



**DÉBORA RIBEIRO GOMIDE**

**RESPOSTA DIGESTIVA DE BOVINOS A DOSES  
DE LEVEDURA AUTOLISADA**

**LAVRAS - MG**

**2012**

**DÉBORA RIBEIRO GOMIDE**

**RESPOSTA DIGESTIVA DE BOVINOS A DOSES DE LEVEDURA  
AUTOLISADA**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Lavras,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Veterinárias, área de  
concentração em Ciências  
Veterinárias, para obtenção do título  
de Mestre.

**ORIENTADOR**

**PROF. DR. MARCOS NEVES PEREIRA**

**CO-ORIENTADOR**

**DRA. RENATA APOCALYPSE NOGUEIRA PEREIRA**

**LAVRAS - MG**

**2012**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca da UFLA**

Gomide, Débora Ribeiro.

Resposta digestiva de bovinos a doses de levedura autolisada /  
Débora Ribeiro Gomide. – Lavras : UFLA, 2012.

58 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Marcos Neves Pereira.

Bibliografia.

1. *Saccharomyces cerevisiae*. 2. Produção microbiana. 3. Rúmen .I.

Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 636.2089232

**DÉBORA RIBEIRO GOMIDE**

**RESPOSTA DIGESTIVA DE BOVINOS A DOSES DE LEVEDURA  
AUTOLISADA**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Lavras,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Veterinárias, área de  
concentração em Ciências  
Veterinárias, para obtenção do título  
de Mestre.

APROVADA em 30 de julho de 2012.

Dra. Renata Apocalypse Nogueira Pereira - EPAMIG

Prof. Dr. Gustavo Augusto de Andrade - IFET

Prof. Dr. Raimundo Vicente de Souza - UFLA

Prof. Dr. Marcos Neves Pereira  
(Orientador)

**LAVRAS - MG**

**2012**

Dedico este trabalho

A Deus, que me deu a vida junto de pessoas tão especiais e pelas oportunidades, que me guiaram por este caminho de conquistas.

À minha mãe Marlene, que tornou possível toda a realidade que vivo, sempre me incentivando, apoiando, orientando. Criou entre nós este vínculo de muito amor e amizade.

Às minhas irmãs Renata e Sabrina. Agradeço muito o apoio, a torcida e a influência de vocês. Ao Bê, e agora ao bebê, que já são meus amores.

A meu pai Marcos que, mesmo ausente, sempre sinto sua energia influenciando minha vida.

À Vó Elza, ao Vô Vivinho e à Cida, que deixaram lembranças e sei que torciam por mim.

A tia Célia e à Vozinha, que me adotaram aqui em Lavras.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Medicina Veterinária (DMV), pela oportunidade concedida para a realização do mestrado.

À Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), pela liberação e incentivo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudos.

Aos professores do Departamento de Medicina Veterinária da UFLA, pelos ensinamentos.

Ao professor Dr. Marcos Neves Pereira, que se dispôs a me orientar, permitindo este crescimento profissional de forma que nunca imaginei.

À co-orientadora Dra. Renata Apocalypse Nogueira Pereira, colega de trabalho e amiga, que intermediou minha orientação e tornou todo este experimento possível.

Aos amigos da Fazenda Experimental e da Unidade Regional, que me ajudaram na condução e nas análises do experimento.

Ao grupo do leite, sempre empenhado e cheio de disposição. Ao Ronaldo que me socorreu, ajudando em todas as etapas deste mestrado. À Naina, ao Vitor, ao Rafael, à Mariana, ao Gil, à Ozana, ao Gustavo, à Fabiana e a todos que de alguma forma trabalharam junto comigo.

Ao pessoal da Embrapa Gado de Leite, que realizou a análise de ácido graxo.

Aos amigos e familiares, mesmo àqueles distantes, guardo todos em meu coração e agradeço muito o companheirismo e incentivo.

Às novilhas, que ajudaram neste trabalho. Aos outros animais da Fazenda, que me enchem de estímulo para lutar pelo seu bem-estar. À Betina minha companheirinha que está sempre ao meu lado, mesmo nas coletas.

Muito obrigada!

## RESUMO

Nove novilhas, com cânula ruminal (510 kg), foram avaliadas quanto à resposta à suplementação com *S. cerevisiae* autolisada (Levabon Rumen, Biomin Nutrição Animal, Piracicaba, SP). Receberam uma sequência de três tratamentos, em delineamento quadrado latino 3x3, durante períodos de 35 dias. Os tratamentos foram: 0 g/d, 10 g/d e 30 g/d, fornecidos através da cânula duas vezes por dia, juntamente com a dieta basal. A dieta em % da matéria seca (MS) continha: 51,8 de silagem de milho e 48,2 de concentrado, com 15 % de proteína bruta (PB), 34 % de fibra em detergente neutro (FDN) e 39 % de carboidrato não fibroso (CNF). Foi induzida queda no pH ruminal, no dia 34 de cada período, por remoção da alimentação, 6 h após o fornecimento, e alimentação *ad libitum*, no dia 35. O pH do rúmen foi avaliado nos dias 28 e 35 às 0, 3, 6, 9, 12, 18 e 24 horas após a alimentação; a concentração de amônia e o nitrogênio ureico no plasma (NUP) foram avaliados, simultaneamente, no dia 28; dia em que foram avaliados também os ácidos graxos de cadeia ímpar. O feno de tifton foi incubado *in situ*, nos dias 30 a 33. A digestibilidade aparente no trato digestivo total da MS foi feita por coleta total de fezes, nos dias 31 a 33. Simultaneamente a urina foi coletada e utilizada para estimar a produção microbiana ruminal, por meio da excreção de alantoína. Os modelos estatísticos possuem efeito de período, de novilha e de tratamento; alguns, também, com efeito de tempo e de interação tempo tratamento. Os contrastes pré-planejados foram: T0 x T10 e T0 x T30. O pH ruminal não respondeu aos tratamentos. O protocolo foi eficiente em causar acidose subaguda, onde o pH permaneceu em média por 11,28 h abaixo de 5,8 no dia 35. A excreção urinária de alantoína em mmol/d foi: 53,3 em T0; 60,5 em T10 ( $P=0,50$ ) e 77,6 em T30 ( $P=0,04$ ). Houve tendências para aumento no kd da fração B, do feno de tifton, no T30 para MS ( $P=0,07$ ) e para FDN ( $P=0,06$ ). A digestibilidade total da MS foi (% do consumo): 67,3 em T0,

68,4 em T10, 69,5 em T30 ( $P>0,28$ ). Nos dias 28 a 33, a ingestão de MS foi aumentada de 11,7 kg/d para 12,5 em T10 ( $P=0,04$ ), mas nenhuma resposta foi induzida para T30 ( $P=0,88$ ). A concentração de amônia ruminal não diferiu ( $P>0,58$ ), enquanto o NUP (mg/dL) foi: 17,5 em T0, 18,5 em T10 ( $P=0,14$ ) e 19,1 em T30 ( $P=0,03$ ). O T10 induziu uma curva de NUP mais plana, ao longo do dia, em relação a T0 e T30. Os picos de amônia no rúmen, posteriores à alimentação da manhã, induziram picos de NUP, enquanto os picos noturnos foram seguidos de diminuição do NUP. T10 e T30 aumentaram a concentração de *iso* C17:0, tenderam a aumentar *iso* C17:0 + *iso* C15:0. A suplementação com levedura autolisada induziu o crescimento de bactérias celulolíticas e a produção microbiana. Além de aumento numérico e dose dependente quanto à digestibilidade.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*. Produção microbiana. Rúmen.

## ABSTRACT

Response to autolyzed *S. cerevisiae* supplementation (Levabon Rumen, Biomin) was evaluated. Nine ruminally cannulated heifers (510kg) received a sequence of treatments in 35-d period, 3x3 Latin Squares. Treatments were 0, 10 or 30g/d, given twice daily via cannula. A TMR was individually fed twice a day: 51.8% corn silage, 48.2% concentrate, 15% CP, 34% NDF, 39% NFC. Low ruminal pH was induced by feed removal at 12h post-morning feeding on d 34 and ad libitum feeding on d 35. Ruminal pH was evaluated on d 28 and 35 at 0, 3, 6, 9, 12, 18 and 24h post-feeding, and ruminal ammonia and PUN simultaneously on d 28. Tifton was incubated in situ over time on d 30 to 33. Total tract digestibility of DM was done by total collection of feces on d 31 to 33, simultaneously to urine sampling to estimate the relative rumen microbial yield by allantoin excretion. Statistical models had the effects of heifer, period and treatment; some had time and time by treatment interaction. Preplanned contrasts were: T0 vs. T10 and T0 vs. T30. Ruminal pH did not respond to treatments ( $P > 0.20$ ), neither protozoa count ( $P > 0.24$ ). Mean and minimum pH were 6.45 and 6.01 on d 28, and 6.16 and 5.38 on d 35, respectively, nadir was at 12h post-feeding. Urinary allantoin excretion was (mmoles/d): 53.3 on T0, 60.5 on T10 ( $P = 0.50$ ), 77.6 on T30 ( $P = 0.04$ ). There were trends for increased kd of Tifton B fraction on T30 for DM ( $P = 0.07$ ) and NDF ( $P = 0.06$ ). Total tract DM digestibility was (% of intake): 67.3 on T0, 68.4 on T10, 69.5 on T30 ( $P > 0.28$ ). Days 28 to 33 DMI was increased from 11.7kg/d to 12.5 on T10 ( $P = 0.04$ ), but T30 induced no response ( $P = 0.88$ ). Day 35 DMI was: 17.0 on T0, 17.2 on T10, 16.4 on T30 ( $P > 0.43$ ). Ruminal ammonia concentration did not differ ( $P > 0.58$ ), but PUN was (mg/dL): 17.5 on T0, 18.5 on T10 ( $P = 0.14$ ), 19.1 on T30 ( $P = 0.03$ ). T10 induced a flattened PUN curve along the day. Ruminal ammonia peaks posterior to the morning feeding induced PUN peaks, while the evening

ammonia peak was associated to decreasing PUN concentration. Autolyzed yeast supplementation induced positive dose dependent responses in rumen microbial yield, digestion and DMI. Ruminal pH regulation by yeast was not a plausible mechanism for the response.

Key-words: *Saccharomyces cerevisiae*. Microbial Yield. Rumen.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>12</b>
<b>2.1 Produção da levedura de cana-de-açúcar .....</b>	<b>12</b>
<b>2.2 Levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....</b>	<b>14</b>
<b>2.3 Levedura <i>S. cerevisiae</i> na nutrição de ruminantes .....</b>	<b>18</b>
<b>2.4 Mecanismo de ação da levedura no rúmen .....</b>	<b>21</b>
2.4.1 Crescimento de microrganismos .....	21
2.4.2 Estabilização do pH ruminal .....	22
2.4.3 Perfil de fermentação ruminal .....	23
2.4.4 Metabolismo de nitrogênio .....	24
2.4.5 Digestibilidade .....	25
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>27</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>32</b>
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>39</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>40</b>
<b>FIGURAS .....</b>	<b>49</b>
<b>TABELAS .....</b>	<b>53</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Leveduras são organismos eucariotos unicelulares do reino dos fungos. A levedura mais comumente utilizada em nutrição de ruminantes é a *Saccharomyces cerevisiae*, coproduto da fermentação dos açúcares da cana na indústria sucroalcooleira. A produção de levedura para suplementação animal a partir da cana-de-açúcar é efetiva tanto quantitativa quanto financeiramente (YAMADA et al., 2003). Seu uso como promotor da digestão ruminal e da imunidade em substituição a promotores químicos do desempenho é coerente à tendência naturalista do mercado consumidor de produtos de origem animal, por ser um aditivo reconhecidamente seguro.

Leveduras podem atuar positivamente sobre o consumo e o desempenho de vacas leiteiras (DESNOYERS et al., 2009) e sobre a incidência de diarreia em bezerros (MAGALHÃES et al., 2008). A suplementação com leveduras pode melhorar a colonização de partículas alimentares no rúmen e acelerar o crescimento de bactérias celulolíticas e das utilizadoras de lactato (CHAUCHEYRAS-DURAND; WALKER; BACH, 2008). Pode induzir ganho em pH ruminal (BACH et al., 2007) e em digestibilidade da fibra (BITENCOURT et al., 2011).

Os produtos comerciais que contêm leveduras são compostos de leveduras vivas ou misturas em distintas proporções de leveduras vivas e mortas, na presença ou não do meio de cultivo. Uma outra classe de produto é a levedura autolisada. A autólise induzida industrialmente por mecanismo intracelular (ZHAO; FLEET, 2003; POZO-DENGRÁ et al., 2006) teoricamente disponibiliza componentes da levedura capazes de estimular a fermentação ruminal, como peptídeos, aminoácidos, vitaminas, minerais e ácidos orgânicos (GANNER et al., 2012).

Com este trabalho objetivou-se avaliar o efeito de doses de levedura autolisada de cana-de-açúcar sobre a fermentação ruminal e a digestibilidade em novilhas fistuladas no rúmen.

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Produção da levedura de cana-de-açúcar**

Introduzida no período colonial, a cana-de-açúcar transformou-se em uma das principais culturas da economia brasileira, tornando o País líder mundial na produção de açúcar e etanol. O etanol brasileiro conta com projeções positivas de produção estimadas para 2019 em 58,8 bilhões de litros (BRASIL, 2009?). O crescimento previsto na produção de etanol aumentará a produção da levedura de cana-de-açúcar. Sua recuperação, como coproduto de indústrias sucroalcooleiras, rende cerca de 25 g de levedura seca por litro de álcool produzido (HISANO et al., 2008). Dessa forma, a produção brasileira estimada de levedura poderá ultrapassar 1,5 milhão de toneladas em 2019.

Durante a fabricação do etanol, o produto alcoólico formado é filtrado para separação do material denominado leite de levedura, que contém elevada concentração de álcool e de outros contaminantes do mosto de fermentação (YAMADA et al., 2003). O leite de levedura pode ser processado por diferentes rotas. De acordo com Yamada et al. (2003), os contaminantes são eliminados, em boa parte, por lavagens com água. Sgarbieri et al. (1999) sugeriram que a centrifugação associada a lavagens pode resultar em biomassa limpa. As células

de levedura podem também ser inativadas termicamente ou não (LYNCH; MARTIN, 2002).

Pesquisas têm sido realizadas para avaliar o potencial alimentício da levedura produzida como coproduto da indústria de etanol (YAMADA et al., 2003). O melhor aproveitamento da biomassa de levedura, pelo seu fracionamento e produção de derivados com propriedades distintas, agrega valor aos produtos, tornando-os mais rentáveis para as indústrias (SGARBIERI et al., 1999). Atualmente, a levedura viva seca e alguns derivados do seu processamento, tais como cultura de levedura, levedura autolisada integral, extrato de levedura desidratado e parede celular desidratada, estão sendo utilizados como suplementos alimentares para humanos e animais (HISANO et al., 2008; SGARBIERI et al., 1999).

A cultura contém *S. cerevisiae* e o meio em que foi cultivada, sendo produzida pela secagem de todo material sem destruir os componentes associados à levedura, tais como vitaminas do complexo B e outros produtos da fermentação. Os suplementos de leveduras vivas contêm células sem o meio de cultivo e utiliza um processo que mantém alta contagem de células vivas. Apesar da cultura de levedura conter algumas *S. cerevisiae* metabolicamente ativas, a levedura viva possui quantidade mais elevada de células viáveis (LYNCH; MARTIN, 2002).

A autólise é uma alternativa para extração de proteínas de microrganismos (HISANO et al., 2008), sendo um processo irreversível, que resulta na morte das células. A autólise ocorre naturalmente nas leveduras, quando completam seu ciclo de crescimento e entram na fase de morte. É caracterizada por um período de latência, no qual a célula da levedura sofre autofermentação. Neste processo o microrganismo consome suas reservas de glicogênio e, quando a glicose esgota, o citoplasma passa por mudanças irreversíveis, iniciando proteólises que resultam em acúmulo de polipeptídeos e aminoácidos. Durante a autólise

também ocorre aumento da porosidade da parede celular e de sua permeabilidade. Este processo mediado por enzimas endógenas resulta em hidrólise de proteínas celulares e liberação de peptídeos e aminoácidos para o ambiente extracelular (ZHAO; FLEET, 2003; POZO-DENGRÁ et al., 2006).

Para obter a levedura autolisada comercial, o processo pode ser induzido por mecanismos físicos, químicos e enzimáticos (BABAYAN et al., 1981). Os métodos físicos incluem aquecimento, radiação ultravioleta, ruptura mecânica com homogeneização em alta pressão ou com contas de vidro. Quando realizada por aquecimento, é necessária a aplicação cuidadosa do calor, para matar as células sem inativar as enzimas na levedura. Outra forma é a adição de indutores químicos, que interrompem a estrutura da membrana por dissolução de lipídeos e proteínas e/ou modificam o pH ativando proteases. Os agentes químicos podem ser detergentes, compostos orgânicos, hidróxido de sódio, ácido clorídrico ou sais inorgânicos. Alguns, além de induzir a autólise, previnem a deterioração por microrganismos. Outros podem inviabilizar a utilização das leveduras na alimentação animal (OLIVEIRA; GÓMEZ, 2005; FERREIRA et al., 2010; POZO-DENGRÁ et al., 2006). A adição de proteases tem demonstrado ser o método mais eficaz para induzir a autólise. Enzimas podem matar as células sem degradar enzimas endógenas como proteases, glucanases e nucleases (POZO-DENGRÁ et al., 2006). A levedura autolisada consiste no conteúdo total da célula lisada, incluindo os componentes hidrossolúveis, as proteínas e a parede celular (OLIVEIRA; GÓMEZ, 2005).

## **2.2 Levedura *Saccharomyces cerevisiae***

A levedura *S. cerevisiae* é o agente microbiano responsável pela fermentação do vinho, cerveja e outras bebidas alcoólicas, além de ser utilizada

como fermento para pão. Está amplamente distribuída no meio ambiente. Por isso, é um microrganismo muito estudado, sendo o primeiro genoma eucariótico a ser completamente sequenciado. Como sua manipulação genética é fácil e barata, o microrganismo tem contribuído para o desenvolvimento de métodos e de tecnologias para a compreensão do genoma humano. Cerca de dois terços das seis mil cepas de *S. cerevisiae* identificadas foram caracterizados (AA et al., 2006). As formas predominantes são alongadas, elípticas ou esféricas, com dimensões variáveis, apresentando aproximadamente de 4 a 16 µm. A maioria das leveduras importantes para a alimentação multiplica-se por fissão ou brotamento. Frequentemente, células-filhas podem não se desprender das células-mãe, surgindo pares, cadeias ou pseudomicélios (TORTORA; FUNKE; CASE, 2000).

Por se tratar de produto natural, a *S. cerevisiae* encontrou espaço nos mercados mais exigentes (CHUNG et al., 2011). As barreiras regulamentares para produtos à base de *S. cerevisiae* são pequenas na América do Norte, onde tais produtos são considerados como seguros pelo *Food and Drug Administration*. Na União Europeia, produtos de levedura devem cumprir regulamentos e apresentar dossiês de segurança e eficácia para cada produto lançado (NEWBOLD; RODE, 2006).

A levedura combina características nutricionais favoráveis, como teor proteico entre 30% e 70%, sendo ricas em vitaminas do complexo B (B1, B2, B6, ácido pantotênico, niacina, ácido fólico e biotina) e em minerais essenciais ao organismo animal, como o selênio (Se). O microrganismo possui espessa parede celular, composta por carboidratos, além de elevado teor de ácidos nucleicos, particularmente RNA (YAMADA et al., 2003; SGARBIERI et al., 1999).

Dentre os carboidratos da levedura podem ser destacados os glucanos e os mananoligossacarídeos (MOS). Além de suas características nutricionais, estes

podem ter efeito positivo sobre o sistema imunológico, aumentando a capacidade de prevenir a colonização por bactérias patogênicas no trato gastrointestinal. Os MOS atuam como sítio de alta afinidade para ligação de bactérias Gram-negativas, removendo agentes patogênicos antes de sua colonização. Os glucanos ( $\beta$ -1,3/1,6-glucano), outro componente da parede celular da levedura, têm demonstrado efeitos imunomoduladores, quando suplementado para ruminantes jovens (NOCEK; HOLT; OPPY, 2011). Há relatos que a suplementação com levedura reduziu casos de hipertermia em bezerros durante o desmame, e a utilização de MOS na dieta de vacas secas aumentou a resposta imune humoral ao rotavírus (NOCEK; HOLT; OPPY, 2011).

A biotina é uma das vitaminas do complexo B, que também está presente nas leveduras, e é um nutriente essencial para as bactérias do rúmen. É indispensável para a gliconeogênese, para a síntese de ácidos graxos e de proteínas. A biotina é cofator para quatro enzimas, a acetil-CoA carboxilase, a piruvato carboxilase, a  $\beta$ -metilcrotonil-CoA carboxilase e a propionil-CoA carboxilase. Estas enzimas estão envolvidas nas reações celulares de todos os organismos vivos para fixação do dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), sendo requeridas para o crescimento de bactérias celulolíticas. Dessa forma, sua suplementação para ruminantes pode melhorar a degradação da fibra no rúmen (CHEN et al. 2011). Chen et al. (2011) realizaram uma meta-análise de nove estudos com suplementação biotina. Esses autores sugeriram que esta vitamina para vacas em lactação pode aumentar o consumo de matéria seca (MS) e a produção de leite.

O malato é um ácido orgânico encontrado nas leveduras. Newbold, Wallace e McIntosh (1996) observaram que houve produção de malato *in vitro* por células de *S. cerevisiae*. A concentração de malato no fluido ruminal aumentou de 10 para 25,5 mg/L após 2 h da inclusão da levedura no meio de cultivo. A centrifugação e a remoção das células de leveduras do fluido ruminal

reduziram a concentração de ácido málico, indicando a presença do malato ligado a essas células. A autólise pode favorecer a biodisponibilidade de malato para as bactérias do rúmen. Quando livre, o malato é rapidamente utilizado pelos microrganismos, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (UNGERFELD; FORSTER, 2011).

É sugerido que a presença de malato aumente o sequestro de hidrogênio ( $H_2$ ) livre no rúmen. O  $H_2$  produzido durante a fermentação de carboidratos a acetato e butirato pode ser utilizado para converter o malato em propionato, por via metabólica capaz de produzir ATP para as bactérias ruminais. O ácido málico é um intermediário na produção de succinato por algumas bactérias do rúmen, presentes na produção de propionato a partir de piruvato pela via do ácido dicarboxílico. A produção de ATP e o consumo de elétrons podem melhorar a eficiência da extração de energia a partir da matéria orgânica (MO) fermentada no rúmen (UNGERFELD; FORSTER, 2011; CARRO et al., 1999).

Em experimentos *in vitro*, a adição de malato estimulou o crescimento das bactérias ruminais *Selenomonas ruminantium*. Carro et al. (1999) utilizaram a técnica de simulação ruminal (RUSITEC), para avaliar os efeitos a longo prazo do malato sobre a fermentação de dietas com proporção 50:50 entre forragens e concentrados. A adição de malato aumentou a utilização de lactato e a síntese bacteriana. O  $CO_2$  é o produto final da fermentação de metil-malonil-CoA a propionato, última reação na conversão de piruvato a propionato pela rota do ácido dicarboxílico. A formação de propionato a partir do malato pode reduzir a disponibilidade de  $H_2$  para síntese de metano (UNGERFELD; FORSTER, 2011).

Newbold, Wallace e McIntosh (1996) também avaliaram os efeitos da levedura e do ácido málico sobre a população microbiana ruminal *in vivo*. Os tratamentos ofertados aos ovinos fistulados no rúmen foram controle não suplementado, 4 g/dia de *S. cerevisiae* cepa NCYC 240, 50 mg/d de malato

misturado à cevada e infusão ruminal de 100 mg de malato ao longo do dia, simulando liberação contínua por células lisadas de leveduras. O único resultado significativo apresentado foi o aumento em 39% da concentração de bactérias no fluido ruminal com a suplementação de leveduras vivas.

### **2.3 Levedura *S. cerevisiae* na nutrição de ruminantes**

A *S. cerevisiae* não é encontrada naturalmente no rúmen. Lund (1974) analisou a presença de leveduras no rúmen de bovinos, a fim de estabelecer quantidades e variedades, bem como suas dependências aos tipos de alimentos ofertados aos animais e crescimento em condições anaeróbias. Este autor não mencionou nenhum tipo de *Saccharomyces*, além de observar poucas leveduras no fluido ruminal e destacar que a maioria foi destruída durante a passagem através do trato digestivo. Al-Shahwani, Berry e Berry (1978) avaliaram as condições de crescimento da *S. cerevisiae* para induzir a ruptura espontânea das células. Esses autores demonstraram que até a temperatura de 27 °C, a maioria das células permanecem ativas, ocorrendo gradual redução do número de células viáveis com o aumento da temperatura. Dessa forma, é possível afirmar que a levedura *S. cerevisiae* não é capaz de colonizar o trato digestivo, devendo ser constantemente introduzida no rúmen com o alimento.

Newbold et al. (1995) relataram que o primeiro estudo utilizando *S. cerevisiae* como promotor de desempenho em ruminantes data de 1925, por Eckles e Williams. Conforme Chaucheyras-Durand, Walker e Bach (2008), seus efeitos na microbiota ruminal foram extensivamente estudados ao longo dos últimos 15 anos. Respostas positivas em desempenho têm sido relatadas para animais lactantes e em crescimento (NEWBOLD et al., 1995), mas o mecanismo de ação não é completamente compreendido (HRISTOV et al., 2010;

BITENCOURT et al., 2011). Estudos priorizam sua utilização como aditivo, em baixa inclusão na dieta, com função de modificar o ambiente ruminal, diminuindo o risco de acidose e melhorando a digestibilidade do alimento (CHAUCHEYRAS-DURAND; WALKER; BACH, 2008).

A resposta animal ao uso de produtos de leveduras pode depender da dose suplementada. Lesmeister, Heinrichs e Gabler (2003) observaram que a resposta em aumento do consumo de MS de bezerros à suplementação com cultura de levedura *S. cerevisiae* foi diretamente proporcional à inclusão do produto na dieta, sendo avaliados teores de 0%, 1% e 2% da MS.

Kung et al. (1997) realizaram experimentos com *S. cerevisiae* avaliando a efetividade de diferentes dosagens. O primeiro estudo, realizado *in vitro*, utilizou oito fermentadores contendo 500 mL de fluido ruminal. O líquido foi coletado de um novilho alimentado com 35% de alfafa, 15% de silagem de milho e 50% de concentrados na MS. Depois de dez dias de adaptação, os fermentadores foram suplementados por cinco dias com 0, 20 ou 200 mg de levedura viva (BIOMATE Plus. Chr. Hansen Biosystems). Não houve efeito de tratamento sobre a concentração de ácidos graxos voláteis (AGV) ou o pH ruminal, com exceção do teor de valerato que foi menor para o tratamento com 200 mg. A maior dose de levedura também aumentou o teor de N amoniacal. Em outro experimento, os autores avaliaram a produção de leite de 18 vacas multíparas, suplementadas com 0, 10 ou 20 g/d da mesma levedura em delineamento Quadrado Latino (QL) 3x3, em períodos de 28 dias. Houve tendência de aumento da produção de leite e leite corrigido para 3,5% de gordura em vacas alimentadas com 10 g/d de levedura (40,5 kg/d e 39,3 kg/d) em comparação ao controle (39,6 kg/d e 36,4 kg/d) e ao tratamento com 20 g (40,2 kg/d e 38 kg/d).

Lascano, Heinrichs e Tricarico (2012) avaliaram 0, 10, 30 e 50 g/d de cultura de levedura *S. cerevisiae* (Yea-Sacc 1026. Alltech Inc.) em dietas que variaram no teor de amido (28% e 17%). Para a realização desse experimento,

oito novilhas fistuladas no rúmen foram agrupadas ao acaso como parcelas subdivididas em delineamento QL 4x4 com períodos de 21 dias. Os autores relataram aumento quadrático na digestibilidade da MS, da MO, da fibra em detergente neutro (FDN) e da fibra em detergente ácido (FDA), sendo o melhor resultado obtido na dose de 30 g/d. A levedura também aumentou de forma quadrática a digestibilidade do N nas dietas com baixo amido, enquanto não foi detectado efeito nas novilhas alimentadas com alto teor de amido.

Marsola et al. (2010) avaliaram suplementação de vacas leiteiras com 0, 0,5 e 1 g/d de levedura viva. A maior dosagem aumentou a relação entre a produção de leite corrigido para energia e o consumo de MS e a produção diária de proteína no leite.

Duas meta-análises avaliaram a resposta de vacas leiteiras à suplementação com leveduras. Desnoyers et al. (2009) demonstraram que a suplementação com produtos à base de *S. cerevisiae* aumentou a ingestão de MS em 44 g/100 kg de peso vivo e a produção de leite em 1,2 kg/d, havendo tendência de aumento no teor de gordura do leite em 0,05%, sem efeito sobre o teor de proteína. Rabiee et al. (2008) avaliaram dados de 32 estudos com vacas em lactação, alimentadas ou não com um único produto comercial contendo cultura de *S. cerevisiae* (Diamond V). A adição de cultura de levedura resultou em aumento numérico na ingestão de MS (250 g/d; IC 95% = -1.320 a 300 g/d;  $P = 0,13$ ). Já no caso de produção de leite, a suplementação com cultura de levedura resultou em aumento de 0,93 kg/d, sendo a resposta independente do estágio da lactação, duração do estudo e dose de levedura suplementada.

## 2.4 Mecanismo de ação da levedura no rúmen

### 2.4.1 Crescimento de microrganismos

Muitos mecanismos têm sido propostos para o estímulo do crescimento dos microrganismos do rúmen por *S. cerevisiae* (NEWBOLD et al., 1995). O estímulo do crescimento microbiano pode ser o mecanismo de ação central da levedura no rúmen, resultando em aumento na degradação da fibra e no fluxo de proteína microbiana (WILLIANS et al., 1991). Acredita-se que, indiretamente, este efeito também estabilize o pH ruminal (CHUNG et al., 2011).

Em sua revisão, Chung et al. (2011) reportaram que *S. cerevisiae* aumenta a população de protozoários no rúmen de carneiros e estimula o crescimento *in vitro* de bactérias que utilizam lactato como *S. ruminantium* e *Megasphaera elsdenii*. Newbold et al. (1995), ao avaliarem o efeito de *S. cerevisiae* sobre o número de bactérias do rúmen *in vitro*, observaram que três dentre cinco cepas de levedura viva aumentaram o número de bactérias celulolíticas. Essas três cepas foram, posteriormente, avaliadas *in vivo* em ovelhas fistuladas no rúmen e suplementadas com 2 g de levedura. Esse trabalho apresentou tendência de aumento no número de bactérias celulolíticas, mas as cepas diferiram na capacidade de aumentar o número total de bactérias viáveis. Os autores concluíram que existe diferença entre cepas de *S. cerevisiae* na capacidade de modificar a população bacteriana do rúmen.

Yoon e Stern (1996) avaliaram o efeito da suplementação com 57 g de cultura de levedura sobre a fermentação ruminal de vacas em lactação fistuladas no rúmen e no duodeno. A contagem de bactérias proteolíticas apresentou resultados de  $3,09 \times 10^8/\text{mL}$  com o uso de leveduras e  $2,00 \times 10^8/\text{mL}$  para o controle. Entretanto a suplementação não alterou a contagem de bactérias celulolíticas, amilolíticas e de protozoários ciliados. Chaucheyras-Durand, Walker e Bach (2008), em sua revisão, indicaram aumento no número de células

bacterianas como resultado mais consistente observado com a suplementação de leveduras vivas. Também relataram que maior crescimento de bactérias que metabolizam lactato, como *M. elsdenii* e *S. ruminantium*, tem sido observado *in vitro*. Outro efeito apresentado por esses autores foi o estímulo aos protozoários ciliados Entodiniomorphids, sugerindo importância desses microrganismos para a estabilização do pH ruminal, por sua capacidade de fagocitar rapidamente grânulos de amido, competindo com as bactérias amilolíticas por esse substrato. Entodiniomorphids também são capazes de utilizar lactato, impedindo seu acúmulo no rúmen.

#### 2.4.2 Estabilização do pH ruminal

O alto consumo de carboidratos rapidamente fermentáveis induz queda no pH ruminal e aumento da concentração de AGV. Em casos de acidose clínica (ou láctica), a redução inicial do pH faz com que bactérias produtoras de lactato (*Streptococcus bovis*) superem o crescimento das espécies que o utilizam (*M. elsdenii* e *S. ruminantium*). Assim, ocorre acúmulo de lactato no rúmen. O ácido láctico possui menor pKa que os AGV, o que acentua a queda do pH. Ocorre alteração da diversidade microbiana, inicialmente com redução de espécies bacterianas que degradam fibra (*Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* e *Ruminococcus flavefaciens*), sensíveis ao pH baixo. Como o pH continua a cair, os *Lactobacilos* podem substituir *S. bovis* na produção de ácido láctico, dando início a um efeito em espiral, com acúmulo excessivo de lactato, o que resulta em acidose metabólica e, eventualmente, morte (CHAUCHEYRAS-DURAND; WALKER; BACH, 2008; PLAIZIER et al., 2008).

Diversos estudos relatam o efeito da levedura viva na estabilização do pH do rúmen. Williams et al. (1991) relataram maior pH ruminal para animais alimentados com cevada e feno e suplementados com levedura viva associada ao meio de cultivo. O maior pH foi associado à redução na concentração de lactato

no fluido. Marden et al. (2008) apresentaram o mesmo mecanismo ao comparar o efeito de leveduras vivas ao do bicarbonato. Esses autores encontraram maior concentração de AGV e redução do lactato nos animais suplementados com levedura. Entretanto, Al Hibraim et al. (2010), ao examinarem o efeito da suplementação com leveduras vivas, não encontraram influência da suplementação sobre o pH médio e a concentração de ácido láctico no rúmen de vacas leiteiras.

Pelos mecanismos apresentados, a capacidade de leveduras induzir aumento no pH ruminal é dependente do acúmulo de lactato no fluido do rúmen. Entretanto, vacas leiteiras de alta produção rotineiramente não têm acúmulo intrarruminal de ácido láctico (OETZEL; NORDLUND; GARETT, 1999), e sim, períodos diários de baixo pH e acúmulo de todos os AGV, caracterizando a diferença entre acidose clínica (ou láctica) e acidose subclínica, respectivamente (PLAIZIER et al., 2008). O efeito positivo de leveduras sobre o pH ruminal pode depender da prevalência de acidose láctica no rebanho.

#### 2.4.3 Perfil de fermentação ruminal

Experimentos *in vitro* e *in vivo* sugerem que a resposta em perfil de fermentação ruminal à suplementação com *S. cerevisiae* não tem sido consistente (NEWBOLD; WALLACE; MCINTOSH, 1996; MARDEN et al., 2008; HRISTOV et al., 2010). A suplementação com leveduras pode estimular a captação microbiana de lactato e a digestão da fibra (LYNCH; MARTIN, 2002). Marden et al. (2008) encontraram maior concentração total de AGV com leveduras vivas em comparação ao controle. Hristov et al. (2010), ao compararem a levedura XP (Diamond V Mills Inc.) a um tratamento-controle, não encontraram efeito na concentração total e individual de AGV, nem na relação acetato:propionato, havendo apenas aumento na concentração de valerato.

Lynch e Martin (2002) avaliaram o efeito *in vitro* de duas dosagens (0,35 e 0,73 g) de levedura viva e de uma cultura de levedura. Esses autores utilizaram líquido ruminal coletado de um novilho fistulado, alimentado com pastagem e concentrado, uma vez ao dia. Os produtos reduziram a relação acetato:propionato no fluido, demonstrando que o efeito da levedura sobre o perfil de fermentação ruminal não requer a presença de células vivas.

Os efeitos da levedura já relatados, que estimularam a atividade de microrganismos fibrolíticos e a acetogênese ruminal a partir de H<sub>2</sub>, deveriam aumentar a relação acetato:propionato. Tais fatos estão relacionados com a maior digestibilidade da fibra dietética (CHAUCHEYRAS-DURAND; WALKER; BACH, 2008). Entretanto, assim como Lynch e Martin (2002) muitos pesquisadores verificaram diminuição na relação acetato:propionato com a suplementação de levedura (ERASMUS; BOTHA; KISTNER, 1992; MARDEN et al., 2008; WILLIAMS et al., 1991). Este resultado foi justificado como provável estímulo de bactérias que podem converter lactato ruminal em propionato. Bitencourt et al. (2011) não encontraram efeito sobre o perfil de fermentação por meio da relação acetato:propionato com a suplementação da cepa 1077-I CNCM de levedura.

#### 2.4.4 Metabolismo de nitrogênio

O impacto de leveduras sobre a concentração ruminal de amônia *in vivo* tem sido variável. Al Hibrain et al. (2010) examinaram o efeito da suplementação com levedura Yea-Sacc1026 TS (Alltech Inc.) em vacas leiteiras no período pós-parto. No líquido ruminal, colhido por ruminocentese, foi encontrado maior concentração de amônia para os animais do grupo controle, em relação aos tratados. Os autores argumentam que a menor concentração de amônia ruminal no grupo suplementado pode ter sido em função do aumento de sua incorporação na proteína microbiana. Nesse trabalho deduziu-se que a

levedura possa ter reduzido a atividade das bactérias proteolíticas no rúmen. Resultado contrário ao relatado por Yoon e Stern (1996) que encontraram aumento na contagem de bactérias proteolíticas com o uso de leveduras em dietas de vacas leiteiras.

Hristov et al. (2010) avaliaram o efeito de 56 g de *S. cerevisiae* na fermentação ruminal de oito vacas fistuladas no rúmen em delineamento cross over, com dois períodos de 28 dias, utilizando uma dieta com 45% de CNF. Esses autores encontraram tendência de redução na concentração de amônia e uma sutil, mas significativa, redução na perda de nitrogênio (N) fecal para os animais tratados. As concentrações de proteína no leite e de ureia no leite e no plasma não foram diferentes entre os tratamentos, assim como as perdas de N total (urinário e fecal) como proporção do N ingerido.

A suplementação de vacas em lactação com leveduras vivas, realizada por Bitencourt et al. (2011) e Oliveira et al. (2010), não demonstrou efeito sobre o metabolismo de N, pela ausência de diferença nas concentrações desse composto, no plasma e no leite, dos animais tratados e controle.

#### 2.4.5 Digestibilidade

A suplementação com leveduras pode melhorar a eficiência digestiva em ruminantes. Entretanto seus efeitos têm sido variáveis e dependentes da dieta (DESNOYERS et al., 2009). Bitencourt et al. (2011) avaliaram a digestibilidade da dieta e a performance de vacas em lactação suplementadas com *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-1077 (Lallemand SAS, Toulouse, França). Esses autores forneceram 10 g de levedura de forma que contenha  $1 \times 10^{10}$  UFC por vaca. Os resultados encontrados indicaram tendência de aumento na digestibilidade da fibra, sendo este aumento utilizado para justificar a resposta positiva sobre a secreção de proteína no leite.

Lascano; Heinrichs; Tricarico, (2012) avaliaram dietas de alto amido (30% da MS composta por milho moído e grãos) e de baixo amido (15% da MS composta por polpa cítrica e grãos) associadas a diferentes dosagens de *S. cerevisiae* na digestão de nutrientes e nos metabólitos sanguíneos de novilhas leiteiras. Esses autores encontram aumento na digestibilidade da MO, MS, FDN e FDA com 10 g/d de levedura que atingiu valor máximo com 30 g/d. O aumento da dose diária de levedura também tendeu a aumentar de forma quadrática a digestibilidade da hemicelulose.

Ferraretto, Shaver e Bertics (2012) encontraram maior digestibilidade da MS e da MO em dietas com alto amido suplementadas com levedura em comparação ao controle, além de aumento da digestibilidade do FDN com a maior dose de levedura. Nesse trabalho foram utilizadas 2 e 4 g de levedura viva por animal (LCY; Procreatin-7, Lesaffre Feed Additives) em dietas com 30% de amido.

Wallace e Newbold (2007) argumentam que o aumento no número total de bactérias ruminais é a principal resposta à suplementação com leveduras, e que este aumento na população bacteriana seria capaz de induzir ganhos na digestão da fibra. Marden et al. (2008), ao avaliarem como a levedura viva difere do bicarbonato de sódio na estabilização do pH ruminal em vacas de alta produção, verificaram que a digestibilidade da FDN e da FDA foi maior utilizando levedura em comparação ao bicarbonato e ao controle sem suplementação. Esses autores indicaram que as leveduras vivas reduziram o acúmulo de lactato (16,5 mM no controle, 12,2 mM no bicarbonato e 5,4 mM na levedura), estabilizando o pH (5,94 no controle, 6,21 no bicarbonato e 6,14 na levedura) e melhorando a digestão da fibra (29,6% controle, 34,3% bicarbonato e 41,6% levedura).

Apesar de Hristov et al. (2010) terem encontrado melhora numérica para os resultados de digestibilidade da MS, MO, FDN e amido, estes não diferiram

estatisticamente, ao ser testados os efeitos da suplementação com *S. cerevisiae* inativada sobre a fermentação ruminal e a utilização de nutrientes por vacas em lactação.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em acordo com os princípios éticos da experimentação animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Ufla, Protocolo nº 037/11. Nove novilhas mestiças Holandês-Zebu ( $451 \pm 31$  kg de peso vivo, no início do experimento), com fístula ruminal, foram alimentadas individualmente às 7 h e 13 h, em confinamento total do tipo *tie stall*, com camas de areia e acesso irrestrito à água (Fig. 1). Os animais foram pesados semanalmente, duas vezes ao dia, às 7 h e 19 h. Os animais foram agrupados em três grupos com base no peso vivo inicial, e alocados, dentro de grupo, a uma sequência de três tratamentos em delineamento do tipo QL 3x3, com períodos de 35 dias, conduzidos simultaneamente e com mensurações realizadas a partir do dia 28 de cada período. Os tratamentos foram: T0 – Controle, T10 – 10 g/d de levedura (*S. cerevisiae*) autolisada cultivada em caldo de cana-de-açúcar (Levabon® Rumen. Biomin Nutrição Animal, Piracicaba, SP), T30 – 30 g/d de levedura autolisada. A levedura foi introduzida via fístula ruminal simultaneamente às duas ofertas diárias de alimento.

A mistura dos ingredientes da dieta foi executada imediatamente antes de cada alimentação, e a quantidade ofertada foi suficiente para prover pelo menos 10% do oferecido como sobra diária. Uma dieta de alta densidade energética foi formulada (52% de silagem de milho e 48% de concentrados) com o intuito de ter alta acidogênese ruminal (Tabela 1). No dia 34 de cada período, foi iniciado um protocolo de indução de acidose ruminal, após a oferta matinal de alimentos

(7 h). O alimento não consumido foi removido às 13 h, e os animais foram novamente alimentados às 7 h e às 13 h do dia 35, *ad libitum*.

A quantidade de dieta ofertada e as sobras deixadas de cada animal foram mensuradas diariamente. Amostras diárias dos alimentos e sobras foram congeladas, para a formação de amostras compostas por semana. Os compostos foram pré-secos em estufa ventilada a 55 °C, por 72 h, triturados em peneira com crivo de 1 mm em moinho do tipo Thomas-Willey, e uma subamostra foi desidratada a 100 °C, por 24 h, para determinar o teor de MS. O consumo de MS (CMS) entre os dias 28 e 33 e nos dias 34 e 35 serviram para comparar os tratamentos. O teor de proteína bruta (PB) foi mensurado por destilador a vapor do tipo Microkjeldhal (ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS, 1975), o extrato etéreo (EE) segundo o Association of Official Agricultural Chemists (1990), as cinzas por incineração da amostra a 550 °C, por 8 h e a FDN por determinador de fibra TE-149 (TECNAL, Piracicaba, SP), usando sulfito de sódio e amilase.

Os teores de MS, PB, EE e cinzas da levedura autolisada foram mensurados similarmente ao teor dos alimentos e sobras. O teor dos minerais foi determinado segundo Malavolta, Vitti e Oliveira (1997). Para o boro a levedura foi incinerada a 550 °C e depois analisada pelo método da curcumina e álcool etílico. Para os demais minerais, primeiramente a amostra foi submetida à digestão nitroperclórica, onde se obteve um extrato. Esse extrato foi submetido a análise de fotometria de chama para determinação do teor de potássio, de colorimetria para o fósforo, de turbidimetria com cloreto de bário para o enxofre e de espectrometria de absorção atômica para o cálcio, o magnésio, o zinco, o cobre, o manganês e o ferro (Tabela 2). A levedura autolisada também foi visualizada por microscopia eletrônica e ótica e submetida à semeadura em placas. O preparo da amostra para análise em microscopia eletrônica foi conforme Bossola e Russell (1999), seguido de visualização em microscópio

eletrônico de varredura Zeiss-DSM 950. Para a microscopia ótica, 1 g do produto foi dissolvido em 5 mL de água destilada. Esta solução foi misturada a igual proporção de solução de azul de metileno e citrato de sódio (0,01 g de azul de metileno, 2 g de citrato de sódio e 100 mL de água destilada) e visualizada com magnificação de 400X.

Para o plaqueamento, uma amostra de 1g do produto foi misturado a 9 mL de água peptonada estéril e homogeneizada por 20 min em agitador. A amostra foi então submetida à diluição seriada para cultivo em meio YEPG (0,3% de extrato de levedura, 0,3% de extrato de malte, 1,0% de glicose, 2,0% de ágar, contendo 100 mg de cloranfenicol/L, pH 3,5 - Merck, Darmstadt, Alemanha; e 0,5% de peptona - Himedia, Mumbai, Índia). As placas foram incubadas por três dias a 30 °C para contagem de colônias.

Amostragem de sangue dos vasos coccígeos e do fluido ruminal foi executada nos dias 28 e 35 às 0, 3, 6, 12, 18 e 24 h, após a alimentação matinal. O sangue foi colhido em tubo vacuolizado e o plasma centrifugado a 1006xg para congelamento a -20 °C. O teor de N ureico no plasma (NUP) foi analisado por kit laboratorial Ureia 500 (Doles Reag. Equip. para Laboratórios Ltda. Goiânia, GO).

O fluido ruminal foi obtido do saco ventral do rúmen com amostrador de PVC. Após filtragem em peneira plástica, o pH foi mensurado imediatamente por pHmetro Digimed DM20 (Datamed Instrumentos Científicos e Médicos Ltda., Belo Horizonte, MG). Para análise do teor de amônia, 25 mL de fluido foi congelado após adição de 0,5 mL de ácido sulfúrico a 50%. A análise de N amoniacal foi realizada conforme Femer (1965), adaptado por Vieira (1980).

Nas amostras de fluido ruminal obtidas 12 h após a alimentação foi avaliado o número de protozoários. O fluido foi diluído 1:1 com solução de formaldeído a 50%, uma subamostra de 1 mL foi retirada e corada com duas gotas de corante verde-malaquita segundo Dehority (1984). O fluido corado foi

diluído em glicerol 30% para contagem no microscópio ótico com câmara de Newbauer (WARNER, 1962), em duplicata.

Nas amostras de fluido ruminal obtidas 12 h após a alimentação no dia 28 foi quantificado o teor de ácidos graxos de cadeia linear e ramificados, indicador de diversidade microbiana (VLAEMINCK et al., 2006b), e o perfil de ácidos graxos por cromatografia gasosa. As amostras de fluido ruminal foram imediatamente congeladas a -20 °C e posteriormente liofilizadas. Os lipídeos foram extraídos do fluido liofilizado e metilados, segundo Shingfield et al. (2003). A gordura metilada foi analisada por cromatógrafo gasoso modelo 6890N (Agilent Technologies Ltda., Barueri, SP), com coluna capilar CP-SIL 88 FAME de sílica fundida (100 m × 0.25 mm × 0.2 µm de espessura de filme. Varian Inc., Mississauga, EUA), com detector de ionização de chama sob as condições descritas por Cruz-Hernandez et al. (2007).

A digestibilidade aparente da MS no trato digestivo total foi determinada a partir da produção fecal mensurada por coleta total de fezes por 8 h, iniciada com 8 h de atraso a cada dia, por três dias consecutivos, com o intuito de representar 24 h do dia sem causar distúrbio no comportamento ingestivo dos animais. As fezes coletadas nos dias 31 a 33 foram imediatamente congeladas, formando amostras compostas por período. Os compostos fecais foram desidratados como descrito anteriormente.

Simultaneamente à coleta de fezes, realizou-se a coleta total de urina para mensurar a excreção diária de alantoína e estimar a síntese relativa de proteína microbiana no rúmen. A urina foi acondicionada em galões de 20 L contendo 210 mL de ácido sulfúrico a 20%. Ao final do período de coleta, a uma amostra de 10 mL de urina foi acrescido 40 mL de ácido sulfúrico a 4%. O teor de alantoína da urina foi mensurado, segundo Chen e Gomes (1995).

A degradabilidade *in situ* de feno de tifton foi avaliada em amostras incubadas por 0, 6, 12, 18, 24 e 72 h, para avaliar a capacidade fibrolítica do

rúmen. As incubações foram iniciadas no dia 30, simultaneamente à alimentação matinal. Amostras de 5 g de feno, trituradas em peneira com crivo de 5 mm, foram inseridas em sacos de poliéster de 15x10 cm. Os sacos foram inseridos conjuntamente no rúmen para incubação e retirados em duplicata em cada horário. Após a remoção das amostras do rúmen, estas foram imediatamente congeladas para posterior lavagem, em conjunto com todas do período, em água corrente. Os resíduos da incubação ruminal foram desidratados em estufa ventilada a 55 °C por 72 h e o teor de FDN analisado como previamente descrito. A fração A da MS e da FDN foi estimada pelo desaparecimento dos sacos no tempo 0. A fração C foi estimada pelo resíduo da incubação por 72 h. A fração B foi calculada por  $B=100-(A+C)$ . A taxa fracional de degradação da fração B (kd) foi estimada pela regressão linear ao longo dos tempos 0, 6, 12, 18 e 24 h do logaritmo natural dos resíduos incubados como proporção do original, após subtração da fração C de cada amostra. A degradabilidade ruminal da MS e da FDN foi calculada como  $A+B[kd/(kd+kp)]$ , assumindo taxas fracionais de passagem (kp) de -0,02/h, -0,04/h e -0,06/h.

As variáveis avaliadas uma vez em cada período foram analisadas pelo procedimento GLM do SAS pelo modelo:  $Y_{ijkl} = \mu + Q_i + N_{j(i)} + P_k + T_l + e_{ijkl}$ . Em que:  $\mu$  = média geral;  $Q_i$  = efeito de quadrado ( $i = 1$  a 3);  $N_{j(i)}$  = efeito de novilha aninhada em quadrado ( $j = 1$  a 9);  $P_k$  = efeito de período ( $k = 1$  a 3);  $T_l$  = efeito de tratamento ( $l = T0, T10$  e  $T30$ );  $e_{ijkl}$  = erro experimental, assumido independente e identicamente em uma distribuição normal com média zero e variância  $\sigma^2$ . Dois contrastes pré-planejados compararam os tratamentos: T0 vs. T10 e T0 vs. T30.

Os dados obtidos ao longo do tempo (NUP, amônia e pH ruminais) foram analisados como medidas repetidas pelo procedimento MIXED do SAS. Ao modelo anterior, foram acrescentados os efeitos de tempo (0, 3, 6, 12, 18 e 24 h) e a interação entre tempo e tratamento. O quadrado médio para a interação entre

novilha, período e tratamento foi utilizado como medida de erro para testar o efeito de tratamento. Foram consideradas as estruturas de covariância autorregressiva de primeira ordem, simetria composta e não estruturada. Aquela com o menor valor para o critério de informação de Akaike foi utilizada.

#### **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A levedura autolisada neste experimento teve teor de proteína bruta próximo de 47% da MS (Tabela 2). A levedura autolisada de cana, avaliada por Yamada et al. (2003), teve teor proteico de 43,5% da MS (Nx6,25), a de Sgarbieri et al. (1999), 46,5%, e a de Hisano et al. (2008) 49,2%. A variação no teor de N parece ser pequena neste alimento, o que sugere que este coproduto da indústria do álcool apresente composição relativamente constante. Yamada et al. (2003) também observaram que o processo de autólise não afetou a composição da levedura íntegra, mas aumentou a digestibilidade da proteína em ratos, provavelmente por propiciar maior ação enzimática sobre a proteína no trato digestivo, por causa do dano à parede celular durante a autólise. Supõe-se, similarmente, que leveduras autolisadas disponibilizariam fatores capazes de atuar benéficamente sobre a fermentação ruminal mais rapidamente que produtos contendo leveduras vivas ou cultura de leveduras (GANNER et al., 2012).

Na imagem da levedura autolisada obtida por microscopia ótica (Fig. 2), é possível visualizar células bem delimitadas, de formato esférico e com interior corado em azul. Al-Shahwani, Berry e Berry (1978), ao avaliarem condições de crescimento capazes de induzir ruptura celular espontânea em *S. cerevisiae*,

definiram três classes morfológicas: “Células rompidas”, onde a parede celular foi rompida e o conteúdo celular liberado para o meio. Nessas células, o conteúdo celular era fortemente corado pelo azul de metileno. “Células levemente coradas”, cujas paredes não apresentavam rompimento e as células eram coradas em azul-claro, sendo consideradas células mortas. “Células não coradas”, característico de células vivas. Células viáveis são capazes de reduzir o corante, o que torna a célula transparente, enquanto as mortas permanecem com a coloração azul. Com base nesta classificação, a levedura autolisada avaliada neste trabalho foi composta por células mortas.

As imagens de microscopia eletrônica (Fig. 3) ressaltam que a parede celular, apesar de íntegra, apresenta rugosidades. Al-Shahwani, Berry e Berry (1978) descreveram a parede celular de células mortas como de aparência granular. É possível observar células que foram inativadas, quando estavam em multiplicação por brotamento. Quando uma célula de levedura sofre brotamento, a célula-mãe é deixada com uma cicatriz de broto, enquanto o broto separado tem uma cicatriz de nascimento (AL-SHAHWANI; BERRY; BERRY, 1978). Estas cicatrizes podem ser observadas na microscopia eletrônica, como pontos de depressão na parede celular. O plaqueamento do produto também não apresentou crescimento, outro indicador de que o produto continha apenas células mortas.

A suplementação com 10 g/d de levedura autolisada aumentou o CMS entre os dias 28 e 33, sem afetar o consumo durante a indução de acidose ruminal no dia 35 (Tabela 3). Aumento no consumo é uma resposta plausível à suplementação com produtos à base de levedura (DESNOYERS et al, 2009; RABIEE et al., 2008). Entretanto, não foi detectado aumento no CMS na maior dose do produto (30 g/d). Houve tendência de aumento linear na taxa fracional de degradação da FDN com aumento na dose de levedura suplementar (Tabela 4), sugerindo melhor digestibilidade ruminal da fibra, uma resposta plausível à

suplementação com leveduras vivas (BITENCOURT et al., 2011) não determinou a resposta em CMS neste experimento. Também houve aumento numérico na digestibilidade aparente da MS em resposta à suplementação, mas a diferença não obteve suporte estatístico (Tabela 4).

A ausência de resposta em CMS à maior dose de levedura autolisada pode ter sido modulada pelo teor de NUP, já que este foi maior no T30 (Tabelas 5 e 6). A resposta aos tratamentos em teor de amônia ruminal não teve o mesmo padrão de resposta do NUP (Tabela 5). O alto valor de amônia no rúmen, próximo de 28 mg/dL, pode ter mascarado o efeito de tratamento, e também o efeito marcado do tempo de amostragem ( $P = 0,07$ ), sobre esta variável (Tabela 5). A causa para o alto teor de amônia no rúmen é incerta, já que o teor de N dietético não foi excessivo (15% de PB) e a dieta era rica em carboidratos fermentáveis no rúmen (38,9% de CNF), (Tabela 1). Supõe-se, que o alto teor de amônia ruminal pode ter decorrido pelo fato de as novilhas terem sido alimentadas com dieta de alta densidade energética, resultando em CMS relativamente alto para animais não lactantes (Tabela 3), próximo de 2,4% do peso vivo. O ganho de peso das novilhas ao longo do período experimental de 105 dias foi de 1,204 kg/d, demonstrando que o aporte nutricional foi alto. O alto teor de amônia ruminal foi coerente ao alto teor de NUP em todos os tratamentos, aproximadamente 18 mg/dL (Tabela 5).

Há relacionamento negativo entre o teor de NUP e o CMS. O ciclo hepático da ureia pode ter estimulado indiretamente o metabolismo oxidativo no fígado a partir de carbonos oxidáveis oriundos do catabolismo de aminoácidos, já que um dos dois grupos amino utilizados na conversão de amônia a ureia vem do aspartato. A oxidação hepática de aminoácidos gera 12 ATP, enquanto o ciclo da ureia consome quatro ATP, podendo, portanto, aumentar a produção líquida de ATP pelo fígado e induzir depressão do consumo (OBA; ALLEN, 2003b; ALLEN, 2000). Oba e Allen (2003a) observaram que a infusão

intrarruminal de propionato de amônio comparativamente a propionato de sódio ou potássio induziu queda no consumo. Santos et al. (2011) também observaram que a substituição parcial de farelo de soja por ureia na dieta de vacas leiteiras aumentou o NUP após a alimentação matinal e deprimiu o consumo.

O relacionamento entre a suplementação com leveduras e o metabolismo ruminal de nitrogênio não tem obtido consenso. Tem sido postulado que o estímulo ao crescimento microbiano no rúmen, induzido por levedura suplementar (CHAUCHEYRAS-DURAND; WALKER; BACH, 2008), aumentaria a incorporação de N amoniacal na proteína microbiana, reduzindo a concentração ruminal de amônia (AL HIBRAIM et al., 2010; HRISTOV et al., 2010). Entretanto, tem sido demonstrado que leveduras podem aumentar a capacidade proteolítica do rúmen (YOON; STERN, 1996), o que induziria aumento no teor de amônia ruminal. Foi marcado o efeito da dose de levedura sobre a síntese relativa de proteína microbiana no rúmen, mensurada pela excreção diária de alantoína na urina (Tabela 5). Maior síntese microbiana pode ter aumentado a capacidade proteolítica do rúmen, induzindo maior acúmulo de NUP.

A resposta em síntese microbiana no rúmen foi maior quanto maior foi a dose de levedura autolisada suplementada (Tabela 5). A maior dose avaliada (T30) foi equivalente a 2,6 g/kg de MS de dieta ou 58,9 mg/kg de peso vivo, enquanto T10 foi equivalente a 0,8 g/kg de MS de dieta ou 19,7 mg/kg de peso vivo. Aumento na síntese microbiana tem sido proposto como o principal mecanismo de ação de leveduras suplementares, explicando o possível ganho em digestão fibrosa e a redução do teor de ácido láctico no rúmen, frequentemente proposto como o mecanismo pelo qual leveduras atuariam positivamente sobre a ocorrência de acidose ruminal (MARDEM et al., 2008; WILLIANS et al., 1991; CHUNG et al., 2011). Vários mecanismos têm sido propostos para a resposta positiva em síntese microbiana à suplementação com leveduras, dentre estes

presença de vitaminas do complexo B, como a biotina (CHEN et al., 2011), minerais (ERYAVUZ; DEHORITY, 2009) e ácidos orgânicos, como malato (UNGERFELD; FORSTER, 2011), aumento na anaerobiose do fluido (NEWBOLD; WALLACE; MCINTOSH, 1996), além de serem fonte de peptídeos e aminoácidos prontamente disponíveis para os microrganismos do rúmen.

Além da ocorrência de maior síntese microbiana, a suplementação com levedura autolisada aparentemente atuou sobre a ecologia da microbiota ruminal, aumentando a proporção de bactérias digestoras de fibra. O aumento observado em ácidos C17:0 *iso* (Tabela 6) sugere que houve aumento na proporção de bactérias celulolíticas no rúmen (VLAEMINCK et al., 2006b). Este ácido graxo também tem sido proposto como marcador de eficiência de síntese microbiana no rúmen, tendo correlação positiva com a relação entre adenina e N em bactérias ruminais (VLAEMINCK et al., 2006a). Isto é coerente ao aumento observado na excreção urinária de alantoína (Tabela 5). Aumento de bactérias celulolíticas em resposta à levedura tem sido observado *in vitro* (NEWBOLD et al., 1995), sendo coerente à tendência de aumento no kd da forragem neste experimento (Tabela 4) e ao ganho em digestibilidade *in vivo* da FDN, observado em alguns experimentos (BITENCOURT et al., 2011; FERRARETTO; SHAVER; BERTICS, 2012).

Apesar da modulação do pH ruminal ser frequentemente citada como um dos mecanismos pelo qual leveduras teriam efeito benéfico sobre a fermentação ruminal (CHAUCHEYRAS-DURAND; WALKER; BACH, 2008; WILLIAMS et al. 1991; MARDEN et al., 2008), não houve efeito de tratamento sobre o pH neste experimento (Tabela 7). O protocolo de indução de acidose foi efetivo em simular um padrão de variação no pH ruminal das novilhas representativo da variação observada em vacas em lactação (PEREIRA; ARMENTANO, 2000; SALVADOR et al., 2008). Valores mínimos de pH foram obtidos 12 h após a

alimentação matinal (Fig. 4), sendo estes próximos de 5,3 (Tabela 7). Uma explicação plausível para a ausência de efeito positivo dos tratamentos sobre o pH pode decorrer da baixa concentração de lactato no fluido ruminal, mesmo quando queda acentuada no pH do rúmen foi induzida experimentalmente. Vacas leiteiras de alta produção podem não ter acúmulo acentuado de lactato (OETZEL; NORDLUND; GARETT, 1999), o que pode ter ocorrido neste experimento, já que não foram observados sintomas de acidose clínica (lática) nos animais, como atonia ruminal e timpanismo. Chaucheyras-Duran, Walker e Bach (2008) relataram que a indução de acidose por fornecimento elevado de grãos após restrição alimentar resulta em menos de 30% de casos com altas concentrações de lactato no rúmen. O efeito positivo de leveduras sobre o pH ruminal pode depender da presença de lactato no fluido do rúmen (WILLIAMS et al. 1991; MARDEN et al., 2008), relacionado com manejos alimentares indutores de acidose lática ou clínica, mas que, necessariamente, não ocorre em animais com acidose ruminal subclínica, caracterizado por longos períodos diários de baixo pH, induzido por acúmulo intrarruminal de todos os AGV (PLAIZIER et al., 2008).

A ausência de efeito dos tratamentos sobre o pH também é suportada pela ausência de efeito da suplementação com levedura sobre o teor de intermediários da bio-hidrogenação de ácidos graxos insaturados no rúmen (Tabela 8). Baixo pH ruminal sabidamente aumenta o acúmulo intrarruminal de ácidos linoleicos conjugados e C18:1 trans (BAUMAN; GRIINARI, 1999). Apesar da suplementação com levedura autolisada ter induzido queda numérica nos teores de C18:1 t10 e C18:1 t11 dentre os lipídeos ruminais, a queda observada não obteve suporte estatístico (Tabela 8). A ausência de efeito de tratamento sobre o teor de protozoários no fluido do rúmen (VIEIRA, 1986) também sugere que o pH ruminal não variou drasticamente entre tratamentos, apesar do aumento na concentração de protozoários, quando da restrição alimentar no dia 34 e

posterior aumento no aporte ruminal de MO fermentável no dia 35 (Tabela 5). O efeito benéfico da levedura autolisada sobre o crescimento microbiano e a digestão da fibra parece não ter sido mediado pela modulação do pH ruminal neste experimento.

Uma observação interessante, mesmo que não ligada à resposta aos tratamentos, foi o relacionamento entre o teor de amônia no rúmen e o teor de NUP ao longo do dia (Fig. 5). Em maior valor de pH ruminal, observado pela manhã (Fig. 4), quando a massa de carboidratos fermentados no rúmen era provavelmente baixa, e, portanto, a disponibilidade de substrato para crescimento microbiano, aumento na concentração ruminal de amônia 3 h após a alimentação foi acompanhado de pico no teor de NUP às 6 h. O mesmo foi observado para a amônia às 9 h e NUP às 12 h. Entretanto, no período noturno, após o menor valor diário de pH ruminal, o aumento na concentração ruminal de amônia (18 h) não foi acompanhado de aumento no NUP, sugerindo que o acúmulo intrarruminal de N foi decorrente de baixa absorção pelo epitélio, e não da rápida liberação do N amoniacal no fluido ruminal sem o necessário crescimento microbiano, para evitar a perda de amônia para o sangue. Membranas celulares são muito permeáveis à forma não ionizada da amônia e pouco permeáveis à amônia na forma ionizada (VISEK, 1984), a segunda prevalente em baixo pH. A suplementação com alimentos ricos em N rapidamente degradável no rúmen durante o período do dia de baixo pH ruminal pode teoricamente aumentar a eficiência de retenção do N amoniacal na proteína microbiana e evitar os efeitos indesejáveis da perda urinária de N para o ambiente (CHAUCHEIRAS-DURAND; WALKER; BACH, 2008).

## **5 CONCLUSÕES**

A suplementação de novilhas com levedura autolisada produzida com caldo de cana-de-açúcar induziu resposta positiva e dependente da dose suplementada sobre a síntese de proteína microbiana no rúmen, a digestão e o consumo e determinou a ecologia microbiana do rúmen, aparentemente favorecendo bactérias fibrolíticas.

A regulação do pH ruminal pela levedura não foi um mecanismo de ação determinante para a resposta observada.

## REFERÊNCIAS

AA, E. et al. Population structure and gene evolution in *Saccharomyces cerevisiae*. **Federation of European Microbiological Societies Yeast Research**, Amsterdam, v. 6, n. 5, p. 702-715, Aug. 2006.

ALLEN, M. S. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.83, n. 7, p.1598-1624, July 2000.

AL HIBRAIM, R. M. et al. The effect of body condition score at calving and supplementation with *Saccharomyces cerevisiae* on milk production, metabolic status, and rumen fermentation of dairy cows in early lactation. **Journal of Dairy Science**, Albany, v. 93, n. 11, p. 5318-5328, Nov. 2010.

AL-SHAHWANI, M. F.; BERRY, E. A.; BERRY, D. R. Growth conditions inducing spontaneous cell rupture in *Saccharomyces Cerevisiae* strains. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 70, n. 2, p. 257-263, Apr. 1978.

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 12. ed. Washington, D.C., 1975. v. 1,1094 p.

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 15. ed., Virgínia, Arlington, 1990. v.1, 1117 p.

BABAYAN, T.L. et al. Induced autolysis of *Saccharomyces cerevisiae*: morphological effects, rheological effects and dynamics of accumulation of extracellular hydrolysis products. **Current Microbiology**, New York, v. 5, n. 3, p. 163-168, 1981.

BACH, A.; IGLESIAS, C.; DEVANT, M. Daily rumen pH pattern of loosehoused dairy cattle as affected by feeding pattern and live yeast supplementation. **Animal Feed Science and Technology**, Shannon, v. 136, p. 146-153, 2007.

BAUMAN, D. E.; GRINARI, J. M. Biosynthesis of CLA and its incorporation into meat and milk of ruminants. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 1, p. 117-XX, 1999.

BITENCOURT, L. L. et al. Diet digestibility and performance of dairy cows supplemented with live yeast. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 68, n.3, p. 301-307, May/June 2011.

BOSSOLA, J. J.; RUSSELL, L. D. **Electron microscopy**. 2nd. ed. Boston : Jones and Bartlett, 1999. 670 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Cana-de-Açúcar. Brasília, [2009?]. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cana-de-acucar/saiba-mais>> Acesso em: 27 dez.2011.

CARRO, M. D. et al. Effect of DL-malate on mixed ruminal microorganism fermentation using the rumen simulation technique (RUSITEC). **Animal Feed Science and Technology**, Shannon, v. 79, n. 4, p. 279-288, June 1999.

CHAUCHEYRAS-DURAND, F.; WALKER, N. D.; BACH, A. Effects of active dry yeasts on the rumen microbial ecosystem: past, present and future. **Animal Feed Science and Technology**, Shannon, v. 145, n. 1/4, p. 5-26, Aug. 2008.

CHEN, B. et al. Effect of biotin on milk performance of dairy cattle: a meta-analysis. **Journal of Dairy Science**, Albany, v. 94, n. 7, p. 3537-3546, July 2011.

CHEN, X. B.; GOMES, J. **Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives: an overview of the technical details.** Bucksburn: International Feed Resources Unit: Rowett Research Institute, 1995. p. 20

CHUNG, Y. H. et al. Differing effects of 2 active dried yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) strains on ruminal acidosis and methane production in nonlactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Albany, v. 94, n. 5, p. 2431-2439, May 2011.

CRUZ-HERNANDEZ, J. K. G. et al. Evaluating the conjugated linoleic acid and trans18:1 isomers in milk fat of dairy cows fed increasing amounts of sunflower oil and a constant level of fish oil. **Journal of Dairy Science**, Albany, v.90, n. 8, p. 3786-3801, Aug. 2007.

DEHORITY, B. Evaluating of subsampling and fixation procedures used for counting rumen protozoa. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 48, n. 1, p. 182-185, July 1984.

DESNOYERS, M. et al. Meta-analysis of the influence of *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on ruminal parameters and milk production of ruminants. **Journal of Dairy Science**, Albany, v. 92, n. 4, p. 1620-1632, Apr. 2009.

ERASMUS, L. J.; BOTHA, P. M.; KISTNER, A. Effect of yeast culture supplement on production, rumen fermentation, and duodenal nitrogen flow in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Albany, v. 75, n. 11, p. 3056-3065, Nov. 1992.

ERYAVUZ, A.; DEHORITY, B. A. Effects of supplemental zinc concentration on cellulose digestion and cellulolytic and total bacterial numbers *in vitro*. **Animal Feed Science and Technology**, Shannon, v. 151, n. 3/4, p. 175-183, May 2009.

FERRARETTO, L. F.; SHAVER, R. D.; BERTICS, S. J. Effect of dietary supplementation with live-cell yeast at two dosages on lactation performance, ruminal fermentation, and total-tract nutrient digestibility in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Albany, v. 95, n. 7, p. 4017-4028, July 2012.

FERREIRA, I. M. P. L. V. O. et al. Brewer's *Saccharomyces* yeast biomass: characteristics and potential applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n. 2, p. 77-84, Feb. 2010.

GANNER, A. et al. Efficacy of an autolysed yeast product (Levabon Rumen) for ruminants versus live yeast and yeast culture in vitro. In: Joint Annual Meeting, 2012, Phoenix, Arizona. **Abstracts...** Phoenix: ADSA, 2012.

HISANO, H. et al. Composição nutricional e digestibilidade aparente da levedura íntegra, da levedura autolisada e da parede celular pela tilápia-do-nilo. **Ciência Animal Brasileira**, Goiás, v. 9, n. 1, p. 43-49, Jan./Mar. 2008.

HRISTOV, A. N. et al. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on ruminal fermentation and nutrient utilization in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Albany, v. 93, n. 2, p. 682-692, Feb. 2010.

KUNG, JR. L. et al. Effects of a live yeast culture and enzymes on in vitro ruminal fermentation and milk production of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Albany, v. 80, n. 9, p. 2045-2051, Sept. 1997.

LASCANO, G. J.; HEINRICHS, A. J.; TRICARICO, J. M. Substitution of starch by soluble fiber and *Saccharomyces cerevisiae* dose response on nutrient digestion and blood metabolites for precision-fed dairy heifers. **Journal of Dairy Science**, Albany, v. 95, n. 6, p. 3298-3309, June 2012.

LESMEISTER, K. E.; HEINRICHS, A. J.; GABLER, M. T. Effects of supplemental yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) culture on rumen development, growth characteristics, and blood parameters in neonatal dairy calves. **Journal of Dairy Science**, Albany, v. 87, n. 6, p. 1832-1839, June 2004.

LUND, A. Yeasts and moulds in the bovine rumen. **Journal of General Microbiology**, Spencers Wood, v. 81, n. 2, p. 453-462, Apr. 1974.

LYNCH, H. A.; MARTIN S. A. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* culture and *Saccharomyces cerevisiae* live cells on in vitro mixed ruminal microorganism fermentation. **Journal of Dairy Science**, Albany, v. 85, n. 10, p. 2603-2608, Oct. 2002.

MAGALHÃES, V. J. A. et al. Effect of Feeding Yeast Culture on Performance, Health, and Immunocompetence of Dairy Calves. **Journal of Dairy Science**, Albany, v. 91, n. 9, p. 1497-1509, Nov. 2008.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2. ed. Piracicaba: Potafos, 1997. 319 p.

MARDEN, J. P. et al. How does live yeast differ from sodium bicarbonate to stabilize ruminal pH in high-yielding dairy cows? **Journal of Dairy Science**, Albany, v. 91, n. 9, p. 3528-3535, Sept. 2008.

MARSOLA R. S. et al. Effect of feeding live yeast on performance of Holstein cows during summer. **Journal Animal Science**, v. 88 (S2) / **Journal of Dairy Science**, v. 93 (S1), p. 432, 2010.

NEWBOLD, C. J.; RODE, L. M. Dietary additives to control methanogenesis in the rumen. In: International Conference on Greenhouse Gases and Animal Agriculture, 2., 2005, Zurich. **Proceedings...** Greenhouse Gases and Animal Agriculture: an update. Amsterdam: Elsevier, 2006. p. 138-147.

NEWBOLD, C. J.; WALLACE, R. J.; MCINTOSH, F. M. Mode of action of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a feed additive for ruminants. **British Journal of Nutrition**, Wallingford, v. 76, n. 2, p. 249-261, Jan. 1996.

NEWBOLD, C. J. et al. Different strains of *Saccharomyces cerevisiae* differ in their effects on ruminal bacterial numbers *in vitro* and in sheep. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 73, n. 6, p. 1811-1818, June 1995.

NOCEK, J. E.; HOLT, M. G.; OPPY, J. Effects of supplementation with yeast culture and enzymatically hydrolyzed yeast on performance of early lactation dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Albany, v. 94, n. 8, p. 4046-4056, Aug. 2011.

OBA, M.; ALLEN, M. S. Effects of intraruminal infusion of sodium, potassium, and ammonium on hypophagia from propionate in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.86, n. 4, p.1398-1404, Apr. 2003a.

OBA, M.; ALLEN, M. S. Hypophagic effects of ammonium are greater when infused with propionate compared with acetate in lactating dairy cows. **The Journal of Nutrition**, v.133, n. 4, p.1100-1104, Apr. 2003b.

OETZEL, G. R.; NORDLUND, K. V.; GARETT, E. F. Effect of ruminal pH and stage of lactation on ruminal lactate concentration in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Albany, v. 82, p. 35, 1999. Supplement 1.

OLIVEIRA, A. M.; GÓMEZ, R. J. H. C. Otimização da extração de proteínas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 26, n. 4, p. 521-534, out./dez. 2005.

OLIVEIRA, B. M. L.; BITENCOURT, L. L.; SILVA, J. R. M.; DIAS JÚNIOR, G. S.; BRANCO, I. C. C.; PEREIRA, R. A. N.; PEREIRA, M. N. Suplementação de vacas leiteiras com *Saccharomyces cerevisiae* cepa KA500. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 62, n. 5, p. 1174-1182, Out. 2010.

PEREIRA, M. N.; ARMENTANO, L. E. Partial replacement of forage with nonforage fiber sources in lactating cow diets: II - digestion and rumen function. **Journal Dairy of Science**, Champaign, v.83, n. 12, p.2876-2887, Sept. 2000.

PLAIZIER, J. C. A. et al. Subacute ruminal acidosis in dairy cows: the physiological causes, incidence and consequences. **The Veterinary Journal**, v. 176, n. 1, p. 21-31, Apr. 2008.

POZO-DENGRÁ, J. et al. Screening of autolytic yeast strains for production of L-amino acids. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 1, p. 46-50, Dec. 2006.

RABIEE, A. R. et al. Effect of feeding Diamond V Yeast Culture™ on milk production and dry matter intake in lactating dairy cows: a meta-analysis. **Journal of Dairy Science**, Albany, v. 91, p. 589, 2008. E-Supplement 1.

SALVADOR, S. C. et al. Resposta de vacas leiteiras à substituição total de milho por polpa cítrica e à suplementação com microminerais orgânicos. I - consumo e digestão. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 60, n. 3, p. 682-690, Jun. 2008.

SAS Institute. **SAS® user's guide**: statistics - version 5. Cary, 1985, p. 1290.

SANTOS, J.F. et al. Response of lactating cows to the partial replacement of soybean meal by encapsulated urea. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 63, n. 2, p. 423-432, Apr. 2011.

SGARBIERI, V. C. et al. Produção piloto de derivados de levedura (*Saccharomyces* sp.) para uso como ingrediente na formulação de alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 2, n.1/2, p. 119-125, Aug. 1999.

SHINGFIELD, K. J. et al. Effect of fish oil on biohydrogenation of fatty acids and milk fatty acid content in cows. **Journal of Animal Science**, v. 77, n. 1, p. 165-179, Aug. 2003.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. 827 p.

UNGERFELD, E. M.; FORSTER, R. J. A meta-analysis of malate effects on methanogenesis in ruminal batch cultures. **Animal Feed Science and Technology**, Shannon, v. 166/167, p. 282-290, June 2011.

VEIRA, D. M. The role of ciliate protozoa in nutrition of the ruminant. **Journal of Animal Science**, v. 63, n.5, p. 1547-1560, Nov. 1986.

VIEIRA, P.F. **Efeito do formaldeído na proteção de proteínas e lipídios em rações para ruminantes**. 1980. 98p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1980.

VISEK, W. J. Ammonia: its effects on biological systems, metabolic hormones, and reproduction. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 67, n. 3, p.481-489, Mar. 1984.

VLAEMINCK, B. et al. Effect of forage:concentrate ratio on fatty acid composition of rumen bacteria isolated from ruminal and duodenal digesta. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 89, n.7, p. 2668-2678, July 2006a.

VLAEMINCK, B. et al. Factors affecting odd- and branched-chain fatty acids in milk: a review. **Animal Feed Science and Technology**, Shannon, v. 131, n.3/4, p. 389-417, Dec. 2006b.

WALLACE, R. J.; NEWBOLD, C. J. **Microbial feed additives for ruminants**. Rowett Research Institute, Bucksburn, Aberdeen, UK: 2007. Disponível em: <[http://www.old-herborn-university.de/literature/books/OHUni\\_book\\_8\\_article\\_9.pdf](http://www.old-herborn-university.de/literature/books/OHUni_book_8_article_9.pdf)>. Acesso em: 5 maio 2012.

WARNER, A. C. I. Enumeration of rumen micro-organisms. **Journal of General Microbiology**, Spencers Wood, v. 28, n. 1,p. 119-128, Apr. 1962.

WEISS, W. P.; HOGAN, J. S. Effect of selenium source on selenium status, neutrophil function, and response to intramammary endotoxin challenge of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Albany, v. 88, n. 12, p. 4366-4374, Dec. 2005.

WILLIAMS, P. E. et al. Effects of the inclusion of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae* plus growth medium) in the diet of dairy cows on milk yield and forage degradation and fermentation patterns in the rumen of steers. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 69, n. 7, p. 3016-3026, July 1991.

YAMADA, E. A. et al. Composição centesimal e valor proteico de levedura residual da fermentação etanólica e de seus derivados. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 16, n. 4, p. 423-432, out./dez. 2003.

YOON, I. K.; STERN, M. D. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* cultures on ruminal fermentation in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Albany, v. 79, n. 3, p. 411-417, Mar. 1996.

ZHAO, J.; FLEET, G.H. Degradation of DNA during the autolysis of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 3, p. 175-182, Feb. 2003.

## FIGURAS



Figura 1 Novilhas fistuladas no rúmen e confinadas em *tie stall* com camas de areia.

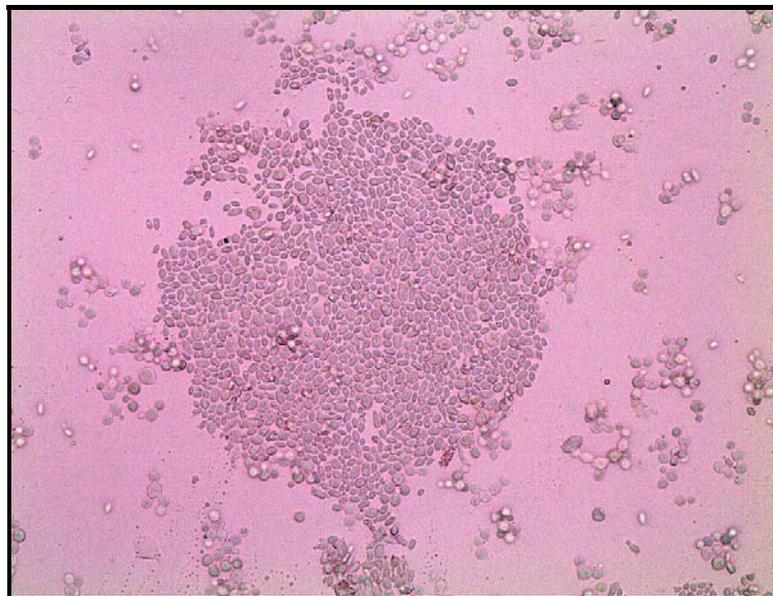


Figura 2 Microscopia óptica da levedura autolisada corada com azul de metileno (aumento 400x)

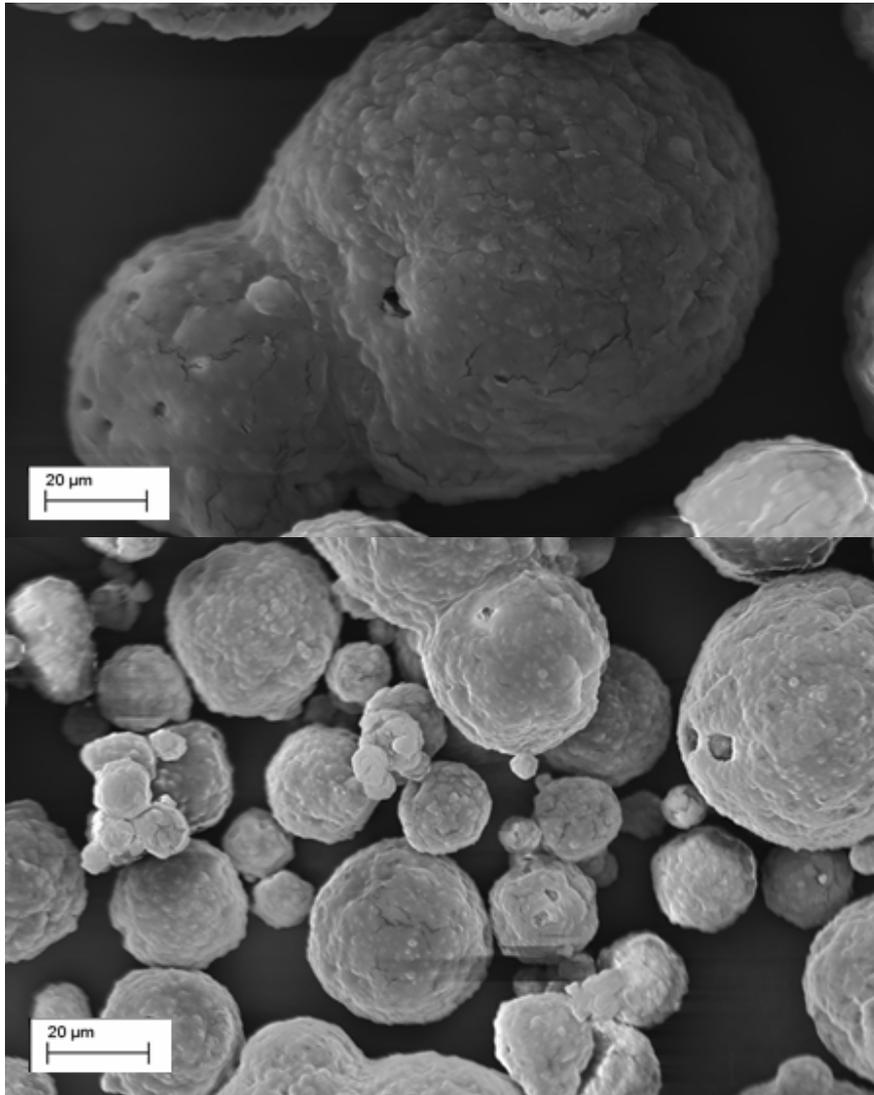


Figura 3 Microscopia eletrônica de varredura da levedura autolisada.

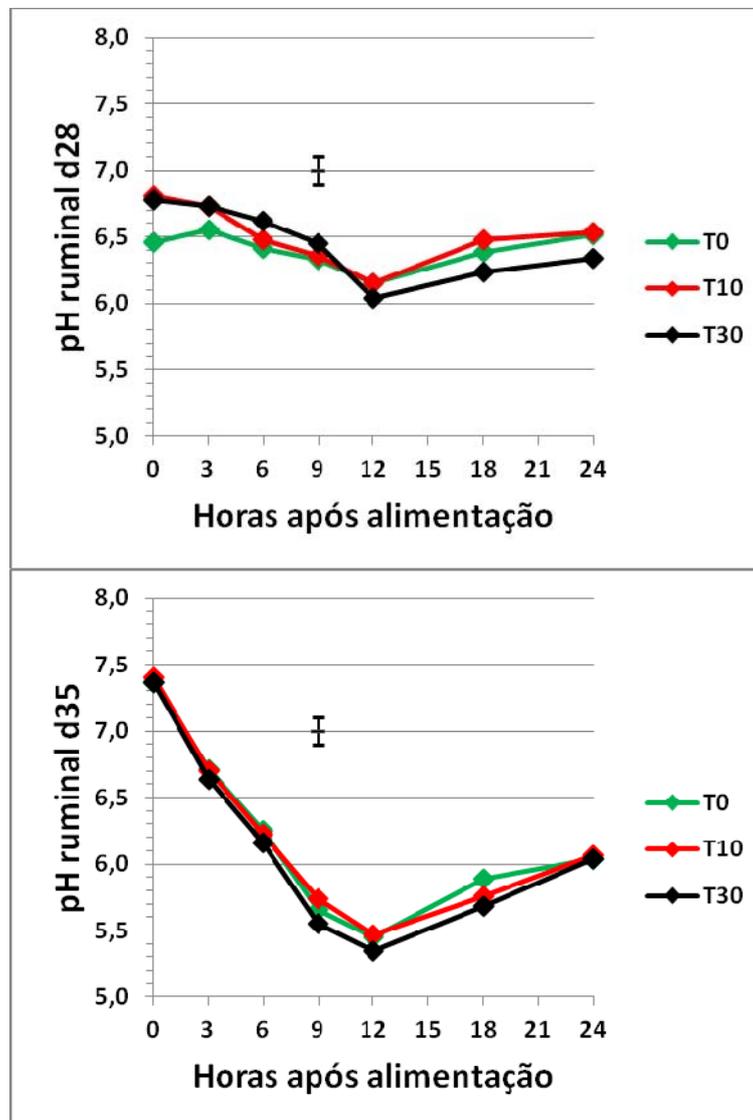


Figura 4 pH ruminal de novilhas suplementadas com doses de 0g (T0), 10g (T10) e 30 g (T30) de levedura autolisada, durante os dias 28 e 35 do período.

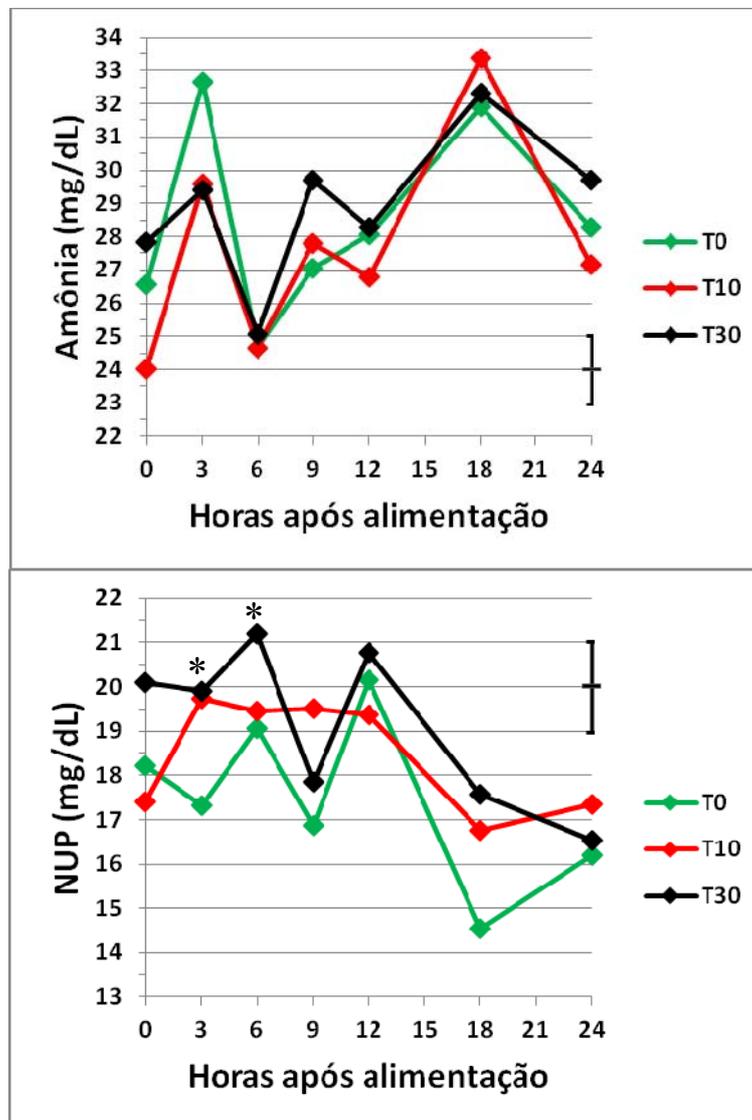


Figura 5 Nitrogênio ureico no plasma (NUP) e concentração de amônia ruminal de novilhas suplementadas com doses de 0g (T0), 10g (T10) e 30 g (T30) de levedura autolisada, ao longo do dia 28 do período (\*  $P < 0,01$  para efeito de tratamento).

## TABELAS

Tabela 1 – Composição da dieta em ingredientes e nutrientes.

	% da matéria seca
Silagem de milho	51,8
Farelo de trigo	2,4
Uréia	1,1
Farelo de soja	7,3
Milho moído fino	31
Farelo de algodão	5,0
NaCl	0,3
Calcário calcítico	1,1
Fosfato bicálcico	0,3
Minerais e vitaminas <sup>1</sup>	0,1
Proteína bruta (PB)	15,0
Fibra em detergente neutro (FDN)	33,9
FDN oriundo de silagem de milho	22,3
Carboidratos não-fibrosos (CNF) <sup>2</sup>	38,9
Extrato etéreo (EE)	4,1
Cinzas	8,0

<sup>1</sup>Minerais e vitaminas: 0,17% de mg; 300 ppm de Co; 10.000 ppm de Cu; 24.500 ppm de Mn; 37.500 ppm de Zn; 250 ppm de Se; 500 ppm de I; 5.000.000 UI/kg Vit. A; 1.000.000 UI/kg Vit. D; 24.000 UI/kg Vit E. <sup>2</sup>CNF=100 - (PB + EE + FDN + Cinzas)

Tabela 2 - Composição da levedura autolisada

	% da matéria natural
Matéria seca	89,5
	% da matéria seca
Proteína bruta	46,7
Extrato etéreo	0,8
Cinzas	8,4
Fósforo	8,3
Potássio	24,2
Cálcio	6,1
Magnésio	1,5
Enxofre	4,2
	ppm da matéria seca
Boro	11,5
Cobre	14,4
Ferro	189
Manganês	28,4
Zinco	134,4

Tabela 3 - Consumo de matéria seca nos dias 28 a 33 (CMS 28-33), no dia 34 (CMS 34) e no dia 35 (CMS 35) e peso vivo de novilhas suplementadas com doses de 0g (T0), 10g (T10) e 30 g (T30) de levedura autolisada

	T0	T10	T30	EPM <sup>1</sup>	Trat <sup>2</sup>	0-10 <sup>3</sup>	0-30 <sup>3</sup>
	kg/d						
CMS 28-33	11,7	12,5	11,7	0,24	0,07	0,04	0,88
CMS 34	4,3	4,2	4,0	0,45	0,83	0,85	0,56
CMS 35	17,0	17,2	16,4	0,55	0,57	0,83	0,43
	kg						
Peso vivo	512	508	509	2,4	0,50	0,43	0,26

<sup>1</sup>EPM=Erro padrão das médias. <sup>2</sup>Trat=Valor de probabilidade para o efeito de tratamento. <sup>3</sup>0-10 e 0-30=Valor de probabilidade para os contrastes T0 vs. T10 e T0 vs. T30

Tabela 4 – Degradabilidade *in situ* da matéria seca (MS) e da fibra em detergente neutro (FDN) do feno de tifton e digestibilidade aparente da matéria seca no trato digestivo total de novilhas suplementadas com doses de 0g (T0), 10g (T10) e 30 g (T30) de levedura autolisada

	T0	T10	T30	EPM <sup>1</sup>	Trat <sup>2</sup>	0-10 <sup>3</sup>	0-30 <sup>3</sup>
	% da MS						
Fração MS A <sup>4</sup>	8,9	8,9	8,9				
Fração MS B <sup>4</sup>	47,8	47,3	49,0	2,12	0,85	0,88	0,69
Fração MS C <sup>4</sup>	43,4	43,9	42,0	2,11	0,81	0,88	0,64
	/h						
kd da MS B <sup>5</sup>	-0,027	-0,032	-0,036	0,0031	0,19	0,29	0,07
	% da MS incubada						
DEG MS 2 <sup>6</sup>	36,4	37,9	39,6	1,84	0,49	0,57	0,24
DEG MS 4 <sup>6</sup>	28,3	30,0	31,5	1,58	0,39	0,47	0,18
DEG MS 6 <sup>6</sup>	24,0	25,5	26,9	1,36	0,34	0,43	0,15
	% da FDN						
Fração FDN B <sup>4</sup>	54,0	54,6	53,6	2,62	0,96	0,91	0,88
Fração FDN C <sup>4</sup>	46,0	45,4	46,4	2,62	0,96	0,91	0,88
	/h						
kd da FDN B <sup>5</sup>	-0,029	-0,035	-0,043	0,0050	0,17	0,45	0,06
	% da MS consumida						
Digestibilidade	67,3	68,4	69,5	1,39	0,54	0,58	0,28

<sup>1</sup>EPM=Erro padrão das médias. <sup>2</sup>Trat=Valor de probabilidade para o efeito de tratamento. <sup>3</sup>0-10 e 0-30=Valor de probabilidade para os contrastes T0 vs. T10 e T0 vs. T30. <sup>4</sup>Frações A, B e C da MS e da FDN. <sup>5</sup>kd=Taxas fracionais de degradação da fração B da MS e da FDN. <sup>6</sup>DEG MS=Degradabilidades ruminais da MS assumindo taxas fracionais de passagem (kp) de -0,02, -0,04 e -0,06/h.

Tabela 5 – Concentração ruminal de amônia no dia 28 e de protozoários nos dias 28 e 35, nitrogênio ureico no plasma no dia 28 (NUP) e excreção diária de alantoína na urina de novilhas suplementadas com doses de 0g (T0), 10g (T10) e 30 g (T30) de levedura autolisada

	T0	T10	T30	EPM <sup>1</sup>	Trat <sup>2</sup>	0-10 <sup>3</sup>	0-30 <sup>3</sup>
	mg/dL						
Amônia <sup>4</sup>	28,5	27,6	28,9	1,03	0,68	0,58	0,77
	x10 <sup>4</sup> /mL						
Protozoários d28	29,7	34,9	30,6	3,01	0,44	0,24	0,84
Protozoários d35	40,8	38,8	36,6	3,44	0,72	0,69	0,42
	mg/dL						
NUP <sup>5</sup>	17,5	18,5	19,1	0,46	0,08	0,14	0,03
	mmoles/d						
Alantoína	53,3	60,5	77,6	7,48	0,09	0,50	0,04

<sup>1</sup>EPM=Erro padrão das médias. <sup>2</sup>Trat=Valor de probabilidade para o efeito de tratamento. <sup>3</sup>0-10 e 0-30=Valor de probabilidade para os contrastes T0 vs. T10 e T0 vs. T30. <sup>4</sup>P=0,07 para efeito de tempo de amostragem, P=0,99 para a interação entre tempo e tratamento. <sup>5</sup>P<0,01 para o efeito de tempo de amostragem, P=0,42 para a interação entre tempo e tratamento.

Tabela 6 – Ácidos graxos (AG) de cadeia impar e ramificada (AGCIR) no fluido ruminal de novilhas suplementadas com doses de 0g (T0), 10g (T10) e 30 g (T30) de levedura autolisada

	T0	T10	T30	EPM <sup>1</sup>	Trat <sup>2</sup>	0-10 <sup>3</sup>	0-30 <sup>3</sup>
g/100g de AG							
C11:0	0,10	0,09	0,05	0,028	0,45	0,79	0,23
C13:0	5,63	5,51	6,96	0,581	0,27	0,88	0,16
C15:0 <i>isso</i>	0,20	0,22	0,20	0,024	0,68	0,40	0,81
C15:0 <i>anteiso</i>	0,34	0,33	0,36	0,038	0,87	0,83	0,73
C15:0	0,36	0,32	0,35	0,057	0,87	0,60	0,82
C16:0 <i>isso</i>	0,24	0,19	0,29	0,053	0,51	0,53	0,52
C17:0 <i>isso</i>	0,10	0,21	0,25	0,037	0,05	0,05	0,03
C17:0 <i>anteiso</i>	0,27	0,31	0,39	0,085	0,64	0,74	0,36
C17:0	0,27	0,36	0,36	0,048	0,35	0,21	0,27
C15:0 <i>iso</i> +C17:0 <i>iso</i>	0,30	0,44	0,45	0,048	0,08	0,06	0,06
C15:0 <i>anteiso</i> +C17:0 <i>anteiso</i>	0,61	0,64	0,75	0,116	0,71	0,86	0,44
Total de AGCIR	7,63	7,68	9,29	0,521	0,13	0,95	0,06
Relação <sup>4</sup>	0,55	0,70	0,59	0,097	0,52	0,27	0,77

<sup>1</sup>EPM=Erro padrão das médias. <sup>2</sup>Trat=Valor de probabilidade para o efeito de tratamento. <sup>3</sup>0-10 e 0-30=Valor de probabilidade para os contrastes T0 vs. T10 e T0 vs.T30. <sup>4</sup>Relação=(C15:0 *iso*+C17:0 *iso*)/(C15:0 *anteiso*+C17:0 *anteiso*)

Tabela 7 – pH ruminal nos dias 28 e 35 do período, em novilhas suplementadas com doses de 0g (T0), 10g (T10) e 30 g (T30) de levedura autolisada

	T0	T10	T30	EPM <sup>1</sup>	Trat <sup>2</sup>	0-10 <sup>3</sup>	0-30 <sup>3</sup>
Média d28 <sup>4</sup>	6,40	6,50	6,45	0,077	0,65	0,36	0,65
Média d35 <sup>5</sup>	6,19	6,19	6,11	0,065	0,57	0,98	0,37
Mínimo d28	5,92	6,13	5,98	0,112	0,41	0,20	0,69
Mínimo d35	5,40	5,45	5,28	0,065	0,23	0,62	0,23
Máximo d28	6,81	6,86	6,86	0,054	0,73	0,48	0,52
Máximo d35	7,36	7,41	7,36	0,067	0,88	0,66	0,99
Min/d							
Tempo<6,2 d28	435	406	398	133,4	0,98	0,88	0,85
Tempo<6,2 d35	880	968	999	86,8	0,62	0,49	0,35
Tempo<5,8 d28	102	59	175	70,8	0,52	0,68	0,48
Tempo<5,8 d35	609	715	707	90,7	0,67	0,43	0,46

<sup>1</sup>EPM=Erro padrão das médias. <sup>2</sup>Trat=Valor de probabilidade para o efeito de tratamento. <sup>3</sup>0-10 e 0-30=Valor de probabilidade para os contrastes T0 vs. T10 e T0 vs.T30. <sup>4</sup> $P<0,01$  para efeito de tempo de amostragem,  $P=0,35$  para a interação entre tempo e tratamento. <sup>5</sup> $P<0,01$  para o efeito de tempo de amostragem,  $P=0,97$  para a interação entre tempo e tratamento.

Tabela 8 – Ácidos graxos (AG) no fluido ruminal de novilhas suplementadas com doses de 0g (T0), 10g (T10) e 30 g (T30) de levedura autolisada

	T0	T10	T30	EPM <sup>1</sup>	Trat <sup>2</sup>	0-10 <sup>3</sup>	0-30 <sup>3</sup>
	g/100g de AG						
C4:0	0,15	0,14	0,09	0,03	0,31	0,77	0,15
C6:0	0,20	0,35	0,36	0,13	0,58	0,38	0,41
C8:0	0,11	0,12	0,17	0,02	0,33	0,84	0,16
C10:0	0,31	0,31	0,34	0,08	0,95	0,97	0,79
C12:0	0,89	0,77	0,77	0,20	0,88	0,68	0,69
C14:0	0,52	0,52	0,43	0,07	0,61	0,97	0,36
C16:0	10,41	11,14	10,58	1,14	0,88	0,64	0,92
C18:0	2,98	3,42	3,24	2,83	0,51	0,26	0,55
C18:1 t6,7,8	0,38	0,38	0,34	0,04	0,71	0,89	0,50
C18:1 t9	0,44	0,52	0,52	0,06	0,46	0,29	0,31
C18:1 t10	0,72	0,68	0,51	0,10	0,38	0,75	0,18
C18:1 t11	2,92	2,43	2,00	0,55	0,54	0,51	0,28
C18:1 t12	0,78	0,77	0,66	0,08	0,58	0,89	0,33
C18:1 t13,14/c6,8	1,21	1,05	1,01	0,13	0,55	0,40	0,33
C18:1 t16	0,60	0,41	0,33	0,09	0,15	0,15	0,07
C18:1 c9	3,92	3,59	3,21	0,41	0,51	0,55	0,26
C18:1 c11	1,09	1,01	0,88	0,11	0,48	0,62	0,23
C18:1 c12	0,63	0,58	0,43	0,10	0,39	0,70	0,18
C18:1 c13	0,27	0,23	0,21	0,06	0,75	0,59	0,48
C18:1 c14	0,11	0,17	0,20	0,05	0,48	0,42	0,25
C18:2 n6 t9c12	0,00	0,00	0,04	0,02	0,28	0,91	0,14
C18:2 n6 c9c12	2,54	2,13	2,02	0,45	0,68	0,50	0,45
C18:2 c9t11	0,38	0,30	0,46	0,09	0,51	0,52	0,54
C18:3 n3 c9,12,15	0,03	0,06	0,02	0,03	0,62	0,41	0,91
C20:0	0,52	0,42	0,37	0,14	0,74	0,58	0,48

<sup>1</sup>EPM=Erro padrão das médias. <sup>2</sup>Trat=Valor de probabilidade para o efeito de tratamento. <sup>3</sup>0-10 e 0-30=Valor de probabilidade para os contrastes T0 vs. T10 e T0 vs.T30