Billa et al., 1996). A ação do complexo enzimático pode ter feito com que a
451 lignina ficasse menos condensada e, conseqüentemente, mais exposta à oxidação dos seus
452 monômeros, que ocasionou aumento nas concentrações dos três monômeros
453 identificados.

454 A hidrolise da lignina pode ser o principal fator responsável pela diminuição das
455 outras frações da parede celular, uma vez que sua solubilização pelas enzimas facilitou o
456 acesso das enzimas com ação sobre a celulose e hemicelulose. A diminuição da lignina
457 em 34 % na silagem de milho foi linear. Na silagem de cana-de-açúcar houve redução de
458 12,5 %, e o efeito foi quadrático.

459 A diminuição na fração hemicelulose, em ambas as silagens, está relacionada à
460 quantidade de enzimas que compõem o complexo enzimático, em que 54% dessas
461 enzimas possuem ação sobre a xilana e manana (xilanase e mananase), que são os
462 principais compostos da hemicelulose. Uma outra razão é que a hemicelulose possui
463 cadeias ramificadas, que são mais fáceis de serem quebradas pela ação das enzimas.
464 Além disso, a hemicelulose também está mais intimamente ligada à lignina (Jung, 1989),
465 portanto, o decréscimo na concentração da lignina favoreceu a hidrolise da hemicelulose.

466 A adição do complexo enzimático diminuiu a concentração de celulose das
467 silagens, porém, em escala menor, em relação às outras frações da parede celular,
468 provavelmente por causa do pH mais ácido encontrado no silo. Mesmo as celulasas
469 representando 33% do complexo enzimático utilizado. Os feixes de celulose se
470 apresentam dispersos em uma matriz de hemicelulose e lignina e, para a enzima ter

471 acesso a essa fração, a matriz precisa ser rompida primeiro. Por isso, quando as celulases
472 do complexo enzimático tiveram acesso à celulose, provavelmente o meio já estava se
473 acidificando no silo e a atividade enzimática foi diminuída. A maior atividade da
474 celulase, nas condições experimentais, foi observada em pH 6,0. Além disso, a cadeia da
475 celulose é mais linear, e por isso, mais difícil de ser quebrada, quando comparada à
476 hemicelulose, por exemplo.

477 A diminuição das frações dos carboidratos que compõem a parede celular refletiu
478 em aumento nos carboidratos não fibrosos, modificando a composição dos carboidratos
479 presentes nas silagens. A fração A+B1, que corresponde aos açúcares e amido, aumentou
480 em ambas as silagens. Provavelmente, o aumento dessas frações favorece a produção dos
481 ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), especialmente o propiônico, que, para os
482 ruminantes, é o principal precursor da glicose (Huntington, 1997).

483 A fração B2 é a fração potencialmente degradável, corresponde basicamente à
484 celulose e hemicelulose. A fermentação dessa fração está positivamente relacionada à
485 produção de acetato e, conseqüentemente, a produção de metano, portanto, sua redução
486 pode ser considerada um efeito positivo, quando a produção de propionato é aumentada
487 (Valadares-Filho and Pina, 2009). A fração C, que é indigestível e composta,
488 basicamente, pela lignina e nitrogênio lignificado, também diminuiu em ambas as
489 silagens.

490 A diminuição do NIDA, que representa a fração no nitrogênio ligado à lignina e
491 que é indisponível para os microrganismos do rúmen e, principalmente para o animal, na
492 silagem de milho, foi de 22% e na silagem de cana-de-açúcar, a redução foi de 57 %. Isso
493 sugere que a ação do complexo enzimático sobre a lignina, além das alterações na
494 composição química da parede celular das silagens, pode reduzir a excreção do nitrogênio
495 indisponível e aumentar a retenção do N pelo animal.

496 Os resultados supracitados influenciaram, diretamente, na digestibilidade *in vitro*
497 da matéria seca e da FDN, que, na silagem de milho aumentaram 6,70 % e 8,3%
498 respectivamente e na silagem de cana-de-açúcar aumentaram 6,2 % e 6,1%.

499 O aumento de 32% na produção cumulativa de gás total *in vitro* para a silagem de
500 milho, no ponto de inflexão em relação ao tratamento controle é representado,
501 principalmente, pelos aumentos na produção cumulativa de gás da fração de rápida
502 degradação. A taxa de degradação dessa fração, aliada à redução do tempo de
503 colonização, pode ter refletido no aumento da produção de propionato. Estes dados da
504 produção de gás estão respaldados na composição química, em que houve redução dos

505 teores de FDN e da lignina e aumento nos teores de CNF e da fração A+B1 dos
506 carboidratos com adição de enzimas. Os valores observados estão na mesma magnitude.

507 Entretanto, para a silagem de cana-de-açúcar embora houvesse aumentos
508 expressivos na produção cumulativa de gás total de 28% e no tempo de colonização, a
509 contribuição da produção de gás da fração de lenta degradação foi maior que a da fração
510 de rápida degradação. Para a fração de lenta degradação o aumento foi de 42% e a de
511 rápida degradação o aumento foi de 18% nos seus respectivos pontos de inflexão. Ainda
512 que positivos todos estes aumentos, pode-se inferir que a produção de propionato seria
513 menor em relação ao acetato, para o tipo de fibra presente na silagem de cana-de-açúcar.

514 O tempo de colonização diminuiu 99% na silagem de milho e 88% na silagem de
515 cana-de-açúcar com a adição do complexo de enzimas lignocelulolíticas. Esse parâmetro
516 está relacionado com a degradação ruminal dos alimentos e, provavelmente, é um dos
517 responsáveis pelo aumento nas taxas de degradação. Além disso, uma diminuição no
518 tempo de colonização, pode aumentar a taxa de passagem ruminal, que é um dos
519 parâmetros mais importantes que influenciam a ingestão de alimentos (Valadares-Filho
520 and Pina, 2009).

521 Corroborando com os resultados obtidos neste trabalho, foi observado aumento na
522 digestibilidade da forragem quando se utilizou uma mistura de enzimas fibrolíticas
523 comerciais (Jalilvand *et al.*, 2008). Além disso, a utilização de cana-de-açúcar inoculada
524 com *Pleurotus sapidus* resultou em aumento na produção total de gás, melhoria na
525 digestibilidade e nos parâmetros fermentativos da silagem (Acero *et al.*, 2008). Também
526 foi observado que a adição de níveis de enzimas fibrolíticas (0, 5, 10 e 20 mg de enzimas
527 por kg de matéria natural) sobre a composição bromatológica da silagem de milho não
528 alterou o conteúdo de MS da silagem, porém foi observado aumento da proteína bruta de
529 8,77% no tratamento controle para 10,14% no nível de 20 mg e redução da FDN, de
530 49,96% no tratamento controle para 47,25% no nível de 10 mg (Cysneiros *et al.*, 2006).

531 Com relação aos compostos antioxidantes, a adição do complexo enzimático em
532 ambas as silagens, aumentou a concentração dos polifenóis e flavonoides, tal aumento
533 pode ser indicativo dos monômeros provenientes da degradação da lignina, pois os
534 monômeros possuem grupamento fenol na estrutura, podendo ser responsivos aos
535 reagentes Folin-Ciocalteu e cloreto de alumínio, comumente utilizados na quantificação
536 dessas moléculas.

537 A capacidade antioxidante, que indica a presença de compostos capazes de reduzir
538 o radical ABTS[•] na amostra, possivelmente os monômeros de lignina, teve um aumento

539 linear de 3,76 uM e 18,18 uM para cada mg de aumento na inclusão do complexo
540 enzimático nas silagens de milho e cana-de-açúcar, respectivamente . Embora os valores
541 absolutos sejam maiores na silagem de cana-de-açúcar, a degradação da lignina aumentou
542 a capacidade antioxidante em maior dimensão na silagem de milho. Na concentração de
543 20mg.kg⁻¹ MN, a silagem de milho aumentou em 56% sua capacidade antioxidante vs 14
544 % de aumento na silagem de cana-de-açúcar em relação ao tratamento controle.

545 O poder redutor apresentou aumentos lineares de 0,09 mg e 0,47mg para cada mg
546 de aumento na inclusão do complexo enzimático nas silagens de milho e cana-de-açúcar,
547 respectivamente. Essa análise reflete a habilidade para reduzir íons férricos, e é
548 relacionado à quantidade de compostos fenólicos em uma amostra (Zhu *et al.*, 2002).
549 Assim, esses resultados confirmam a ação do complexo enzimático na liberação de
550 monômeros da lignina.

551

552 **Conclusão**

553 A adição do complexo enzimático lignocelulolítico tem efeito sobre a parede
554 celular das silagens de milho e de cana de açúcar, com decréscimos, em especial, na
555 concentração de lignina e no tempo de colonização de partícula e aumentos na produção
556 de gases *in vitro* e na digestibilidade *in vitro* da matéria seca e da fibra em detergente
557 neutro. Também há aumento da capacidade antioxidante e dos compostos fenólicos tanto
558 da silagem de milho quanto da silagem de cana-de-açúcar.

559 Na silagem de milho as melhores respostas são observadas na concentração de 20
560 mg.kg⁻¹ MN. Na silagem de cana-de-açúcar, os resultados são melhores na concentração
561 de 10 mg.kg⁻¹ MN.

562

563 **Referências bibliográficas**

- 564 Acero, A. P., M. M. Mayo, L. A. M. Romero, M. D. M. Rivas, R. B. Gama, and O. Loera.
565 2008. Ventajas De La Fermentación Sólida Con *Pleurotus Sapidus* En Ensilajes
566 De Caña De Azúcar. *Revista Archivos De Zootecnia* 57(217):25 - 33.
- 567 AOAC. 1990. *Official Methods of Analysis*. AOAC, Washington, DC, USA.
- 568 Billa, E., M. T. Tollier, and B. Monties. 1996. Characterization of the monomeric
569 composition of in situ wheat straw lignins by alkaline nitrobenzene oxidation:
570 effect of temperature and reaction time. *Journal of the Science of Food and*
571 *Agriculture* 72:250 - 256.
- 572 Boudet, A.-M. 2007. Evolution and current status of research in phenolic compounds.
573 *Phytochemistry* 68(22-24):2722-2735.
- 574 Cysneiros, C. d. S. S., G. L. Franco, C. J. Ulhoa, J. M. d. S. Diogo, and A. K. B. Ramos.
575 2006. Efeito de enzimas fibrolíticas sobre a composição química da silagem de
576 milho. *Ciência Animal Brasileira* 7(4):339 - 334.
- 577 Hatfield, R. D. 1993. Cell Wall Polysaccharide Interactions and Degradability. In: H. G.
578 JUNG, D. R. BUXTON and R. D. HATFIELD, editors, *Forage Cell Wall*
579 *Structure and Digestibility*. American Society of Agronomy, Crop Sci. Society of
580 America, Soil Sci. Society of America, Madison. p. 315 - 346.
- 581 Holden, L. A. 1999. Comparison of methods of in vitro dry matter digestibility for ten
582 feeds. *Journal of Dairy Science* 82(8):1791 - 1794.
- 583 Huntington, G. B. 1997. Starch utilization by ruminants: from basics to the bunk. *Journal*
584 *of animal science* 75(3):852-867.
- 585 Jalilvand, G., A. Naserian, E. Kebreab, N. E. Odongo, R. Valizadeh, F. E. Shahroodi, S.
586 Lopez, and J. Francex. 2008. Rumen Degradation Kinetics Of Alfalfa Hay, Maize
587 Silage And Wheat Straw Treated With Fibrolytic Enzymes. *Revista Archivos De*
588 *Zootecnia* 57:155 - 164.
- 589 Jung, H. G. 1989. Forage Lignins and Their Effects on Fiber Digestibility. *Agronomy*
590 *Journal* 81:33-38.
- 591 Loures, D. R. S., L. G. Nussio, S. d. F. Paziani, A. d. F. Pedroso, L. J. Mari, J. L. Ribeiro,
592 M. Zopollatto, P. Schmidt, M. C. Junqueira, I. U. Packer, and F. P. d. Campos.
593 2005. Efeito de enzimas fibrolíticas e do teor de matéria seca em silagens de
594 capim-tanzânia sobre os parâmetros ruminais, o comportamento ingestivo e a
595 digestão de nutrientes, em bovinos. *Revista Brasileira de Zootecnia* 34(3):736 -
596 745.
- 597 Martins, A. d. S., P. F. Vieira, T. T. Berchielli, I. N. d. Prado, and J. L. Moletta. 2006.
598 Consumo e digestibilidade aparente total em bovinos sob suplementação com
599 enzimas fibrolíticas. *Revista Brasileira de Zootecnia* 35(5):2118 - 2124.
- 600 Medeiros-Neto, P. N. d., E. d. Oliveira, and J. B. Paes. 2014. Relações entre as
601 características da madeira e do carvão vegetal de duas espécies da caatinga.
602 *Floresta e Ambiente* 21(4):484-493.
- 603 Mertens, D. R. 2002. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent
604 fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: collaborative study. *Journal*
605 *of AOAC INTERNATIONAL* Main 85:1217 - 1240.
- 606 Paul, S. S., and D. Lal. 2010. *Nutrient Requirements of buffaloes*. Satish Serial
607 Publishing House, Azadpur, Dellhi
- 608 Pouteau, E. B., I. E. Monnard, C. Piguet-Welsch, M. J. A. Groux, L. Sagalowicz, and A.
609 Berger. 2003. Non-esterified plant sterols solubilized in low fat milks inhibit
610 cholesterol absorption: A stable isotope double-blind crossover study. *European*
611 *Journal of Nutrition* 42:154 - 164.

- 612 Rufino, M. d. S. M., R. E. Alves, E. S. d. Brito, S. M. d. Moraes, C. d. G. Sampaio, J.
613 Pérez-Jiménez, and F. D. Saura-Calixto. 2007. Metodologia Científica:
614 Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical
615 Livre ABTS +. In: Embrapa (ed.). Embrapa, Fortaleza.
- 616 Sánchez, N., S. Miranda, P. Vit, and A. Rodriguez-Malaver. 2010. Propolis protect
617 against oxidative stress in human saliva. *Journal of ApiProduct & ApiMedical*
618 *Science* 2:72 - 76.
- 619 Santos, N. W., G. T. D. Santos, D. C. Silva-Kazama, P. A. Grande, P. M. Pintro, F. E. d.
620 Marchi, C. C. Jobim, and H. V. Petit. 2014. Production, composition and
621 antioxidants in milk of dairy cows fed diets containing soybean oil and grape
622 residue silage. *Livestock Science* 159:37 - 45.
- 623 Schofield, P., J. R. E. Pitt, and A. N. Pel. 1994. Kinetics of Fiber Digestion from In Vitro
624 Gas Production *Journal of animal science* 72:2980 - 2991.
- 625 Silva, D. J., and A. C. d. Queiroz. 2002. Análise de Alimentos - Métodos químicos e
626 biológicos. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- 627 Singleton, V. L., and J. A. Rossi. 1965. A. Colorimetry of total phenolics with
628 phosphomolybdc-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology*
629 *and Viticulture* 16:144 - 158.
- 630 Sniffen, C. J., J. D. O'Connor, P. J. V. Soest, D. G. Fox, and J. B. Russell. 1992. A net
631 carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and
632 protein availability. *Journal of animal science* 70(11):3562 - 3577.
- 633 Tilley, J. M. A., and R. A. Terry. 1963. A Two-Stage Technique For The In Vitro
634 Digestion Of Forage Crops. *Journal of the British Grassland Society* 18(2):104 -
635 111.
- 636 Valadares-Filho, S. d. C., and D. d. S. Pina. 2009. Fermentação Ruminal. In: FUNEP,
637 editor, *Nutrição de Ruminantes*, Jaboticabal. p. 161 -189.
- 638 Van-Soest, P. J., and R. H. Wine. 1968. The determination of lignin and cellulose in
639 acid-detergent fibre with permanganate. *Journal of the Association of Official*
640 *Analytical Chemists* 52:780 - 785.
- 641 Varga, G. A., and E. S. Kolver. 1997. Microbial and Animal Limitations to Fiber
642 Digestion and Utilization. *Journal of Nutrition* 127:819 - 823.
- 643 Woisky, R. G., and A. Salatino. 1998. Analysis of propolis: some parameters and
644 procedures for chemical quality control. *Journal of Apicultural Research* 37:99 -
645 105.
- 646 Zhu, Q. y., R. m. Hackman, J. l. Ensunsa, R. r. Holt, and C. l. Keen. 2002. Antioxidative
647 Activities of Oolong Tea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:6929 -
648 6934.
- 649 Zopollatto, M., J. L. P. Daniel, and L. G. Nussio. 2009. Aditivos microbiológicos em
650 silagens no Brasil: revisão dos aspectos da ensilagem e do desempenho de
651 animais. *Revista Brasileira de Zootecnia* 38:170 - 189.
- 652
653
654

655 Tabela 1. Composição do complexo de enzimas (% em relação às 6 enzimas
656 avaliadas) produzido pelo fungo da podridão branca utilizadas nas silagens

| Enzima | % |
|---------------------|-------|
| Lacase | 8,22 |
| Manganês peroxidase | 2,72 |
| Lignina peroxidase | 1,38 |
| Celulase | 33,22 |
| Mananase | 20,68 |
| Xilanase | 33,77 |

657

658

Tabela 2. Recuperação das frações (%) dos carboidratos das silagens tratadas com complexo enzimático lignocelulolítico.

| Parâmetros | Concentrações (mg.kg ⁻¹ MN) | | | | EPM | P | |
|----------------------------|--|-------|-------|-------|-------|--------|------------|
| | 0 | 10 | 20 | 30 | | Linear | Quadrático |
| Silagem de milho | | | | | | | |
| Fibra em detergente neutro | 74,1 | 69,4 | 60,8 | 56,2 | 7,78 | <0,01 | 0,11 |
| Carboidratos totais | 93,8 | 93,9 | 91,1 | 89,5 | 4,40 | 0,02 | 0,20 |
| Carboidratos não fibrosos | 99,8 | 106 | 110 | 116 | 8,40 | <0,01 | 0,10 |
| Celulose | 94,9 | 85,9 | 82,7 | 83,2 | 2,24 | 0,21 | 0,02 |
| Hemicelulose | 54,7 | 51,5 | 48,4 | 45,3 | 8,86 | 0,01 | 0,16 |
| Lignina (LSBA) | 84,1 | 66,4 | 54,0 | 54,3 | 1,65 | 0,02 | 0,07 |
| Silagem de cana-de-açúcar | | | | | | | |
| Fibra em detergente neutro | 77,77 | 68,70 | 67,42 | 69,67 | 14,95 | 0,08 | 0,02 |
| Carboidratos totais | 77,27 | 74,56 | 72,16 | 74,00 | 3,62 | 0,12 | 0,01 |
| Carboidratos não fibrosos | 82,46 | 83,67 | 90,81 | 94,47 | 6,66 | 0,01 | 0,24 |
| Celulose | 85,89 | 77,58 | 78,14 | 80,16 | 5,62 | 0,14 | 0,02 |
| Hemicelulose | 63,93 | 47,24 | 42,28 | 47,32 | 6,36 | 0,21 | 0,01 |
| Lignina (LSBA) | 81,26 | 69,51 | 66,92 | 69,09 | 2,84 | 0,21 | 0,03 |

Lignina (LSBA): lignina determinada pela reação com brometo de acetila; EPM: Erro padrão médio.

659

660

Tabela 3. Composição química e fracionamento dos carboidratos (g.Kg⁻¹) da silagem de milho (g.kg⁻¹) tratada com complexo enzimático lignocelulolítico.

| Parâmetros | Tratamentos | | | | EPM | P | | | | |
|----------------------------------|-------------|------|------|------|------|--------|------------|--|-----------------------|------|
| | 0 | 10 | 20 | 30 | | Linear | Quadrático | ER | R ² | PI |
| pH | 3,63 | 3,71 | 3,71 | 3,60 | 0,10 | 0,20 | 0,22 | - | - | - |
| Matéria seca | 316 | 317 | 305 | 305 | 0,33 | <0,01 | <0,01 | Y = -0,04trat ² - 0,034trat + 31,69 | R ² = 0,73 | 20,3 |
| Matéria orgânica | 972 | 970 | 967 | 963 | 0,09 | 0,10 | 0,21 | - | - | - |
| Proteína Bruta | 64,0 | 63,2 | 67,4 | 67,5 | 0,08 | 0,56 | 0,10 | - | - | - |
| NIDA | 1,98 | 1,79 | 1,53 | 1,60 | 0,42 | 0,06 | 0,01 | Y = 0,06trat ² - 0,032trat + 1,99 | R ² = 0,93 | 22,3 |
| Extrato Etéreo | 24,4 | 21,1 | 21,4 | 21,2 | 0,05 | 0,88 | 0,37 | - | - | - |
| Fibra em detergente neutro (FDN) | 497 | 473 | 434 | 439 | 0,98 | <0,01 | <0,01 | Y = 0,074trat ² - 0,43trat + 39,93 | R ² = 0,93 | 19,8 |
| FDN indigestível | 85,6 | 63,6 | 52,0 | 51,3 | 0,94 | 0,02 | 0,01 | Y = 0,057trat ² - 2,89trat + 75,89 | R ² = 0,99 | 18,4 |
| Fibra em detergente ácido | 302 | 282 | 260 | 272 | 0,42 | 0,01 | 0,19 | Y = -0,081trat ² - 3,56trat + 248,0 | R ² = 0,94 | 20,2 |
| Carboidratos totais | 884 | 886 | 879 | 875 | 0,13 | <0,01 | 0,09 | Y = -0,034trat + 88,59 | R ² = 0,77 | - |
| Carboidratos não fibrosos | 423 | 440 | 478 | 468 | 1,09 | <0,01 | 0,05 | Y = -0,089trat ² + 0,44trat + 48,5 | R ² = 0,94 | 20,1 |
| Celulose | 217 | 214 | 204 | 215 | 0,60 | 0,36 | <0,01 | Y = 0,08trat ² - 0,082trat + 22,63 | R ² = 0,89 | 20,5 |
| Hemicelulose | 195 | 191 | 174 | 167 | 1,26 | <0,01 | <0,01 | Y = -1,0076trat + 152,08 | R ² = 0,93 | - |
| Lignina (LSBA) | 85,2 | 67,5 | 56,1 | 57,1 | 3,83 | <0,01 | 0,10 | Y = -0,0957trat + 8,08 | R ² = 0,83 | - |
| Lignina (LSPP) | 66,4 | 49,5 | 36,8 | 36,9 | 2,78 | <0,01 | 0,10 | Y = -0,1012trat + 6,25 | R ² = 0,87 | - |
| Lignina (ácida) | 53,7 | 37,6 | 29,7 | 29,2 | 2,51 | 0,02 | 0,09 | Y = -0,814x + 49,76 | R ² = 0,84 | - |
| Fração A+B1 | 558 | 583 | 639 | 647 | 0,98 | <0,01 | 0,07 | Y = 0,3523trat + 54,38 | R ² = 0,98 | - |
| Fração B2 * ¹ | 352 | 351 | 306 | 298 | 0,98 | <0,02 | 0,06 | Y = -0,2078trat + 35,80 | R ² = 0,86 | - |
| Fração C * ¹ | 90,1 | 65,7 | 54,3 | 55,4 | 1,12 | <0,03 | 0,08 | Y = -0,1468trat + 8,51 | R ² = 0,85 | - |

661 EPM – Erro padrão médio; *Fração calculada com base na lignina obtida por meio da análise com brometo de acetila; ¹- valores expressos em função dos carboidratos totais;
662 Lignina (LSBA): lignina determinada pela oxidação com brometo de acetila; Lignina (LSPP): lignina determinada pela oxidação com permanganato de potássio; Lignina ácida:
663 lignina determinada com ácido sulfúrico 12M; ER – Equação de regressão; PI – Ponto de inflexão.

Tabela 4. Composição química e fracionamento dos carboidratos da silagem de cana-de-açúcar (g.kg-1) tratada com complexo enzimático lignocelulolítico.

| Parâmetros | Tratamentos | | | | EPM | P | | ER | R ² | PI |
|----------------------------------|-------------|------|------|------|------|--------|------------|--|-----------------------|-------|
| | 0 | 10 | 20 | 30 | | Linear | Quadrático | | | |
| pH | 3,45 | 3,45 | 3,48 | 3,48 | 0,01 | 0,25 | 0,41 | - | - | - |
| Matéria seca | 269 | 259 | 255 | 260 | 0,33 | 0,24 | 0,23 | - | - | - |
| Matéria orgânica | 972 | 968 | 967 | 964 | 0,07 | 0,08 | 0,09 | - | - | - |
| Proteína Bruta | 34,6 | 38,7 | 39,0 | 39,9 | 0,06 | 0,05 | 0,12 | Y = 0,01trat + 3,56 | R ² = 0,78 | - |
| NIDA | 0,72 | 0,54 | 0,31 | 0,37 | 0,03 | 0,02 | 0,03 | Y = 0,006trat ² - 0,03trat + 0,74 | R ² = 0,94 | 18,7 |
| Extrato Etéreo | 17,2 | 16,9 | 16,9 | 16,6 | 0,49 | 0,22 | 0,23 | - | - | - |
| Fibra em detergente neutro (FDN) | 669 | 623 | 629 | 630 | 0,31 | 0,01 | 0,01 | Y = 0,01trat ² - 0,46trat + 49,44 | R ² = 0,88 | 10,9 |
| FDN indigestível | 143 | 134 | 133 | 134 | 0,53 | 0,03 | 0,01 | Y = 0,02trat ² - 1,08trat + 142,9 | R ² = 0,96 | 10,6 |
| Fibra em detergente ácido | 412 | 382 | 390 | 389 | 0,13 | 0,01 | 0,19 | Y = 0,072trat ² - 0,27trat + 32,9 | R ² = 0,79 | 10,7 |
| Carboidratos totais | 920 | 913 | 911 | 907 | 0,61 | <0,01 | <0,01 | Y = -0,039trat + 91,89 | R ² = 0,90 | - |
| Carboidratos não fibrosos | 251 | 290 | 283 | 277 | 0,3 | <0,01 | 0,02 | Y = -0,02trat ² + 0,15trat + 46,5 | R ² = 0,81 | 10,5 |
| Celulose | 302 | 286 | 294 | 293 | 0,28 | 0,03 | 0,06 | Y = 0,06trat ² - 0,26trat + 31,84 | R ² = 0,77 | 10,3 |
| Hemicelulose | 257 | 241 | 239 | 241 | 1,79 | <0,01 | <0,01 | Y = -0,0505trat + 16,0 | R ² = 0,57 | - |
| Lignina (LSBA) | 110 | 96,7 | 96,1 | 96,3 | 1,64 | <0,01 | <0,01 | Y = 0,03trat ² - 0,14trat + 10,94 | R ² = 0,94 | 15,4 |
| Lignina (LSPP) | 91,2 | 78,7 | 76,7 | 76,1 | 1,14 | 0,01 | 0,01 | Y = 0,03trat ² - 0,136trat + 9,07 | R ² = 0,97 | 23,2 |
| Lignina (ácida) | 78,3 | 65,7 | 63,8 | 63,2 | 1,19 | <0,01 | <0,01 | Y = 0,02trat ² - 1,37trat + 87,87 | R ² = 0,97 | 21,65 |
| Fração A+B1 ¹ | 320 | 373 | 374 | 368 | 0,93 | 0,01 | 0,02 | Y = -0,01trat ² + 0,48trat + 45,8 | R ² = 0,91 | 11,3 |
| Fração B2 * ¹ | 529 | 486 | 488 | 494 | 0,8 | 0,02 | 0,02 | Y = 0,012trat ² - 0,46trat + 52,7 | R ² = 0,92 | 11,9 |
| Fração C * ¹ | 151 | 141 | 137 | 139 | 0,1 | 0,08 | 0,02 | Y = 0,069trat ² - 0,29trat + 13,2 | R ² = 0,95 | 12,7 |

EPM – Erro padrão médio; *Fração calculada com base na lignina obtida por meio da análise com brometo de acetila; ¹- valores expressos em função dos carboidratos totais; Lignina (LSBA): lignina determinada pela oxidação com brometo de acetila; Lignina (LSPP): lignina determinada pela oxidação com permanganato de potássio; Lignina ácida: lignina determinada com ácido sulfúrico 12M; ER – Equação de regressão; PI – Ponto de inflexão

Tabela 5. Composição monomérica (ug/mg de parede celular isenta de proteína) das silagens de milho e cana-de-açúcar tratadas com níveis crescentes de enzimas lignocelulolíticas

| Parâmetros | Tratamentos | | | | EPM | P | | ER | R ² | PI |
|---------------------------|-------------|--------|--------|--------|------|--------|------------|--|-----------------------|------|
| | 0 | 10 | 20 | 30 | | Linear | Quadrático | | | |
| Silagem de milho | | | | | | | | | | |
| p-Hidroxifenil (H) | 36,47 | 43,65 | 47,87 | 52,28 | 2,02 | 0,02 | 0,15 | Y = 0,516trat + 37,31 | R ² = 0,98 | - |
| Guaiacil (G) | 107,02 | 151,84 | 153,02 | 154,64 | 6,93 | 0,01 | 0,21 | Y = 1,44trat + 120,02 | R ² = 0,64 | - |
| Siringil (S) | 46,14 | 95,67 | 97,27 | 100,08 | 7,75 | 0,02 | 0,17 | Y = 1,6341trat + 60,28 | R ² = 0,66 | - |
| S/G | 0,43 | 0,63 | 0,64 | 0,65 | 0,03 | 0,02 | 0,24 | Y = 0,0065trat + 0,48 | R ² = 0,66 | - |
| Silagem de cana-de-açúcar | | | | | | | | | | |
| p-Hidroxifenil (H) | 74,22 | 126,59 | 146,75 | 83,53 | 3,46 | 0,01 | 0,02 | Y = -0,289trat ² + 9,14trat + 71,66 | R ² = 0,96 | 17,8 |
| Guaiacil (G) | 181,97 | 207,25 | 225,48 | 221,51 | 1,97 | 0,02 | 0,02 | Y = -0,0731trat ² + 3,56trat + 181,2 | R ² = 0,99 | 19,7 |
| Siringil (S) | 116,00 | 221,51 | 279,30 | 234,46 | 6,91 | 0,01 | 0,01 | Y = -0,3759trat ² + 15,40trat + 113,2 | R ² = 0,98 | 18,9 |
| S/G | 0,64 | 1,07 | 1,24 | 1,06 | 0,08 | 0,03 | 0,02 | Y = -0,0015trat ² + 0,060trat + 0,633 | R ² = 0,99 | 19,5 |

EPM – Erro padrão médio; ER – Equação de regressão; PI – Ponto de inflexão.

Tabela 6. Digestibilidade *in vitro* (g.kg^{-1} MS) da matéria seca (DIVMS) e da fibra em detergente neutro (DIVFDN) das silagens tratadas com complexo enzimático lignocelulolítico.

| Parâmetros | Tratamentos | | | | EPM | P | | ER | R ² | PI |
|---------------------------|-------------|--------|--------|--------|------|--------|------------|--|-----------------------|-------|
| | 0 | 10 | 20 | 30 | | Linear | Quadrático | | | |
| Silagem de milho | | | | | | | | | | |
| DIVMS | 596,11 | 631,16 | 636,07 | 630,82 | 0,47 | <0,01 | <0,01 | Y = -0,0101trat ² + 0,4112trat + 59,711 | R ² = 0,98 | 15,20 |
| DIVFDN | 536,15 | 541,78 | 580,43 | 565,21 | 0,60 | 0,40 | 0,05 | Y = -0,0052trat ² + 0,2822trat + 53,181 | R ² = 0,70 | 21,10 |
| Silagem de cana de açúcar | | | | | | | | | | |
| DIVMS | 552,81 | 591,06 | 587,48 | 585,76 | 0,52 | 0,01 | 0,11 | Y = 0,0953trat + 56,498 | R ² = 0,47 | - |
| DIVFDN | 350,92 | 381,58 | 378,34 | 378,75 | 0,48 | 0,02 | 0,03 | Y = -0,0076trat ² + 0,3072trat + 45,28 | R ² = 0,88 | 10,60 |

EPM – Erro padrão médio; ER – Equação de regressão; PI – Ponto de inflexão.

Tabela 7. Produção cumulativa de gases in vitro das silagens tratadas com complexo enzimático lignocelulolítico.

| Parâmetros | Tratamentos | | | | EPM | P | | ER | R ² | PI |
|---------------------------|-------------|-------|-------|-------|-------|--------|------------|---|-----------------------|-------|
| | 0 | 10 | 20 | 30 | | Linear | Quadrático | | | |
| Silagem de milho | | | | | | | | | | |
| A (mL/100 mg MS) | 5,58 | 9,92 | 9,51 | 8,50 | 0,32 | 0,64 | 0,01 | $Y = 0,0121.\text{trat}^2 + 0,430.\text{trat} + 6,29$ | R ² = 0,82 | 11,20 |
| B (/hora) | 0,11 | 0,19 | 0,25 | 0,25 | 0,01 | 0,00 | 0,11 | $Y = 0,0040.\text{trat} + 0,146$ | R ² = 0,80 | - |
| Lag (hora) | 1,41 | 0,05 | 0,01 | 0,01 | 0,02 | 0,00 | 0,46 | $Y = -0,0278.\text{trat} + 0,588$ | R ² = 0,63 | - |
| D (mL/100 mg MS) | 12,2 | 11,7 | 14,0 | 11,1 | 0,32 | 0,04 | <0,01 | $Y = -0,0081.\text{trat}^2 + 0,269.\text{trat} + 10,83$ | R ² = 0,99 | 19,80 |
| E (/hora) | 0,03 | 0,04 | 0,04 | 0,04 | 0,01 | 0,27 | 0,01 | $Y = -0,00002.\text{trat}^2 + 0,00103.\text{trat} + 0,02$ | R ² = 0,86 | 11,20 |
| Total (mL/100 mg MS) | 17,8 | 21,6 | 23,5 | 16,6 | 0,44 | 0,31 | <0,01 | $Y = -0,0203.\text{trat}^2 + 0,7006.\text{trat} + 17,12$ | R ² = 0,93 | 17,20 |
| Silagem de cana de açúcar | | | | | | | | | | |
| A (mL/100 mg MS) | 10,6 | 12,5 | 10,4 | 9,6 | 0,30 | 0,07 | 0,02 | $Y = -0,0075.\text{trat}^2 + 0,184.\text{trat} + 10,71$ | R ² = 0,76 | 9,80 |
| B (/hora) | 0,24 | 0,31 | 0,32 | 0,26 | 0,02 | 0,34 | 0,08 | - | - | - |
| Lag (hora) | 0,009 | 0,005 | 0,001 | 0,003 | 0,001 | 0,02 | 0,04 | $Y = -0,0095.\text{trat}^2 - 0,0002.\text{trat} + 0,105$ | R ² = 0,93 | 17,30 |
| D (mL/100 mg MS) | 7,32 | 10,49 | 8,28 | 6,80 | 0,32 | 0,19 | <0,01 | $Y = -0,012.\text{trat}^2 + 0,374.\text{trat} + 7,51$ | R ² = 0,82 | 10,20 |
| E (/hora) | 0,04 | 0,04 | 0,03 | 0,04 | 0,00 | 0,38 | 0,20 | - | - | - |
| Total (mL/100 mg MS) | 17,9 | 22,9 | 18,7 | 16,4 | 0,57 | 0,09 | <0,01 | $Y = -0,0201689.\text{trat}^2 + 0,53.\text{trat} + 18,22$ | R ² = 0,79 | 13,79 |

EPM: Erro padrão médio; A: volume de gás das frações de degradação rápida (açúcares solúveis e amido); B: taxa de degradação por hora da fração rápida; Lag: tempo de colonização e início de fermentação em horas; D: volume de gás das frações de degradação lenta (celulose e hemicelulose); E: taxa de degradação por hora da fração lenta; Total : produção cumulativa de gases in vitro (mL/100 mg MS incubada); ER – Equação de regressão; PI – Ponto de inflexão.

Tabela 8. Polifenóis, flavonóides, capacidade antioxidante e poder redutor de silagens tratadas com tratada com complexo enzimático lignocelulolítico.

| Parâmetros | Tratamentos | | | | EPM | P | | ER | R ² |
|------------------------------|-------------|---------|---------|---------|-------|--------|------------|------------------------|-----------------------|
| | 0 | 10 | 20 | 30 | | Linear | Quadrático | | |
| Silagem de milho | | | | | | | | | |
| Polifenóis (mg/100g) | 77,91 | 79,92 | 91,49 | 96,96 | 3,66 | 0,01 | 0,15 | Y = 0,684trat + 76,26 | R ² = 0,93 |
| Flavonoides (mg/100g) | 9,04 | 9,71 | 10,03 | 11,17 | 0,35 | <0,01 | 0,12 | Y = 0,066trat + 8,98 | R ² = 0,94 |
| Capacidade antioxidante (uM) | 135,03 | 153,02 | 211,30 | 241,11 | 19,81 | 0,02 | 0,21 | Y = 3,762trat + 128,64 | R ² = 0,96 |
| Poder redutor (mg/100g) | 13,38 | 13,68 | 14,25 | 16,43 | 0,65 | 0,03 | 0,17 | Y = 0,097trat + 12,98 | R ² = 0,82 |
| Silagem de cana de açúcar | | | | | | | | | |
| Polifenóis (mg/100g) | 412,83 | 474,71 | 501,34 | 536,37 | 20,87 | 0,01 | 0,16 | Y = 3,972trat + 421,72 | R ² = 0,96 |
| Flavonoides (mg/100g) | 34,70 | 35,20 | 40,90 | 46,80 | 2,62 | 0,01 | 0,27 | Y = 0,42trat + 33,1 | R ² = 0,91 |
| Capacidade antioxidante (uM) | 2961,60 | 3042,20 | 3401,70 | 3448,00 | 98,85 | <0,01 | 0,19 | Y = 18,18trat + 2940,6 | R ² = 0,90 |
| Poder redutor (mg/100g) | 55,90 | 60,70 | 65,30 | 70,10 | 2,44 | <0,01 | 0,14 | Y = 0,472trat + 55,92 | R ² = 0,99 |

1 **III. Efeito da ação de enzimas lignocelulolíticas provenientes do fungo da podridão**
2 **branca em fontes de alimentos ricos em fibra**

3

4 *(Tropical Animal Health and Production)*

5

6

Resumo

7 Objetivou-se avaliar o efeito da adição de um complexo enzimático
8 lignocelulolítico em alimentos ricos em fibras, com a intenção de simular um pré
9 tratamento dos alimentos antes de fornecer aos animais. Foram utilizados silagem
10 da planta inteira de milho, cana de açúcar integral, feno de coast cross e palha de
11 arroz tratadas com o equivalente a 20 mg.kg⁻¹ de matéria natural (MN) de um
12 complexo enzimático.lignocelulolítico. O complexo enzimático ficou em contato
13 com as amostras moídas a 1 mm durante 30 minutos e posteriormente foram
14 realizadas as análises químicas e os ensaios *in vitro* para determinação da
15 digestibilidade da matéria seca (DIVMS) e da fibra em detergente neutro
16 (DIVFDN). O tratamento enzimático não alterou os teores de MS, MO, PB, EE,
17 carboidratos totais e a fração B2 dos carboidratos presentes na parede celular em
18 nenhum dos alimentos avaliados. Entretanto, em todos os alimentos, houve
19 diminuição (P< 0,05) nos teores de FDN, FDA, lignina, celulose e na fração C
20 (indisponível) dos carboidratos. Aumentos significativos nos teores de
21 hemicelulose, nos carboidratos não fibrosos e na fração A+B1 dos carboidratos
22 (solúveis) foram registrados. A adição do complexo enzimático lignocelulolítico
23 por 30 minutos sobre os alimentos aumentou a DIVMS e a DIVFDN de todas as
24 fontes de fibras testadas.

25 **Palavras chave:** cana-de-açúcar, feno de coast cross, palha de arroz, silagem de
26 milho, lignina, parede celular.

27

28 **Introdução**

29 Na produção de ruminantes, parte das exigências nutricionais é atendida por
30 alimentos ricos em fibras que, por meio da fermentação anaeróbia, fornecem energia
31 para os animais, além de estimular a mastigação e ruminação. Entretanto as fontes
32 alimentares ricas em fibras de difícil digestão pode limitar a ingestão de alimentos e
33 prejudicar o desempenho animal (Van Soest, 1994).

34 Desse modo, para aumentar a oferta de alimentos mais digestíveis tem-se
35 procurado diferentes alternativas. Neste cenário, surgem os aditivos enzimáticos, que
36 são muito usuais nas dietas de animais não ruminantes, porém, em dieta de ruminantes
37 ainda são modestos e os resultados variáveis.

38 A razão enzima:substrato e a degradação da enzima por proteases ruminais
39 parece ser o efeito mais limitante quando enzimas exógenas são adicionadas as dietas.
40 Entretanto, os resultados de Gomez-Velazquez (2003) mostraram viável o uso de
41 enzimas microbianas celulolíticas exógenas para incrementar a digestibilidade da fibra.

42 Segundo Aguiar (2011) os fungos da podridão branca produzem uma variedade
43 de enzimas extracelulares que atuam sinergicamente e eficientemente na degradação da
44 lignina. Essas enzimas podem ser utilizadas de várias formas, podendo ser purificadas
45 ou não, oriundas dos basidiomas ou do micélio, do caldo de cultivo submerso do
46 micélio ou mesmo do composto exaurido (Machado et al., 2007).

47 A ideia de usar fungos de podridão branca para melhorar a digestibilidade de
48 material rico em compostos lignocelulosicos foi relatado primeiramente por Falck em
49 1902 citado em Cohen (2002). Assim, pesquisas têm sido direcionadas sobre a
50 utilização dos fungos da podridão branca que crescem em subprodutos da agricultura,
51 como as palhas, restos de plantas, bagaços e cascas na alimentação animal. A baixa
52 digestibilidade e aproveitamento desses subprodutos é proporcional ao seu conteúdo de
53 lignina. A deslignificação biológica parece ser a forma mais promissora de melhorar a
54 digestibilidade *in vitro* da palha de trigo, da palha de arroz quando usadas para o
55 crescimento do *Pleurotus ostreatus*, como demonstrado numa revisão de Cohen (2002).

56 Segundo Dinis et al. (2009) os complexos enzimáticos produzidos por quatro
57 fungos da podridão branca mostraram exercer seus efeitos na estrutura da parede celular
58 devido a ação combinada dos diferentes tipos de enzimas produzidos pelos fungos. Esse
59 fato explicaria a superioridade dessas enzimas em relação às comerciais no tratamento
60 da palha de trigo.

61 De modo geral, as enzimas exógenas combinam a ação de celulasas e
62 hemicelulasas produzidas por fungos e protegidas por glicosilação para permanecerem

63 ativas no rúmen, entretanto, há controvérsias a respeito da ação das enzimas no
64 ambiente ruminal, devido às condições inadequadas para a atividade enzimática que o
65 rúmen proporciona.

66 Portanto a hipótese deste trabalho é verificar se as enzimas lignocelulolíticas
67 teriam ação quando em contato a fração da fibra dos alimentos antes de ser fornecido
68 aos animais.

69 Por isso, o objetivo, neste estudo, é avaliar o efeito da utilização de enzimas
70 lignocelulósicas produzidas por fungo da podridão branca, aplicadas no alimento e
71 verificar seus efeitos sobre a composição química e digestibilidade *in vitro* de diferentes
72 fontes de alimentos ricos em fibras: silagem da planta inteira de milho, cana de açúcar
73 integral, feno de coast cross e palha de arroz.

74

75 **Material e Métodos**

76 O experimento foi conduzido no Laboratório de Análises de Alimentos e
77 Nutrição Animal pertencente ao Departamento de Zootecnia da Universidade Estadual
78 de Maringá (UEM), Maringá – PR.

79 Foram utilizadas 4 fontes de alimentos ricos em fibras (silagem da planta inteira
80 de milho, cana de açúcar integral, feno de coast cross e palha de arroz) que foram
81 tratados com o equivalente a 20 mg/kg de matéria natural (MN) de um complexo
82 enzimático obtido por meio da incubação do fungo da podridão branca durante 12 dias
83 em incubadora com temperatura controlada (28°C) e agitação constante. A dosagem
84 utilizada foi escolhida com base nos resultados descritos no capítulo 2 desta tese.

85 As forragens, silagem de planta inteira do milho e a cana-de-açúcar integral
86 foram pré secas em estufa com ventilação forçada a 55° C por 72 horas, posteriormente,
87 juntamente com as forragens de baixo teor de umidade, o feno de coast cross e a palha
88 de arroz, foram moídas em moinho de faca tipo “Wiley” de modo que o tamanho das
89 partículas fosse de, aproximadamente, 1mm, para posteriores análises químicas.

90 Para determinar o tempo necessário para a ação das enzimas, foi realizado um
91 estudo piloto, utilizando feno de coast cross e silagem de milho. Esses materiais foram
92 divididos em 3 sub amostras e cada uma foi pré tratada com o complexo enzimático
93 diluído em água. Os tempos de avaliação da ação das enzimas foram: 30, 60 e 120
94 minutos. E posteriormente, foi adicionado o detergente para a realização das análises
95 para determinação da FDN e FDA. Os resultados obtidos são mostrados na tabela 1 e
96 mostram que 30 minutos foram suficientes para a ação das enzimas. Desta forma foi

97 adotado o tempo de 30 minutos a fim de simular a adição das enzimas no alimento antes
98 de ser fornecido aos animais.

Tabela 1. Teores de fibra em detergente neutro e fibra em detergente ácido de silagem de milho e feno de coast cross tratados com 20 mg.kg⁻¹ MN de um composto de enzimas lignocelulolíticas produzidas pelo fungo da podridão branca, durante 30, 60 e 120 minutos

| Parâmetros | Sem enzima | Com enzima | | |
|-------------------------------------|------------|-----------------|-----|-----|
| | | Tempo (minutos) | | |
| | | 30 | 60 | 120 |
| Silagem de milho | | | | |
| Fibra em detergente neutro (g.kg-1) | 492 | 465 | 466 | 465 |
| Fibra em detergente ácido (g.kg-1) | 294 | 281 | 280 | 280 |
| Feno coast cross | | | | |
| Fibra em detergente neutro (g.kg-1) | 717 | 705 | 705 | 706 |
| Fibra em detergente ácido (g.kg-1) | 471 | 447 | 447 | 448 |

99

100 Para a realização do estudo, a cana-de-açúcar integral, feno de coast cross,
101 silagem da planta inteira de milho e a palha de arroz, depois de pré secos e moídos,
102 foram submetidos ao pré tratamento com o complexo enzimático. Foram realizadas 3
103 amostragens (repetição de campo) de cada alimentos avaliado, posteriormente, foi
104 aplicado o complexo enzimático, que ficou em contato com a amostra por 30 minutos.
105 Em seguida, os materiais foram levados à estufa de circulação forçada a 55°C durante 1
106 hora para retirar qualquer umidade adicional que a aspersão do complexo enzimático
107 pode ter ocasionado. E procedeu-se às análises para determinação da composição
108 química, em que: a MS das amostras foi determinada em estufa de ventilação forçada
109 de acordo com o procedimento de 934.01(AOAC, 1990). As cinzas foram
110 determinadas por combustão a 600°C por 6 horas de acordo com o método da AOAC
111 924.05 (1990). A determinação no N total seguiu o procedimento 990.03 da AOAC
112 (1990). As concentrações de fibra em detergente neutro (FDN) foram medidas com uso
113 de amilase termoestável, sem sulfito de sódio.

114 As concentrações de fibra em detergente ácido (FDA), sem correção do teor de
115 cinzas, foram determinadas de acordo com o procedimento 973.18 AOAC (1990). O
116 extrato etéreo (EE) foi determinado de acordo com o método de 7.060 AOAC (1990).

117 A lignina foi determinada através de duas metodologias: lignina solúvel em
118 brometo de acetila (LSBA) e lignina solúvel em permanganato de potássio (LSPP).
119 Para a determinação da LSBA, a fim de se obter a fração da parede celular livre de
120 proteínas as amostras secas (0,3 g) foram homogeneizados em 7 mL de tampão fosfato

121 de sódio e potássio (50 mM, pH 7,0) e transferido para tubos de centrífuga de 15 mL .
 122 O precipitado foi centrifugado (1.400g, 2 min) sucessivamente como segue: mais 4
 123 vezes com 7 mL de tampão fosfato (50 mM, pH 7,0); 3 vezes com 1% (v/v) Triton®
 124 em tampão fosfato pH 7,0 (7 mL); 3 vezes com 1 M NaCl em tampão pH 7,0 (7 mL); 3
 125 vezes com água destilada (7 mL) e 2 vezes com acetona (5 mL), a fim de se obter a
 126 parede celular isenta de proteínas. O precipitado foi seco em estufa (60 °C, 24 horas) e
 127 resfriado em dessecador a vácuo. A MS foi definida como a fração da parede celular
 128 livre de proteínas. Posteriormente, 20mg da parede celular isenta de proteína foram
 129 colocadas em tubos de vidro com rosca e adicionou-se 0,5 ml do reagente brometo de
 130 acetila 25% , preparado em ácido acético. Os tubos foram tampados, agitados e levados
 131 ao banho-maria por 30 minutos a 70° C. Em seguida, as amostras foram resfriadas em
 132 banho de gelo e adicionou-se 0,9 ml de NaOH 2M, 0,1 ml de hidroxilamina –HCl 7,5M
 133 e 2 ml de ácido acético. As amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 2400 RPM.
 134 O sobrenadante foi diluído em ácido acético e a leitura da absorbância foi realizada em
 135 espectrofotômetro a 280 nm. A concentração de lignina foi determinada de acordo com
 136 uma curva padrão e expressa em mg lignina g⁻¹ de parede celular. A LSPP foi
 137 determinada segundo metodologia descrita por (Van-Soest and Wine, 1968).

138 A fração hemicelulose foi obtida pela diferença da FDN e FDA, e a celulose, pela
 139 diferença entre FDA e lignina, Os carboidratos totais (CT) foram obtidos por
 140 intermédio da seguinte equação: $CT = 100 - (\%PB + \%EE + \%Matéria\ Mineral)$,
 141 (Sniffen et al., 1992). Os carboidratos não-fibrosos (CNF) foram determinados pela
 142 diferença entre CT e FDN (com correção para proteína e cinza), e o fracionamento dos
 143 carboidratos foi realizado segundo System CNCPS, em que:

144 Fração A + B1 = $100 - (C + B2)$; Fração B2 = $100 \times ((FDN(\%MS)) -$
 145 $PIDN(\%PB) \times 0,01 \times PB(\%MS) - FDN(\%MS) \times 0,01 \times$
 146 $LIGNINA(\%FDN) \times 2,4) / CT(\%MS)$ e Fração C = $(100 \times FDN(\%MS) \times$
 147 $0,01 \times LIGNINA(\%FDN) \times 2,4 / CT(\%MS))$

148 Para os ensaios de digestibilidade *in vitro*, foram utilizadas duas búfalas mestiças
 149 canuladas no rúmen como doadoras de líquido ruminal para as incubações *in vitro*. Os
 150 animais foram alimentados com dietas à base de silagem (70%) e concentrado (30%)
 151 formulado para atender as exigências nutricionais (Paul and Lal, 2010). As coletas de
 152 conteúdo ruminal das búfalas foram realizadas antes do trato da manhã, para
 153 determinação da digestibilidade *in vitro*. Esse conteúdo foi homogeneizado em
 154 liquidificador e filtrado através de quatro camadas de panos de gase e colocado em
 155 garrafas térmicas mantidas à temperatura de 39°C, com adição de CO₂.

156 A digestibilidade *in vitro* de MS (DIVMS) foi determinada por meio da pesagem
157 de 0,5 g de amostra pré-seca em tubos de centrífuga previamente secos e calibrados.
158 Aos tubos foram adicionados 12,5 mL de inóculo de rúmen e 37,5 mL de saliva
159 artificial, que foi preparada inicialmente com a solução tampão de McDougall
160 (NaHCO_3 , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KCl, NaCl, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2) e mais duas
161 soluções, sendo uma de uréia (5,5 g 100 mL^{-1} de H_2O destilada) e outra de glicose
162 (5,5g 100 mL^{-1} H_2O destilada) e anteriormente à incubação *in vitro*, foram
163 adicionados a cada 300 mL da solução de McDougall, 5 mL da solução tampão de
164 ureia e 5 mL da solução tampão de glicose, permanecendo em uma estufa a 39°C até a
165 sua utilização (Tilley and Terry, 1963). Em seguida, acrescentou-se CO_2 sobre a
166 superfície dos tubos, que foram fechados imediatamente com rolhas de borracha
167 equipadas com válvula de Bunsen. Após este procedimento, os tubos permaneceram
168 em banho-maria por 48 horas de incubação a 39°C , com agitação constante.

169 Após 48 horas de incubação, a fermentação foi interrompida, colocando os tubos
170 em gelo moído durante 10 minutos. O conteúdo dos tubos foram filtrados em papel
171 filtro quantitativo (faixa preta). Os filtros com os resíduos foram colocados em estufa,
172 a 105°C , onde permaneceram por 24 horas. Após este período, os filtros foram
173 colocados em um dessecador para posterior pesagem e determinação da MS.

174 A digestibilidade da FDN foi determinada de acordo com metodologia descrita por
175 (Tilley and Terry, 1963) modificada por (Holden, 1999), utilizando o rúmen artificial
176 (DaisyII Fermenter®, Ankom). Foram pesados 0,5 gramas de amostra em saquinhos
177 F-57®, Ankom, que foram distribuídos nos jarros onde foi adicionado 1600mL de
178 solução tampão e 400 mL de inóculo de rúmen, em seguida, foi acrescentado CO_2
179 para manter as condições anaeróbias e as amostras permaneceram incubadas por 48
180 horas com agitação contínua e temperatura controlada (39°C). Após as 48 horas de
181 incubação, os jarros foram drenados e lavados com água da torneira entre 5 a 6 vezes
182 até a água sair limpa. Em seguida os saquinhos foram congelados e, posteriormente,
183 colocados no analisador automático de fibras ankom, juntamente com a adição de
184 detergente neutro, para a quantificação da FDN.

185 As amostras dos alimentos foram analisadas em três repetições de campo (3
186 baterias) em duplicata para cada repetição. Em cada incubação, foram adicionados
187 dois tubos/saquinhos brancos (sem amostras) e dois tubos/saquinho com forragem
188 índice, para avaliar a interferência de efeitos durante o processo de fermentação
189 ruminal.

190 As análises estatísticas dos dados foram realizadas, através de análise de variância.

191

192 **Resultados**

193 A exposição por 30 minutos dos alimentos fibrosos ao complexo enzimático, de
194 modo geral, não alterou as concentrações de MS, MO, PB, EE, CT e a fração B2 dos
195 carboidratos, mas teve efeito nos componentes da parede celular: FDN, FDA e
196 lignina e na digestibilidade *in vitro* da MS e da FDN.

197 Para a silagem de milho tratada com as enzimas lignofibrolíticas (Tabela 2), houve
198 diminuição ($P < 0,05$) nas concentrações da FDN (4%), FDA (12%), lignina solúvel
199 em brometo de acetila (11%), celulose (13%) e na fração C dos carboidratos (14%).

Tabela 2. Composição química, fracionamento dos carboidratos e digestibilidade da matéria seca (DIVMS) e da fibra em detergente neutro (DIVFDN), expressos em g.kg^{-1} , da silagem de milho pré tratada com enzimas lignocelulolíticas produzidas pelo fungo da podridão branca

| Parâmetros | Tratamentos | | EPM | P |
|---------------------------------------|-------------|------------|------|------|
| | Sem enzima | Com enzima | | |
| Matéria seca | 315 | 317 | 1,13 | 0,23 |
| Matéria seca digestível | 186 | 193 | 5,15 | 0,02 |
| Matéria orgânica | 940 | 940 | 0,10 | 0,45 |
| Proteína Bruta | 71,5 | 68,0 | 2,45 | 0,10 |
| Extrato Etéreo | 25,5 | 24,3 | 0,82 | 0,57 |
| Fibra em detergente neutro | 482 | 466 | 11,2 | 0,02 |
| Fibra em detergente neutro digestível | 257 | 257 | 0,72 | 0,16 |
| Fibra em detergente ácido | 294 | 262 | 22,3 | 0,01 |
| Carboidratos totais | 843 | 848 | 3,18 | 0,12 |
| Carboidratos não fibrosos | 362 | 382 | 14,4 | 0,01 |
| Celulose | 206 | 183 | 15,8 | 0,02 |
| Hemicelulose | 188 | 204 | 11,0 | 0,03 |
| Lignina (LSBA) | 87,5 | 78,3 | 6,51 | 0,15 |
| Lignina (LSPP) | 66,4 | 59,2 | 5,09 | 0,03 |
| Fração A+B1 ¹ | 518 | 536 | 1,52 | 0,04 |
| Fração B2 * ¹ | 376 | 373 | 0,21 | 0,23 |
| Fração C * ¹ | 105 | 90,1 | 10,6 | 0,01 |
| DIVMS | 591 | 611 | 14,1 | 0,02 |
| DIVFDN | 532 | 551 | 12,9 | 0,03 |

200 EPM – Erro padrão médio; *Fração calculada com base na lignina obtida por meio da análise com
201 brometo de acetila; ¹- valores expressos em função dos carboidratos totais; Lignina (LSBA): lignina
202 determinada pela oxidação com brometo de acetila; Lignina (LSPP): lignina determinada pela oxidação
203 com permanganato de potássio.

204

205 Essas reduções acarretaram em aumentos de 10% nas concentrações de hemicelulose
206 ($P < 0,05$), 5% nos carboidratos não fibrosos ($P < 0,05$) e 4% na fração A+B1 ($P < 0,05$).

207 O tratamento enzimático também aumentou a DIVMS e a DIVFDN, em cerca de 3%,
208 para a silagem de milho. A matéria seca digestível aumentou 4% com a utilização do
209 complexo enzimático, porém, a FDN digestível não sofreu alteração.

210 Na cana-de-açúcar (tabela 3), houve diminuição das concentrações de FDN
 211 (5,%), FDA (10%) , lignina (17%), celulose (7%) e da fração C dos carboidratos
 212 (21%).

Tabela 3. Composição química, fracionamento dos carboidratos e digestibilidade da matéria seca (DIVMS) e da fibra em detergente neutro (DIVFDN), expressos em g.kg-1, da cana-de-açúcar pré tratada com enzimas lignocelulolíticas produzidas pelo fungo da podridão branca

| Parâmetros | Tratamentos | | EPM | P |
|---------------------------------------|-------------|------------|------|------|
| | Sem enzima | Com enzima | | |
| Matéria seca | 329 | 328 | 0,99 | 0,32 |
| Matéria seca digestível | 171 | 176 | 3,14 | 0,03 |
| Matéria orgânica | 940 | 941 | 0,65 | 0,28 |
| Proteína Bruta | 31,4 | 31,1 | 0,27 | 0,18 |
| Extrato Etéreo | 15,8 | 16,1 | 0,12 | 0,22 |
| Fibra em detergente neutro | 652 | 625 | 19,3 | 0,04 |
| Fibra em detergente neutro digestível | 203 | 206 | 0,04 | 0,27 |
| Fibra em detergente ácido | 397 | 358 | 27,5 | 0,02 |
| Carboidratos totais | 892 | 893 | 0,80 | 0,20 |
| Carboidratos não fibrosos | 241 | 269 | 20,1 | 0,04 |
| Celulose | 276 | 257 | 13,3 | 0,03 |
| Hemicelulose | 255 | 267 | 8,14 | 0,04 |
| Lignina (LSBA) | 120 | 100 | 14,1 | 0,13 |
| Lignina (LSPP) | 100 | 80,5 | 13,9 | 0,02 |
| Fração A+B1 ¹ | 467 | 494 | 2,22 | 0,02 |
| Fração B2 * ¹ | 372 | 380 | 0,50 | 0,10 |
| Fração C * ¹ | 159 | 125 | 24,1 | 0,02 |
| DIVMS | 520 | 536 | 11,1 | 0,02 |
| DIVFDN | 311 | 330 | 13,0 | 0,05 |

213 EPM – Erro padrão médio; *Fração calculada com base na lignina obtida por meio da análise
 214 com brometo de acetila; ¹- valores expressos em função dos carboidratos totais; Lignina (LSBA): lignina
 215 determinada pela oxidação com brometo de acetila; Lignina (LSPP): lignina determinada pela oxidação
 216 com permanganato de potássio.

217 As concentrações dos CNF aumentaram 7,%, da hemicelulose aumentaram 5,%,
 218 e a fração A+B1 dos carboidratos aumentaram 7%. A DIVMS e DIVFDN
 219 aumentaram, 3% e 6% ,respectivamente. A matéria seca digestível aumentou 2,5 %
 220 com a utilização do complexo enzimático, porém, a FDN digestível não sofreu
 221 alteração.

222 No feno de coast cross (tabela 4), o tratamento enzimático causou diminuição
 223 (P<0,05) nos teores de FDN (2%), FDA (4,%), lignina (7%), celulose (4%) e na fração
 224 C dos carboidratos (6%). Isso refletiu em aumento na hemicelulose (3,5%), CNF
 225 (11%) e na fração A+B1 dos carboidratos (11%). A DIVMS e DIVFDN tiveram
 226 aumentos de 5,% e 4%, respectivamente. A matéria seca digestível aumentou 5 % e a

227 FDN digestível não sofreu alteração significativa com a utilização do complexo
228 enzimático.

Tabela 4. Composição química, fracionamento dos carboidratos e digestibilidade da matéria seca (DIVMS) e da fibra em detergente neutro (DIVFDN), expressos em g.kg⁻¹, do feno de coast cross pré tratado com enzimas lignocelulolíticas produzidas pelo fungo da podridão branca

| Parâmetros | Tratamentos | | EPM | P |
|---------------------------------------|-------------|------------|------|------|
| | Sem enzima | Com enzima | | |
| Matéria seca | 884 | 882 | 1,56 | 0,16 |
| Matéria seca digestível | 513 | 538 | 17,5 | 0,01 |
| Matéria orgânica | 942 | 941 | 0,70 | 0,36 |
| Proteína Bruta | 102 | 103 | 0,28 | 0,45 |
| Extrato Etéreo | 19,2 | 18,7 | 0,30 | 0,37 |
| Fibra em detergente neutro | 717 | 704 | 8,94 | 0,02 |
| Fibra em detergente neutro digestível | 372 | 378 | 4,06 | 0,06 |
| Fibra em detergente ácido | 471 | 449 | 15,0 | 0,02 |
| Carboidratos totais | 820 | 819 | 0,67 | 0,23 |
| Carboidratos não fibrosos | 103 | 114 | 8,26 | 0,01 |
| Celulose | 396 | 380 | 11,4 | 0,02 |
| Hemicelulose | 246 | 254 | 6,12 | 0,05 |
| Lignina (LSBA) | 75,0 | 69,9 | 3,63 | 0,03 |
| Lignina (LSPP) | 57,3 | 54,6 | 1,91 | 0,03 |
| Fração A+B1 ¹ | 160 | 172 | 1,02 | 0,02 |
| Fração B2 * ¹ | 682 | 678 | 0,25 | 0,15 |
| Fração C * ¹ | 157 | 148 | 6,40 | 0,04 |
| DIVMS | 580 | 610 | 20,9 | 0,02 |
| DIVFDN | 519 | 536 | 12,3 | 0,01 |

229 EPM – Erro padrão médio; *Fração calculada com base na lignina obtida por meio da análise com
230 brometo de acetila; ¹- valores expressos em função dos carboidratos totais; Lignina (LSBA): lignina
231 determinada pela oxidação com brometo de acetila; Lignina (LSPP): lignina determinada pela oxidação
232 com permanganato de potássio.

233 Na palha de arroz, após o tratamento enzimático, (tabela 5), houve diminuição
234 das concentrações da FDN (5%), FDA (6%), lignina (6,5%), celulose (6,5%),
235 hemicelulose (1%) e da fração C dos carboidratos (7,%). Os CNF aumentaram 33% e
236 a fração A+B1 dos carboidratos também teve aumento de 23%. A DIVMS e DIVFDN
237 aumentaram 6% e 3,%, respectivamente. A matéria seca digestível aumentou 6% e a
238 FDN digestível não sofreu efeito significativo com a utilização do complexo
239 enzimático.

240

241

Tabela 5. Composição química, fracionamento dos carboidratos e digestibilidade da matéria seca (DIVMS) e da fibra em detergente neutro (DIVFDN), expressos em g.kg⁻¹, da palha de arroz pré tratada com enzimas lignocelulolíticas produzidas pelo fungo da podridão branca

| Parâmetros | Tratamentos | | EPM | P |
|---------------------------------------|-------------|------------|------|------|
| | Sem enzima | Com enzima | | |
| Matéria seca | 833 | 836 | 1,58 | 0,15 |
| Matéria seca digestível | 434 | 459 | 18,3 | 0,02 |
| Matéria orgânica | 930 | 935 | 3,41 | 0,25 |
| Proteína Bruta | 61,9 | 61,5 | 0,26 | 0,35 |
| Extrato Etéreo | 18,1 | 18,4 | 0,19 | 0,26 |
| Fibra em detergente neutro | 737 | 704 | 22,9 | 0,03 |
| Fibra em detergente neutro digestível | 329 | 323 | 3,16 | 0,07 |
| Fibra em detergente ácido | 521 | 491 | 21,2 | 0,01 |
| Carboidratos totais | 850 | 855 | 3,48 | 0,01 |
| Carboidratos não fibrosos | 113 | 150 | 26,3 | 0,01 |
| Celulose | 423 | 399 | 19,5 | 0,04 |
| Hemicelulose | 215 | 213 | 1,67 | 0,05 |
| Lignina (LSBA) | 98,3 | 91,9 | 1,70 | 0,05 |
| Lignina (LSPP) | 79,1 | 70,7 | 3,03 | 0,03 |
| Fração A+B1 ¹ | 169 | 208 | 1,70 | 0,02 |
| Fração B2 * ¹ | 626 | 602 | 1,70 | 0,06 |
| Fração C * ¹ | 204 | 189 | 10,5 | 0,04 |
| DIVMS | 520 | 550 | 20,9 | 0,02 |
| DIVFDN | 446 | 460 | 10,0 | 0,02 |

242 EPM – Erro padrão médio; *Fração calculada com base na lignina obtida por meio da análise com
 243 brometo de acetila; ¹- valores expressos em função dos carboidratos totais; Lignina (LSBA): lignina
 244 determinada pela oxidação com brometo de acetila; Lignina (LSPP): lignina determinada pela oxidação
 245 com permanganato de potássio.

246

247 **Discussão**

248 Nos alimentos fibrosos após a aspersão e atuação por 30 minutos do complexo
 249 enzimático lignocelulolítico, verificou-se modificações na composição química, em
 250 especial na parede celular. Entretanto, a extensão da resposta ao tratamento
 251 enzimático foi diferente em cada alimento avaliado. Essas diferenças ocorreram
 252 devido à própria composição química de cada alimento, especialmente com relação à
 253 composição da parede celular, onde ocorreram reduções nas concentrações de
 254 celulose, FDN, FDA e lignina. A fração C da parede celular dos alimentos avaliados
 255 (fração indisponível) também foi diminuída.

256 As concentrações de lignina e da fração C dos carboidratos foram as que sofreram
 257 os maiores decréscimos pela adição das enzimas, com destaque para as reduções,

258 respectivamente, de 17 e 21 % observados na cana-de-açúcar, seguida pela redução
259 de 11 e 14% para a silagem de milho, de 7 e 6 % para o feno de coast cross e da
260 diminuições de 6,5 e 7 % para a palha de arroz. Da mesma forma os decréscimos nos
261 teores da FDA foram de 10%, 12%, 4% e 6%, respectivamente, para cana de açúcar,
262 silagem de milho, feno de coast cross e palha de arroz.

263 Como resultado dessas modificações na composição da parede celular após a ação
264 das enzimas, verificam-se aumentos nas concentrações dos carboidratos não fibrosos
265 (que compreende os açúcares, amido, pectina e beta glucanos) que variaram de 5 a
266 33% e das frações A+B1 dos carboidratos (açúcares e amido) que variaram de 4 a
267 32%. Inclusive, nos alimentos com baixas concentrações dessas frações, como é o
268 caso do feno de coast cross e da palha de arroz, que após a ação das enzimas os
269 aumentos foram os maiores.

270 Em relação à silagem de milho, para cada unidade percentual de redução da
271 quantidade de lignina, houve aumento de 2 unidades percentuais na DIVMS e na
272 DIVFDN. Porém, apesar dessas respostas serem positivas com o pré tratamento com o
273 complexo de enzimas, de um modo geral, os resultados foram mais significativos
274 quando o complexo enzimático foi adicionado durante a confecção da silagem, como
275 mostrado no capítulo 2 dessa tese. Assim, pode-se concluir que, no caso da silagem de
276 milho, o complexo enzimático apresenta melhores resultados quando associado ao
277 processo fermentativo.

278 No caso da cana-de-açúcar, as maiores reduções nas concentrações da lignina e
279 fração C, podem ser considerados como os principais fatores responsáveis pelos
280 aumentos nas DIVMS (520,6 vs 536,3 g.kg⁻¹) e principalmente da DIVFDN (311,7 vs
281 330,2 g.kg⁻¹), sendo que para cada unidade percentual de diminuição na concentração
282 de lignina, houve aumento de 1 unidade percentual na DIVMS e na DIVFDN.
283 Entretanto, quando é observado a quantidade de MS e FDN digestíveis, esse efeito
284 não é tão impactante, uma vez que, somente a MS digestível aumentou. Como a
285 DIVFDN e a concentração de FDN foram modificadas na mesma proporção (aumento
286 de 6% na DIVFDN e diminuição de 6% no teor de FDN), a quantidade de FDN
287 digestível não foi modificada.

288 Muitos estudos têm sido realizados visando melhorar o aproveitamento da cana-
289 de-açúcar na alimentação animal, sendo que a fibra de lenta degradação ruminal e com
290 reflexo na redução consumo é o maior entrave para sua utilização. Assim com o
291 objetivo de aumentar a digestibilidade da fibra da cana-de-açúcar os resultados mais

292 efetivos tem sido com a utilização de óxido de cálcio. Oliveira et al. (2007),
293 adicionaram óxido de cálcio (cal) na cana-de-açúcar *in natura* e durante a confecção
294 de silagem. Foi observado aumento da digestibilidade *in vitro* da MS (4,8% no maior
295 nível de cal em relação ao controle) e na DIV da lignina (29% no maior nível de cal,
296 em relação ao controle) tanto no material *in natura* quanto após o processo
297 fermentativo. Com o mesmo propósito, Murta et al. (2011), avaliou o efeito da adição
298 de óxido de cálcio na cana-de-açúcar sobre a digestibilidade aparente dos nutrientes
299 em ovinos e observou aumento na digestibilidade aparente da MS, FDN e FDA. O
300 óxido de cálcio é um agente alcalinizante e atua solubilizando as frações da parede
301 celular. Esses dados estão em concordância com os resultados obtidos neste trabalho,
302 uma vez que, com a redução, especialmente da lignina, ocorreram melhorias na
303 digestibilidade dos alimentos.

304 O feno de coast cross, quando avaliado após a ação da enzima, teve aumento de
305 11% na concentração de CNF e na fração A+B1. E para cada unidade percentual de
306 redução da lignina, houve aumento de 2 unidades percentuais na DIVMS e DIVFDN.
307 Além disso, a MS digestível aumentou 5 % enquanto a quantidade de FDN digestível
308 não sofreu alteração significativa. O aumento significativo observado na MS
309 digestível pode ser devido à liberação do nitrogênio lignificado que, com a hidrólise
310 de parte da lignina, foi liberado e utilizado como substrato pelos microrganismos
311 ruminais.

312 Na palha de arroz, houve aumento de 33% e 32%, respectivamente, para os CNF e
313 Fração A+B1. Para cada unidade percentual de redução da lignina, houve aumento de
314 5 unidades percentuais na DIVMS, porém, na DIVFDN, esse aumento foi de 2
315 unidades percentuais. Essa diferença na extensão da resposta entre DIVMS e
316 DIVFDN em relação à diminuição dos teores de lignina, refletiu na quantidade de MS
317 digestível, que aumentou 5%, já a quantidade de FDN digestível não sofreu alteração
318 significativa. Neste caso, o aumento da DIVMS em decorrência da diminuição da
319 lignina foi maior que nos outros alimentos avaliados. Essa observação pode ser
320 explicada pela lignina, que foi componente da parede celular que sofreu maior
321 diminuição, nesse material. Consequentemente, como a DIVFDN não aumentou na
322 mesma extensão que a redução da lignina, o aumento na DIVMS pode ter ocorrido,
323 devido à liberação de nitrogênio que estava lignificado e indisponível para os
324 microrganismos do inóculo ruminal, assim como ocorreu no feno de coast cross.

325 Em concordância com os resultados obtidos, Cardoso et al. (2004), observou
326 reduções na FDN e na hemicelulose de palha de arroz tratada com amônia anidra.

327 Porém, ao contrário do que foi observado neste estudo, não houve efeito da
328 amonização sobre a composição da lignina. Isso ocorre por que a amonização
329 solubiliza, parcialmente, a hemicelulose e, conseqüentemente, ocorrem reduções nos
330 teores de FDN (Paiva et al., 1995).

331 De modo geral, os resultados observados mostram que a lignina tem correlação
332 com a digestibilidade da parede celular, sugerindo que a qualidade dos alimentos e seu
333 valor nutritivo, tem relação direta com sua composição química.

334 Também é importante considerar o fato de que os quatro alimentos avaliados são
335 gramíneas e, apesar dessas apresentaram menores concentrações de lignina, em
336 relação às leguminosas, as correlações negativas com a digestibilidade são mais
337 evidentes nas gramíneas (Van-Soest, 1994). Isso ocorre, por que, a distribuição da
338 hemicelulose é maior nas gramíneas, em relação às leguminosas. Assim, devido às
339 ligações da lignina com a hemicelulose, os prejuízos à digestibilidade das gramíneas
340 são maiores (Van-Soest, 1994).

341 O teor de lignina é considerado o principal fator da planta, que está envolvido na
342 redução da digestibilidade das forragens (Van-Soest and Wine, 1968). De acordo com
343 Akin et al. (1973), o potencial de digestibilidade de uma planta está relacionado com
344 os diferentes tecidos vegetais ou com tecidos específicos. Assim, tecidos vasculares
345 lignificados e esclerenquimáticos proporcionam menores taxas de digestibilidade
346 (Rodella et al., 1982). Isso ocorre porque a presença de lignina provoca interação com
347 frações de carboidratos, formando uma barreira física que impede a ruptura de
348 ligações químicas pelas enzimas produzidas pelos microrganismos do rúmen (Moreira
349 et al., 2013).

350

351 **Conclusão**

352 O pré tratamento dos alimentos ricos em fibra com o complexo de enzimas
353 lignocelulolíticas produzidas pelo fungo da podridão branca resultou em modificações
354 na parede celular de todos os alimentos avaliados. O principal componente modificado
355 foi a lignina, que teve sua concentração reduzida. A redução da lignina refletiu em
356 aumentos nos coeficientes de digestibilidade *in vitro* da matéria seca e da fibra em
357 detergente neutro.

358 A extensão da resposta variou entre os alimentos e a redução da lignina foi maior
359 na cana-de-açúcar, seguida pela silagem de milho, feno de coast cross e palha de arroz,
360 respectivamente.

361

362 **Referências Bibliográficas**

363

- 364 Acero, A. P., M. M. Mayo, L. A. M. Romero, M. D. M. Rivas, R. B. Gama, and O. Loera. 2008.
365 Ventajas De La Fermentación Sólida Con *Pleurotus Sapidus* En Ensilajes De Caña De
366 Azúcar. *Revista Archivos De Zootecnia* 57(217):25 - 33.
- 367 Aguiar, A., and A. Ferraz. 2011. Mecanismos envolvidos na biodegradação de materiais
368 lignocelulósicos e aplicações tecnológicas correlatas. *Quimica Nova* 34(10):1729 -
369 1738.
- 370 Akin, D. E., H. E. Amos, F. E. Barton, and D. Burdick. 1973. Rumen Microbial Degradation of
371 Grass Tissue Revealed by Scanning Electron Microscopy. *Agronomy Journal* 65(5):825
372 - 828.
- 373 Alves-Prado, H. F., F. C. Pavezzi, R. S. R. Leite, V. M. d. Oliveira, L. D. Sette, and R. DaSilva.
374 2010. Screening and Production Study of Microbial Xylanase Producers from Brazilian
375 Cerrado. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 161(1):333 - 346.
- 376 AOAC. 1990. *Official Methods of Analysis*. AOAC, Washington, DC, USA.
- 377 Baldrian, P. 2006. Fungal laccases - occurrence and properties. *FEMS Microbial Review* 30:215
378 - 242.
- 379 Beauchemin, K. A., D. Colombatto, D. P. Morgavi, W. Z. Yang, and L. M. Rode. 2004. Mode
380 of action of exogenous cell wall degrading enzymes for ruminants. *Canadian Journal of*
381 *Animal Science* 84:13-22.
- 382 Beauchemin, K. A., L. M. Rode, and V. J. H. Sewalt. 1995. Fibrolytic enzymes increase fiber
383 digestibility and growth rate of steers fed dry forages. *Canadian Journal of Animal*
384 *Science* 75:641 - 644.
- 385 Billa, E., M. T. Tollier, and B. Monties. 1996. Characterization of the monomeric composition
386 of in situ wheat straw lignins by alkaline nitrobenzene oxidation: effect of temperature
387 and reaction time. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 72:250 - 256.
- 388 Boerjan, W., J. Ralph, and M. Baucher. 2003. Lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant*
389 *Biology* 54:519 - 546.
- 390 Boudet, A.-M. 2007. Evolution and current status of research in phenolic compounds.
391 *Phytochemistry* 68(22-24):2722-2735.
- 392 Buranov, A. U., and G. Mazza. 2008. Lignin in straw of herbaceous crops. *Industrial crops and*
393 *products* 28:237-259.
- 394 Cardoso, G. C., R. Garcia, A. L. d. Souza, O. G. Pereira, C. M. S. d. Andrade, A. J. V. Pires,
395 and F. S. Bernardino. 2004. Desempenho de Novilhos Simental Alimentados com
396 Silagem de Sorgo, Cana-de-Açúcar e Palhada de Arroz Tratada ou não com Amônia
397 Anidra. *Revista Brasileira de Zootecnia* 33(6):2132-2139.
- 398 Chen, K.-C., Y.-H. Lin, W.-H. Chen, and Y.-C. Liu. 2002. Degradation of phenol by PAA-
399 immobilized *Candida tropicalis*. *Enzyme and Microbial Technology* 31:490 - 497.
- 400 Coan, R. M., P. d. F. Vieira, R. N. d. Silveira, R. A. Reis, E. B. Malheiros, and M. d. S.
401 Pedreira. 2005. Inoculante enzimático-bacteriano, composição química e parâmetros
402 fermentativos das silagens dos capins Tanzânia e Mombaça. *Revista Brasileira de*
403 *Zootecnia* 34(2):416 - 424.
- 404 Cohen, R. L., L. Persky, and Y. Hadar. 2002. Biotechnological applications and potential of
405 wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Applied Microbiology and*
406 *Biotechnology* 58(5):582 - 594.
- 407 Colombatto, D., X. L. Mould, M. K. Bhat, R. H. Phipps, and E. Owen. 2004. In vitro evaluation
408 of fibrolytic enzymes as additives for maize (*Zea mays* L.) silage: III. Comparison of
409 enzymes derived from psychrophilic, mesophilic or thermophilic sources. *Animal Feed*
410 *Science and Technology* 111(1-4):145 - 159.
- 411 Cysneiros, C. d. S. S., R. N. Ferreira, M. A. Oliveira, A. O. Favoretto, E. Arnhold, and C. J.
412 Ulhoa. 2013. Produção, Caracterização E Avaliação De Enzimas Fibrolíticas Na
413 Digestibilidade Da Forragem De Milho *Ciência Animal Brasileira* 14(4):1-5.
- 414 Cysneiros, C. d. S. S., G. L. Franco, C. J. Ulhoa, J. M. d. S. Diogo, and A. K. B. Ramos. 2006.
415 Efeito de enzimas fibrolíticas sobre a composição química da silagem de milho. *Ciência*
416 *Animal Brasileira* 7(4):339 - 334.

- 417 Doblin, M. S., F. Pettolino, and A. Bacic. 2010. Plant cell walls: the skeleton of the plant world.
418 *Functional Plant Biology* 37:357 - 381.
- 419 Emtiazi, G., and I. Nahvi. 2000. Multi-enzyme production by *Cellulomonas* sp. grown on wheat
420 straw. *Biomass and Bioenergy* 19(1):31 - 37.
- 421 Fabbrini, M., C. Galli, and P. Gentili. 2002. Comparing the catalytic efficiency of some
422 mediators of laccase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 16(5-6):231-240.
- 423 Fengel, D., and G. Wegener. 1984. *Wood—chemistry, ultrastructure, reactions*, Berlin and New
424 York.
- 425 Gomez-Velazquez, A., J. Perez, G. D. Mendoza, E. Aranda, and A. Hernandez. 2003. Fibrolytic
426 exogenous enzymes improve performance in steers fed sugar cane and stargrass.
427 *Livestock production science* 82(2):249 - 254.
- 428 Hammel, K. E., and D. Cullen. 2008. Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis.
429 *Current Opinion in Plant Biology* 11:349 - 355.
- 430 Hatfield, R. D. 1993. Cell Wall Polysaccharide Interactions and Degradability. In: H. G. JUNG,
431 D. R. BUXTON and R. D. HATFIELD, editors, *Forage Cell Wall Structure and*
432 *Digestibility*. American Society of Agronomy, Crop Sci. Society of America, Soil Sci.
433 Society of America, Madison. p. 315 - 346.
- 434 Hendriks, A. T. W. M., and G. Zeeman. 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of
435 lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* 100(1):10 - 18.
- 436 Hofrichter, M. 2002. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and*
437 *Microbial Technology* 30:454 - 466.
- 438 Holden, L. A. 1999. Comparison of methods of in vitro dry matter digestibility for ten feeds.
439 *Journal of Dairy Science* 82(8):1791 - 1794.
- 440 Hu, X.-P., and Y.-L. Hsieh. 2001. Effects of Dehydration on the Crystalline Structure and
441 Strength of Developing Cotton Fibers. *Textile Research Journal* 71(3):231 - 239.
- 442 Huang, H.-w., G. Zoppellaro, and T. Sakurai. 1999. Spectroscopic and Kinetic Studies on the
443 Oxygen-centered Radical Formed during the Four-electron Reduction Process of
444 Dioxygen by *Rhus vernicifera* Laccase. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL*
445 *CHEMISTRY* 274(12):32718 - 32724.
- 446 Huntington, G. B. 1997. Starch utilization by ruminants: from basics to the bunk. *Journal of*
447 *animal science* 75(3):852-867.
- 448 Jalilvand, G., A. Naserian, E. Kebreab, N. E. Odongo, R. Valizadeh, F. E. Shahroodi, S. Lopez,
449 and J. Francex. 2008. Rumen Degradation Kinetics Of Alfalfa Hay, Maize Silage And
450 Wheat Straw Treated With Fibrolytic Enzymes. *Revista Archivos De Zootecnia* 57:155
451 - 164.
- 452 Jung, H. G. 1989. Forage Lignins and Their Effects on Fiber Digestibility. *Agronomy Journal*
453 81:33-38.
- 454 Kadla, J. F., and R. D. Gilbert. 2000. Cellulose structure: a review. *Cellulose Chemistry and*
455 *Technology* 34(3):197 - 216.
- 456 Karlsson, M., M. Melzer, I. Prokhorenko, T. Johansson, and G. Wingsle. 2005. Hydrogen
457 peroxide and expression of hipI-superoxide dismutase are associated with the
458 development of secondary cell walls in *Zinnia elegans*. *Journal of Experimental Botany*
459 56(2085 - 2093)
- 460 Kulkarni, N., A. Shendye, and M. Rao. 1999. Molecular and biotechnological aspects of
461 xylanases. *FEMS Microbiology Reviews* 23:411 - 456.
- 462 Loures, D. R. S., L. G. Nussio, S. d. F. Paziani, A. d. F. Pedroso, L. J. Mari, J. L. Ribeiro, M.
463 Zopollatto, P. Schmidt, M. C. Junqueira, I. U. Packer, and F. P. d. Campos. 2005. Efeito
464 de enzimas fibrolíticas e do teor de matéria seca em silagens de capim-tanzânia sobre os
465 parâmetros ruminiais, o comportamento ingestivo e a digestão de nutrientes, em bovinos.
466 *Revista Brasileira de Zootecnia* 34(3):736 - 745.
- 467 Lowe, S. E., M. K. Theodorou, and A. P. Trinci. 1987. Cellulases and xylanase of an anaerobic
468 rumen fungus grown on wheat straw, wheat straw holocellulose, cellulose, and xylan.
469 *Applied and Environmental Microbiology* 53(6):1216 - 1223.
- 470 Machado, A. M. B., E. S. Dias, É. C. d. Santos, and R. T. F. d. Freitas. 2007. Composto
471 exaurido do cogumelo *Agaricus blazei* na dieta de frangos de corte. *Revista Brasileira*
472 *de Zootecnia* 36(4):1113-1118.

- 473 Maheshwari, R., G. Bharadwaj, and M. K. Bhat. 2000. Thermophilic Fungi: Their Physiology
474 and Enzymes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64(3):461 - 488.
- 475 Martins, A. d. S., P. F. Vieira, T. T. Berchielli, I. N. d. Prado, and J. L. Moletta. 2006. Consumo
476 e digestibilidade aparente total em bovinos sob suplementação com enzimas fibrolíticas.
477 *Revista Brasileira de Zootecnia* 35(5):2118 - 2124.
- 478 Medeiros-Neto, P. N. d., E. d. Oliveira, and J. B. Paes. 2014. Relações entre as características da
479 madeira e do carvão vegetal de duas espécies da caatinga. *Floresta e Ambiente*
480 21(4):484-493.
- 481 Mertens, D. R. 2002. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in
482 feeds with refluxing in beakers or crucibles: collaborative study. *Journal of AOAC*
483 *INTERNATIONAL* Main 85:1217 - 1240.
- 484 Moraes, A. M. L. d., R. d. A. Paes, and V. L. d. Holanda. 2009. *Micologia, Conceitos e*
485 *Métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde: volume 4 No. 4.*
486 *Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio, Rio de Janeiro.*
- 487 Moreira, L. M., F. d. P. Leonel, R. A. M. Vieira, and J. C. Pereira. 2013. A new approach about
488 the digestion of fibers by ruminants *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*
489 14(2):382 - 395.
- 490 Moreschi, J. C. 2013. *Biodegradação e Preservação da Madeira, Curitiba*
- 491 Murta, R. M., M. A. Chaves, A. J. V. Pires, C. M. Veloso, F. F. d. Silva, A. L. R. Neto, A. E.
492 Filho, and P. E. F. d. Santos. 2011. Desempenho e digestibilidade aparente dos
493 nutrientes em ovinos alimentados com dietas contendo bagaço de cana-de-açúcar
494 tratado com óxido de cálcio. *Revista Brasileira de Zootecnia* 40(6):1325 - 1332.
- 495 Oliveira, M. D. S. d., A. T. d. Andrade, J. C. Barbosa, T. M. d. Silva, A. R. M. Fernandes, E.
496 Caldeirão, and A. Carabolante. 2007. Digestibilidade Da Cana-De-Açúcar Hidrolisada,
497 In Natura E Ensilada Para Bovinos. *Ciência Animal Brasileira* 8(1):41-50.
- 498 Paiva, J. A. J., R. Garcia, and A. C. Queiroz. 1995. Efeito dos níveis de amônia anidra e
499 períodos de amonização sobre a degradabilidade da matéria seca e dos constituintes da
500 parede celular na palhada de milho (*Zea mays* L.). *Revista Brasileira de Zootecnia*
501 24(5):683 - 692.
- 502 Paloheimo, M., J. Piironen, and J. Vehmaanpera. 2010. Xylanases and Cellulases as Feed
503 Additives. In: M. R. Bedford and G. G. Partridge, editors, *Enzymes in farm Animal*
504 *Nutrition* No. 2. CABI Publishing, Oxford, UK. p. 12 - 53.
- 505 Paul, S. S., and D. Lal. 2010. *Nutrient Requirements of buffaloes.* Satish Serial Publishing
506 House, Azadpur, Dellhi
- 507 Pouteau, E. B., I. E. Monnard, C. Piguët-Welsch, M. J. A. Groux, L. Sagalowicz, and A. Berger.
508 2003. Non-esterified plant sterols solubilized in low fat milks inhibit cholesterol
509 absorption: A stable isotope double-blind crossover study. *European Journal of*
510 *Nutrition* 42:154 - 164.
- 511 Rodella, R. A., C. M. Ishiy, R. C. S. Maimoni-Rodella, and A. Amaral-Junior. 1982. Estudo
512 quantitativo de características anatômicas da folha de duas espécies de *Brachiaria*.
513 *Revista agrociência* 2(2):21 - 30.
- 514 Rosatto, S. S., R. S. Freire, N. Durán, and L. T. Kubota. 2001. Biossensores amperométricos
515 para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. *Química*
516 *Nova* 24(1):77 - 86.
- 517 Rufino, M. d. S. M., R. E. Alves, E. S. d. Brito, S. M. d. Morais, C. d. G. Sampaio, J. Pérez-
518 Jiménez, and F. D. Saura-Calixto. 2007. Metodologia Científica: Determinação da
519 Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS +. In:
520 Embrapa (ed.). Embrapa, Fortaleza.
- 521 Saliba, E. d. O. S., N. M. Rodriguez, S. A. L. d. Morais, and D. Piló-Veloso. 2001. Ligninas –
522 Métodos De Obtenção E Caracterização Química. *Ciência Rural - UFSM* 31(5):917 -
523 928.
- 524 Sánchez, N., S. Miranda, P. Vit, and A. Rodriguez-Malaver. 2010. Propolis protect against
525 oxidative stress in human saliva. *Journal of ApiProduct & ApiMedical Science* 2:72
526 - 76.
- 527 Santos, N. W., G. T. D. Santos, D. C. Silva-Kazama, P. A. Grande, P. M. Pintro, F. E. d.
528 Marchi, C. C. Jobim, and H. V. Petit. 2014. Production, composition and antioxidants in

- 529 milk of dairy cows fed diets containing soybean oil and grape residue silage. *Livestock*
530 *Science* 159:37 - 45.
- 531 Scheller, H. V., and P. Ulvskov. 2010. Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology* 61:263
532 - 289.
- 533 Schofield, P., J. R. E. Pitt, and A. N. Pel. 1994. Kinetics of Fiber Digestion from In Vitro Gas
534 Production *Journal of animal science* 72:2980 - 2991.
- 535 Shallom, D., and Y. Shoham. 2003. Microbial hemicellulases. *Current Opinion in Microbiology*
536 6:219 - 228.
- 537 Silva, D. J., and A. C. d. Queiroz. 2002. *Análise de Alimentos - Métodos químicos e biológicos.*
538 Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- 539 Singleton, V. L., and J. A. Rossi. 1965. A. Colorimetry of total phenolics with
540 phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and*
541 *Viticulture* 16:144 - 158.
- 542 Sjostrom, E. 1993. *Wood Chemistry: Fundamentals and Applications*, San Diego.
- 543 Sniffen, C. J., J. D. O'Connor, P. J. V. Soest, D. G. Fox, and J. B. Russell. 1992. A net
544 carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein
545 availability. *Journal of animal science* 70(11):3562 - 3577.
- 546 Souza, G. d. 2012. *Produção, extração e estabilidade de enzimas lignocelulolíticas para uso em*
547 *degradação de compostos poluentes*, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- 548 Taiz, L., and E. Zeiger. 2006. *Fisiologia Vegetal*.
- 549 Tilley, J. M. A., and R. A. Terry. 1963. A Two-Stage Technique For The In Vitro Digestion Of
550 Forage Crops. *Journal of the British Grassland Society* 18(2):104 - 111.
- 551 Valadares-Filho, S. d. C., and D. d. S. Pina. 2009. Fermentação Ruminant. In: FUNEP, editor,
552 *Nutrição de Ruminantes*, Jaboticabal. p. 161 -189.
- 553 Valli, K., H. Wariishi, and M. H. Gold. 1990. Oxidation of monomethoxylated aromatic
554 compounds by lignin peroxidase: role of veratryl alcohol in lignin biodegradation
555 *Biochemistry* 29(37):8535 - 8539.
- 556 Van-Soest, P. J. 1994. *Nutritional ecology of the ruminant*. Cornell University Press, New York.
- 557 Van-Soest, P. J., and R. H. Wine. 1968. The determination of lignin and cellulose in
558 acid-detergent fibre with permanganate. *Journal of the Association of Official Analytical*
559 *Chemists* 52:780 - 785.
- 560 Varga, G. A., and E. S. Kolver. 1997. Microbial and Animal Limitations to Fiber Digestion and
561 Utilization. *Journal of Nutrition* 127:819 - 823.
- 562 Wariishi, H., K. Valli, and M. H. Gol. 1992. Manganese(II) Oxidation by Manganese
563 Peroxidase from the Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *THE JOURNAL OF*
564 *BIOLOGICAL CHEMISTRY* 267(33):23689-23695.
- 565 Wilson, J. R. 1994. Cell wall characteristics in relation to forage digestion by ruminants. *Journal*
566 *of Agricultural Science* 122(2):173 - 181.
- 567 Woisky, R. G., and A. Salatino. 1998. Analysis of propolis: some parameters and procedures for
568 chemical quality control. *Journal of Apicultural Research* 37:99 - 105.
- 569 Wong, D. W. S. 2009. Structure and Action Mechanism of Ligninolytic Enzymes. *Applied*
570 *Biochemistry Biotechnology* 157:174 - 209.
- 571 Wu, H., J. Pei, G. Wu, and W. Shao. 2008. Overexpression of GH10 endoxylanase XynB from
572 *Thermotoga maritima* in *Escherichia coli* by a novel vector with potential for industrial
573 application. *Enzyme and Microbial Technology* 42(3):230 - 234.
- 574 Zhang, C., X.-H. Xing, and M.-S. Liu. 2004. Production of multienzymes consisting of alkaline
575 amylase and cellulase by mixed alkalophilic culture and their potential use in the
576 saccharification of sweet potato. *Biochemical Engineering Journal* 19:181 - 187.
- 577 Zhu, Q. y., R. m. Hackman, J. l. Ensunsa, R. r. Holt, and C. l. Keen. 2002. Antioxidative
578 Activities of Oolong Tea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:6929 - 6934.
- 579 Zopollatto, M., J. L. P. Daniel, and L. G. Nussio. 2009. Aditivos microbiológicos em silagens
580 no Brasil: revisão dos aspectos da ensilagem e do desempenho de animais. *Revista*
581 *Brasileira de Zootecnia* 38:170 - 189.
- 582

CONSIDERAÇÕES FINAIS

583

584

585 A adição do complexo enzimático lignocelulolítico, tanto nos alimentos *in*
586 *natura*, quanto durante a confecção de silagem, tem efeito sobre a composição da
587 parede celular, principalmente, sobre a lignina. Essas alterações refletem em aumento na
588 digestibilidade *in vitro* da matéria seca e da fibra em detergente neutro.

589 Nas silagens de milho e de cana-de-açúcar, houve aumentos na produção de
590 gases *in vitro*, diminuição no tempo de colonização de partícula e, também, aumento da
591 capacidade antioxidante e dos compostos fenólicos. Na silagem de milho as melhores
592 respostas são observadas na dosagem de 20 mg.kg⁻¹ MN. Na silagem de cana-de-açúcar,
593 os resultados são melhores na dosagem de 10 mg.kg⁻¹ MN.

594 O efeito da adição do complexo enzimático durante 30 minutos sobre os
595 alimentos ricos em fibra, apesar de positivo, há necessidade de explorar mais esse
596 assunto, como usar doses crescentes do complexo enzimático, a fim de determinar a
597 melhor dose haja vista que a dose utilizada foi baseada nos resultados obtidos nas
598 silagens.

599 É necessário que sejam realizados estudos para avaliar a resposta animal à este
600 complexo enzimático, uma vez que todos os resultados foram obtidos *in vitro* e foram
601 favoráveis.

602 Os resultados observados permitem inferir que a adição do complexo de enzimas
603 lignocelulolíticas no alimento pode melhorar sua composição química
604 quantitativamente e qualitativamente, como por exemplo, aumentar a energia
605 fermentável, a retenção de nitrogênio e a capacidade antioxidante.

606