

UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO

**Efeito da suplementação com leveduras
Saccharomyces cerevisiae na degradação no
rúmen de silagens de milho**

Dissertação de Mestrado em Engenharia Zootécnica

João Pedro Sousa Ferraz

Orientadores: Cristina Vitória de Miranda Guedes
Maria José Marques Gomes

Composição do júri:

Vila Real, 2016

“ As doutrinas apresentadas são da exclusiva
responsabilidade do autor.”

Agradecimentos

Não posso deixar de agradecer às pessoas que fizeram parte deste meu percurso, que de alguma forma me apoiaram em alguns momentos.

Um enorme agradecimento aos meus pais por tudo o que me proporcionaram até hoje. Todos os valores que me transmitiram, toda a paciência demonstrada e toda a educação que me deram. Obrigado, do fundo do coração.

Obrigado à minha irmã Ana Sofia, que me aturou este tempo todo e que me ajudou muito nesta fase final.

À minha namorada, confidente e amiga Daniela Tavares pela paciência, força, ajuda e carinho que me deu durante esta tarefa.

Às “meninas” do laboratório, D. Inês, D. Anita e D. Carminda por toda a ajuda e apoio que sempre demonstraram.

Ao Sr. Eng. Paulo Fontes pela orientação na vacaria.

Aos funcionários do departamento de Zootecnia que sempre se demonstraram disponíveis para ajudar.

A minha amiga Raquel Rocha e ao meu amigo João Teixeira por tudo o que passamos durante o estudo.

A todos os amigos e colegas que de certa forma contribuíram para que sempre me sentisse acarinhado e alegre.

À Professora Maria José por me deixar fazer parte deste projeto e por me transmitir toda a sua sabedoria e orientação. Também pela paciência demonstrada quando eu falhava e algo não corria como o esperado.

Um agradecimento muito especial à Professora Cristina Guedes por toda a simpatia que sempre demonstrou e pela disponibilidade prestada na parte estatística e escrita. Um muito obrigado.

Ao Professor José Júlio por todo o apoio, e paciência que teve comigo.

Aos Professores Luís Ferreira e Miguel Rodrigues pela boa disposição e incentivo que sempre me transmitiram.

Uma vez mais, Muito Obrigado a todos.

Resumo

Foram analisadas 10 amostras de silagens de milho de diferentes países com o objetivo de avaliar o efeito de um produto comercial contendo uma preparação da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (SC) na degradação *in sacco* da matéria seca (MS) e da fração fibra de detergente neutro (NDF).

O estudo envolveu quatro vacas Holstein não lactantes, fistuladas no rúmen e com peso médio inicial de $665,2 \pm 56,2$ kg. Durante 21 dias foi fornecida uma dieta à base de silagem de milho com a seguinte composição: 13 kg silagem de milho, 3 kg feno de prado natural e 3,4 kg de concentrado (43:27:30 na matéria seca), para os animais se adaptarem à dieta. No fim deste período, estabeleceu-se a ingestão voluntária máxima de MS por animal para se evitarem refugos. Durante o período experimental foi fornecida a dieta do período de adaptação (Lev-) seguida da mesma dieta com adição de 0,5 g/dia de uma cultura de SC (Lev+). As amostras de silagem de milho foram incubadas no rúmen *in sacco* durante 12, 24 e 36 h.

Houve um efeito significativo ($P < 0,01$) da incorporação diária de SC na dieta na degradação da MS das silagens de milho após 12 h de incubação no rúmen, aumentando em média 9,1 unidades. Para as 36 h de incubação registou-se uma tendência ($P = 0,052$) para o efeito positivo da suplementação com SC na degradação da MS das silagens de milho. Após 24 h de incubação, não houve efeito da dieta na degradação da MS ($P > 0,05$).

Tendo em conta a fração NDF, não houve efeito significativo ($P > 0,05$) da dieta na degradação das silagens de milho, após 12, 24 e 36 h de incubação no rúmen. No entanto houve uma tendência para um efeito positivo da incorporação de levedura SC na dieta após 24 h ($P = 0,11$) e 36 h ($P = 0,12$) de incubação.

Os resultados permitem-nos concluir que a suplementação com SC não teve efeito significativo na degradação da MS e na degradação da fração NDF das silagens de milho. Salienta-se no entanto, que as amostras de silagem de milho estudadas apresentam uma degradação da fração NDF elevada (entre 35,4 e 46%).

Palavras-chave: Silagens de milho; *Saccharomyces cerevisiae*; Degradação; NDF.

Abstract

Ten samples of corn silage from different countries were analyzed in order to evaluate the effect of a commercial product containing a preparation of *Saccharomyces cerevisiae* (SC) in rumen degradation of the NDF fraction (*in sacco*) on dry matter (DM)

The study involved four fistulated non-lactating Holstein cows with an average weight of 665.2 ± 56.2 kg. During a 21 day period, a diet based on 13 kg corn silage, 3 kg of meadow hay and 3.4 kg of concentrate feed (43:27:30 in dry matter) was used for animals to adapt to define the maximum voluntary DM intake per animal to avoid waste. During the experimental period, the diet established in the experimental adaptation was used (Lev-) followed by the same diet but supplemented with 0.5 g / day of a culture of SC (Lev +). Maize samples were incubates in the rumen *in sacco* during 12, 24 and 36 h.

There was a significant effect ($P < 0.01$) of the daily diet incorporation with SC in the degradation of the MS corn silages after 12 h of incubation in the rumen, increasing on average 9.1 units. For 36 hours incubation there was a trend ($P = 0.052$) for the positive effect of supplementation with SC in DM degradation of corn silage. At 24 hours of incubation, there was no effect of diet on the degradation of MS ($P > 0.05$).

Given the NDF fraction, there was no significant effect ($P > 0.05$) levels on degradation of corn silage, after 12, 24 and 36 h of incubation in the rumen. However there was a trend towards a positive effect of SC yeast incorporation into the diet after 24 h ($p = 0.11$) and 36 h ($p = 0.12$) incubation.

The results allow us to conclude that supplementation with SC had no significant effect on the degradation of the NDF fraction of corn silages with degradation high values of NDF degradation (between 35,4 and 46%).

Keywords: Corn Silage; *Saccharomyces cerevisiae*; Degradation; NDF.

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO.....	3
1.1. Importância das Forragens na Alimentação de Ruminantes.....	3
1.2. Silagens de Milho	4
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
2.1. Culturas de Leveduras	7
2.2. Efeito da SC na Atividade Ruminal	8
2.3. Efeito da SC na Digestibilidade da Fibra	10
2.4. Modo de Ação das Leveduras	15
III. TRABALHO EXPERIMENTAL	21
3.1. Objetivos	21
3.2. Material e Métodos.....	21
3.2.1. Delineamento Experimental.....	21
3.2.2. Animais, Dietas e Maneio	21
3.2.3. Silagens de Milho.....	23
3.2.4. Determinação da Degradação <i>In sacco</i>	24
3.2.5. Análises Laboratoriais.....	25
3.2.6. Análise Estatística	25
3.3. Resultados	26
3.3.1. Composição Química das Silagens de Milho.....	26
3.3.2. Degradação no Rúmen da MS e da Fração NDF	27
3.3.3. Efeito da Levedura na Degradação no Rúmen.....	29
3.4. Discussão	32
3.4.1. Composição Química	32
3.4.2. Degradação das Silagens de Milho no Rúmen.....	35
3.4.3. Efeito da Suplementação com Levedura na Degradação no Rúmen.....	37
3.5. Conclusões	40
IV. BIBLIOGRAFIA	43

Índice de Quadros

Quadro I. Efeito das leveduras (Yea-Sacc 1026, Alltech) nos parâmetros de fermentação ruminal.....	8
Quadro II. Efeito das leveduras (Yea-Sacc 1026, Alltech) na contagem de bactérias ruminais.	10
Quadro III. Efeito da suplementação com levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> na digestibilidade no trato digestivo total da MO, fração NDF e fração ADF da dieta.	12
Quadro IV. Efeito das leveduras (Yea-Sacc 1026, Alltech) na degradação da fração NDF.	13
Quadro V. Teor em MS e composição química† dos alimentos das dietas utilizadas.	22
Quadro VI. Composição em ingredientes do alimento composto.	23
Quadro VII. Origem das 10 amostras de SM estudadas.	24
Quadro VIII. Teor em MS e composição química das 10 amostras de silagem de milho estudadas (% da MS).	27
Quadro IX. Degradação (%) da MS e da fração NDF após 12, 24 e 36 h de incubação <i>in sacco</i> das 10 amostras de silagem de milho estudadas.....	28
Quadro X. Efeito da dieta e da silagem de milho na degradação da MS <i>in sacco</i> após 12, 24 e 36 h de incubação (%).	30
Quadro XI. Efeito da dieta e da silagem de milho na degradação da fração NDF <i>in sacco</i> após 12, 24 e 36 h de incubação.	31
Quadro XII. Composição química de silagens de milho (NRC, 2001).	33
Quadro XIII. Composição química de silagens de milho (FEDIPEDIA, 2007).	33
Quadro XI. Composição química de silagens de milho (FEDNA, 2016).....	33

Índice de figuras

Figura I. Efeito da suplementação com SC (1g/dia) na degradação da fibra (NDF) de silagens de milho, após 36h de incubação no rúmen. SC – <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ; HFD – Grupo de silagens de elevada degradabilidade da fração NDF; LFD – Grupo de silagens de baixa	15
Figura II. Esquema ao modo de ação das culturas de leveduras. Fonte: Adaptado de Wallace (1994).	17
Figura III. Relação entre o teor em amido e a MS (Gráfico 1), o teor em NDF e a MS (Gráfico 2) e entre o teor em amido e o teor em NDF (Gráfico 3).....	34
Figura IV. Degradação da MS e da fração NDF das silagens de milho, determinada após 12, 24 e 36	35
Figura V. Regressão entre o teor em NDF (variável X) e a degradação da MS após 36 h de incubação <i>in sacco</i>	36
Figura VI. Efeito da suplementação com levedura na degradação da fração NDF das SM após 12 h (Gráfico 1), 24 h (Gráfico 2) e 26 h (Gráfico 3) de incubação <i>in sacco</i>	38

Abreviaturas

ADF – Fibra de Detergente Ácido

ADL – Lenhina de Detergente Ácido

AGV – Ácidos Gordos Voláteis

CV – Coeficiente de Variação

DP – Desvio Padrão

FPN – Feno de Prado Natural

Lev- – Dieta sem Levedura

Lev+ – Dieta com Levedura

MO – Matéria Orgânica

MS – Matéria Seca

N-NH₃ – Azoto Amoniacal

NDF – Fibra de Detergente Neutro

SC – *Saccharomyces cerevisiae*

SM – Silagem de Milho

UFC – Unidades Formadoras de Colónias

INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

Na última década o número de bovinos leiteiros tem vindo a diminuir, havendo atualmente menos 22% de animais. Apesar da redução quantitativa, a produção de leite tem-se mantido mais ou menos constante ao longo do tempo. Este aumento na produtividade deve-se sobretudo aos investimentos feitos em tecnologia e melhoramento genético do efetivo, acarretando custos que são suportados pelos produtores. A quantidade e qualidade do leite que é produzido, o custo da alimentação e o desempenho reprodutivo dos animais são os aspetos mais importantes e que vão influenciar, positiva ou negativamente, a rentabilidade de uma exploração, sendo a alimentação, a fração que traz mais encargos financeiros (Rodrigues *et al.*, 2012).

Na atualidade um dos principais objetivos dos investigadores assenta na procura de estratégias para diminuir o custo de produção, por exemplo, através da diminuição de doenças metabólicas consequentes do alto nível produtivo dos animais. Com a proibição da utilização de antibióticos como promotores da produção, são cada vez mais alvo de estudos as alternativas tidas como mais naturais, como a suplementação com probióticos, entre os quais as leveduras, e com prebióticos, entre outros (Reis *et al.*, 2006).

1.1. Importância das Forragens na Alimentação de Ruminantes

As forragens são o alimento base da dieta dos animais ruminantes, quer na sua forma verde, quer conservada. As forragens (gramíneas e leguminosas), quando conservadas sob a forma de silagem (fermentação anaeróbica) ou feno (desidratação), garantem disponibilidade alimentar ao longo do ano (Schroeder, 2004). Em sistemas de produção intensiva, nomeadamente de produção de leite, é necessário incorporar na dieta outras fontes alimentares, seja alimentos concentrados simples fontes de energia e/ou proteína (e.g. grãos de cereais, subprodutos de cereais, bagaços de oleaginosas), seja alimentos concentrados compostos. São uma importante fonte de fibra, usada pelos ruminantes para manter uma fermentação ruminal ideal e, posteriormente, converterem a matéria vegetal em leite e carne. A alimentação é, de longe, o maior encargo de uma exploração animal.

1.2. Silagens de Milho

Em Portugal, o milho é a mais importante das culturas arvenses e de regadio, quer para produção de silagem, quer para a produção de grão, estando mais de 80 mil explorações pecuárias, ocupando cerca de 170 mil hectares, envolvidas no seu cultivo. O sector leiteiro é o maior consumidor de silagem de milho (SM) em Portugal, cerca de 50 mil hectares, sendo também imputado a este setor uma boa parte do milho grão consumido em Portugal, já que é um importante constituinte dos alimentos compostos (Anpromis, 2015).

De entre os métodos de conservação de alimentos para animais, a ensilagem é dos mais utilizados em todo o mundo pois não depende estritamente das condições climáticas, permite a colheita da cultura quando as plantas estão no estágio vegetativo mais adequado e, em geral tem boa palatabilidade. Quando comparada com a fenação, a ensilagem aumenta o potencial de rendimento dos nutrientes disponíveis por área de cultivo, diminui os custos de produção pois reduz a mão-de-obra devido à mecanização da colheita e as perdas na colheita (Jones *et al.*, 2004). É um processo bastante eficiente visto que as perdas de valor nutritivo da planta podem ser reduzidas, desde que a técnica de ensilagem seja bem executada. A ensilagem consiste na ação fermentativa de bactérias anaeróbias que, em resultado da fermentação em meio anaeróbico dos açúcares, produzem ácido láctico, baixando o pH e inibindo o desenvolvimento de microrganismos que degradam a matéria orgânica (MO), preservando-a durante vários meses. Contudo, para que as perdas durante o armazenamento não sejam elevadas, têm que ser tomados em consideração vários aspetos: a quantidade de matéria seca (MS) da forragem quando colhida (30 a 40%), o comprimento de partícula e o acondicionamento da mesma têm que ser bem definidos (Kirchof, n.d.). Depois do armazenamento e quando se retiram partes da silagem para fornecer aos animais, é estritamente necessário que se feche bem o silo para que o conteúdo contacte o menos possível com o ar, a fim de evitar perdas por degradação (Roth e Heinrichs, 2001; Jones *et al.*, 2004; Lee, 2013).

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Culturas de Leveduras

Embora não existam, na bibliografia, trabalhos que corroborem o desenvolvimento de resistências bacterianas ao uso de compostos ionóforos (Reis *et al.*, 2006), a preocupação com a saúde humana devido ao uso de antibióticos na alimentação animal levou à sua proibição na União Europeia desde 2006 (Regulamento (CE) Nº 1831/2003 do Parlamento Europeu e do Conselho de 22 de Setembro de 2003 relativo aos aditivos destinados à alimentação animal). Esta medida, gerou um maior interesse na utilização de produtos naturais para a manipulação da fermentação do rúmen, tais como os probióticos, os prebióticos, os ácidos orgânicos e os extratos de plantas, aos quais têm sido apontados muitos dos benefícios dos antibióticos (Jouany e Morgavi, 2007).

Os probióticos são definidos como suplementos microbianos vivos que afetam benéficamente o animal, promovendo um equilíbrio dos microrganismos do trato gastrointestinal (Fuller, 1989). Como probióticos, as culturas de leveduras são aditivos que têm despertado muito interesse e têm sido alvo de elevado número de trabalhos publicados (Jouany e Morgavi, 2007; Vohra *et al.*, 2016). As leveduras são microrganismos unicelulares eucarióticos, amplamente distribuídas pelo meio ambiente, sendo conhecidas cerca de mil espécies suspeitando-se que representem apenas uma fração da biodiversidade existente (Batt e Tortorello, 2014). Como microrganismos aeróbios, as leveduras não têm a capacidade de sobreviver muito tempo no rúmen, sendo assim, devem ser administrados continuamente na dieta para manter a concentração mínima efetiva, estabelecida como 10^5 unidades formadoras de colónia (UFC) por grama de conteúdo ruminal (Jouany e Morgavi, 2007). A *Saccharomyces cerevisiae* (SC) é a levedura que tem sido alvo de maior interesse e é a mais estudada. Esta levedura está amplamente dispersa na natureza, nomeadamente em plantas, frutas e no solo. É também usada no fabrico de comida e bebida dado o seu efeito no processo de fermentação (Gaggia *et al.*, 2010; Batt e Tortorello, 2014).

De seguida faremos uma abordagem sobre o efeito da utilização de SC na alimentação de vacas leiteiras, mais concretamente sobre os seus efeitos sobre a atividade ruminal.

2.2. Efeito da Sc na Atividade Ruminal

Têm sido registados inúmeros efeitos das leveduras nos parâmetros de fermentação ruminal. O **Quadro I** apresenta os resultados de vários trabalhos publicados sobre o efeito da levedura SC nos parâmetros de fermentação ruminal (Robinson, 2010). Podemos observar que, o efeito da SC no pH ruminal foi pouco expressivo, pois a média do aumento no pH observado nas 21 experiências analisadas por este autor foi de +1,6%, sendo que em 86% dos casos se observou uma subida do pH ruminal. Verificou-se também que, enquanto as concentrações de azoto amoniacal (N-NH_3) aumentaram em média em 6,6% em 18 experiências, só em 40% destas é que se verificou um aumento significativo. A concentração total de ácidos gordos voláteis (AGV) aumentou 5,4% em média e a concentração de lactato decresceu 8,1%, em 65% e 67% dos trabalhos, respetivamente.

Quadro I. Efeito das leveduras (Yea-Sacc 1026, Alltech) nos parâmetros de fermentação ruminal.

	Número		Dieta ¹		Efeito	
	Artigos	Ensaaios	C	YC	Geral	% de ensaios
Parâmetros de fermentação (mM/L)						
<i>pH</i>	13	21	6,36	6,46	+1,6	86
<i>Amónia N</i>	11	18	18,2	18,8	+6,6	40
<i>AGV's</i>	12	20	84,8	89,4	+5,4	65
<i>Lactato</i>	6	9	8,6	7,9	-8,1	67

¹C - dieta controlo; YC - dieta com Yea-Sacc 1026.

Fonte: Adaptado de Robinson (2010).

Estes resultados apresentados por Robinson (2010) confirmam o observado anteriormente por Wallace (1996): a suplementação de dietas não acidogénicas com culturas de leveduras provoca pequenas mudanças nas proporções dos AGV, variando de estudo para estudo. Geralmente a proporção de acetato:propionato diminuiu mas em alguns estudos aumentou (Wallace e Newbold, 1992). Wallace (1996) referiu que as concentrações de lactato tendem a ser menores com a suplementação com culturas de leveduras, mas esses efeitos são demasiado pequenos para terem um efeito significativo no pH. Existe a ideia de que as culturas de leveduras contribuem para que o pH seja mais estável, evitando a inibição das bactérias celulolíticas que ocorre quando o pH se aproxima de 6.

A suplementação com SC promove o aumento do número de bactérias do rúmen, a taxa de fermentação ruminal e a síntese de proteína microbiana. Teoricamente isto pode levar a um aumento do sincronismo da atividade fermentativa, o que estimula a utilização do N-NH₃ pelas bactérias do rúmen (Wallace e Newbold, 1995) embora na prática os resultados sejam inconsistentes. A redução da concentração N-NH₃ no rúmen e da população bacteriana ruminal tem sido observado em alguns estudos (Chaucheyras-Durand *et al.*, 2005) mas não em outros (Erasmus *et al.*, 1992; Putnam *et al.*, 1997). Wallace e Newbold (1995) verificaram que a suplementação com leveduras teve um efeito muito reduzido e não significativo na concentração de AGV e de N-NH₃ no rúmen e, quando o efeito foi significativo, não teve significado biológico. Em ensaios *in vitro*, a suplementação com leveduras reduziu a concentração de metano em alguns trabalhos (Lynch e Martin, 2002) mas não teve efeito noutros estudos (Mathieu *et al.*, 1996; McGinn *et al.*, 2004). Estas discrepâncias podem refletir diferenças entre estirpes de leveduras SC, o estágio de lactação em estudos com vacas leiteiras ou a duração inadequada (<48h) dos ensaios *in vitro* que impedem as leveduras de exercer efeito nas bactérias do rúmen (Wallace e Newbold, 1995; Newbold e Rode, 2006; Chaucheyras-Durand *et al.*, 2008). A SC parece ter a capacidade de estimular a população de protozoários ciliados do rúmen, que digerem rapidamente o amido, competindo com as bactérias amilolíticas produtoras de lactato, prevenindo quedas acentuadas no pH ruminal (Brossard *et al.*, 2006). Dolezal *et al.*, (2011) observaram um aumento significativo do pH e uma redução da produção de AGV como resultado da suplementação com SC, tendo aumentado a proporção de acetato em relação ao propionato e ao butirato. Verificaram ainda que, o número de protozoários aumentou significativamente como resultado da inclusão de SC na dieta.

No **Quadro II**, apresentado por Robinson (2010), verifica-se que nas 6 experiências em que se procedeu à contagem do total de bactérias, ocorreu uma subida de 42% do número de bactérias viáveis no rúmen, em 86% das 7 experiências que contabilizaram o número de bactérias celulolíticas estas aumentaram 20% e, em média registou-se um aumento de 95% das bactérias não celulolíticas em todos os artigos revistos por este autor.

Quadro II. Efeito das leveduras (Yea-Sacc 1026, Alltech) na contagem de bactérias ruminais.

	Número		Dieta ¹		Efeito	
	Artigos	Ensaio	C	YC	Geral	% de ensaios
Contagem de bactérias no rúmen (x10 ⁹)						
<i>Total</i>	4	6	2,89	4,12	+42,4	100
<i>Celulolíticas</i>	5	7	2,02	2,42	+20,0	86
<i>Não Celulolíticas</i>	4	6	0,87	1,70	+95,0	100

¹C - dieta controle; YC - dieta com Yea-Sacc 1026.

Fonte: Adaptado de Robinson (2010).

2.3. Efeito da Sc na Digestibilidade da Fibra

Muitos autores têm observado que a adição da levedura SC a dietas de ruminantes tem efeitos benéficos na digestão ruminal (Wallace e Newbold, 1995; Robinson, 2010; Denev *et al.*, 2007; Chaucheyras-Durand *et al.*, 2008), embora os resultados obtidos sobre estes efeitos não sejam totalmente claros nem evidentes em todos os trabalhos publicados. As discrepâncias observadas entre os resultados dos vários trabalhos publicados podem estar relacionadas com outros fatores, como a composição das dietas, o rácio de forragem:concentrado, o tipo de forragem fornecida aos animais e o estado fisiológico dos animais (Yalç *et al.*, 2011).

Gomes (1994) refere que Weidmeier *et al.* (1987) e Gomez-Alarcon *et al.* (1988, 1990) em ensaios com vacas no período seco e em lactação observaram um aumento na digestibilidade, enquanto Arambel e Kent (1988), Arambel *et al.* (1990) e Oellerman *et al.* (1990) em ensaios com novilhas em crescimento e Harrison *et al.* (1988) em ensaios com vacas, não observaram alterações na digestibilidade. A mesma autora afirma que um aumento na digestão da fibra no rúmen pode ocorrer sem que significativas alterações na digestibilidade se verifiquem. Isto pode significar que embora a digestibilidade da fibra no rúmen seja estimulada, a quantidade de fibra que chega ao intestino grosso, onde eventualmente poderia ser degradada, é menor. Deste modo a digestibilidade total da fibra permaneceria inalterada, ocorrendo apenas uma alteração no local de digestão da fibra.

No **Quadro III** estão os resultados de 14 experiências (8 *in sacco* e 6 *in vivo*) revistas por Robinson (2010) (Estudo I) e outros 8 estudos levados a cabo por outros autores (Estudo

Ao Estudo H) que avaliaram o efeito da suplementação com SC na degradação do alimento. Observam-se efeitos positivos na digestibilidade das frações NDF (fibra de detergente neutro), ADF (fibra de detergente ácido) e na MO em todos os estudos, exceto no estudo G. Os resultados são referentes a estudos realizados com base em digestibilidade das dietas.

De todas as componentes da fração orgânica dos alimentos, aquela sobre a qual se têm debruçado a maior parte dos trabalhos científicos é a fibra e, em particular, sobre o efeito das culturas de leveduras na sua degradação ruminal. Têm sido levados a cabo vários trabalhos com o objetivo de determinar qual o efeito das culturas de leveduras na degradação ruminal da fracção fibrosa dos alimentos, e os resultados são, muitas vezes, inconsistentes. De acordo com Gomes (1994), os trabalhos realizados por Fondevila *et al.*, (1990) e Chademana e Offer (1990), demonstraram que a suplementação com culturas de leveduras foi responsável por um aumento da taxa de degradação da fibra determinada pela técnica dos sacos de nylon (*in sacco*), embora a extensão de degradação da fibra não tenha sido alterada.

Vários artigos publicados sustentam a ideia de que a adição de leveduras na dieta dos ruminantes promove a degradação da fibra no rúmen (Guedes *et al.*, 2008; Lopuszanska-Rusev e Bilik, 2011; Ding *et al.*, 2014).

Quadro III. Efeito da suplementação com levedura *Saccharomyces cerevisiae* na digestibilidade no trato digestivo total da MO, fração NDF e fração ADF da dieta.

Estudos	A		B		C		D		E		F		G		H		I	
	Lev-	10 g S.C. Biomate Yeast Plus	Lev-	5 g S.C. Biosaf Sc47	Lev-	9,8x10 ¹⁰ ufc S.C. Vitasol	Lev-	1 g S.C. Yea-Sacc ¹⁰²⁶ Alltech	Lev-	1 g S.C. CNCM I-1077 Lallemant	Lev-	5 g S.C. Yea-Sacc1026 Alltech	Lev-	10 g S.C. KA500 Levumilk	Lev-	1 g/ Kg MS Ingerida S.C. Biosaf Sc47	Lev-	S.C. Yea-Sacc1026 Alltech
Digestibilidade (%)																		
Matéria Orgânica	-	-	62,2	66,6	57,6*	63,7*	74,51*	75,87*	72,4	74,1	60,31*	64,48*	71,3	71	58,3	58,9	-	-
NDF	57,6	61	29,6*	41,6*	40,8*	50,3*	51,9*	54,77*	43,2*	48,1*	58,63*	61,79*	41,5	39,5	43,9	44,8	46,5*	49,6*
ADF	54,4*	60,2*	18,1*	32,3*	32,8*	41,3*	47,05	48,81	-	-	53,08*	55,45*	-	-	33	35	-	-

Lev- - dieta controlo; * - Valores Significativos; **A** - Realizado por Wohlt *et al.*, (1998); **B** - Realizado por Marden *et al.*, (2008); **C** - Realizado por Campanile *et al.*, (2008); **D** - Realizado por Lascano *et al.*, (2009); **E** - Realizado por Bitencourt *et al.*, (2011); **F** - Realizado por Ghazanfar *et al.*, (2015); **G** - Realizado por Oliveira *et al.*, (2008); **H** - Realizado por Moallem *et al.*, (2009); **I** – Resumo de 14 experiências revistas por Robinson (2010).

No **Quadro IV** podemos observar resultados de trabalhos referentes ao efeito das leveduras SC (*Yea-Sacc 1026*, *Alltech*) na degradação ruminal da fração NDF (Robinson, 2010). Neste quadro podemos observar que o efeito geral destas leveduras na degradação da fração NDF é positivo, sendo variável com a técnica utilizada para a determinação da degradação. Assim, nos trabalhos realizados com a técnica *in sacco* e o método *in vitro* a digestão da fibra aumentou, em 6,6 e 3,9% respetivamente, sendo estes aumentos observados em 75 e 83% dos ensaios respetivamente.

Quadro IV. Efeito das leveduras (*Yea-Sacc 1026*, *Alltech*) na degradação da fracção NDF.

	Número		Dieta ¹		Efeito	
	Artigos	Ensaio	C	YC	Geral	% de ensaios
Digestão da fracção NDF						
(%)						
<i>In vitro</i> (24h)	2	5	43,2	42,7	-1,1	60
<i>In sacco</i> (24h)	4	8	46,5	49,6	+6,6	75
<i>In vivo</i>	6	6	54,8	56,9	+3,9	83

¹C - dieta controlo; YC - dieta com *Yea-Sacc 1026*.

Fonte: Adaptado de **Robinson** (2010).

Os resultados apresentados neste quadro referem-se a valores obtidos com tempos de incubações de 24 h. Para tempos de incubação mais elevados os resultados são diferentes conforme mostram os resultados de Chedamana e Offer (1990). Estes autores quando suplementaram com culturas de leveduras usando três dietas, com diferentes proporções de forragem:concentrado, não encontraram diferenças na digestibilidade da MO, do NDF e da energia das dietas nem na degradabilidade do feno após 48 h de incubação. Contudo, a degradação da MO do feno após 24 h de incubação aumentou 11,6, 15,6 e 12,1% nas dietas com baixa, média e alta proporção de forragem respetivamente. No entanto, tratando-se de animais de alta produção (elevado nível de ingestão) é de esperar tempos de permanência no rúmen bastante inferiores a 48 h.

O aumento da ingestão de alimento decorrente da utilização de leveduras na dieta dos animais está relacionada com o aumento da taxa de degradação da fibra (Wallace, 1994), sugerindo maior atividade da população microbiana evidenciada pelo aumento do número

de bactérias celulolíticas e de bactérias que utilizam o ácido láctico (Martin e Nisbet, 1992; Ding *et al.*, 2014), estabilizando a fermentação ruminal. Um aumento do número total de bactérias no rúmen (Newbold, 1996; Wallace e Newbold, 1995), mais concretamente as bactérias fibrolíticas, parece ser um dos principais mecanismos pelos quais a suplementação com leveduras aumenta a digestão da fibra (Frédérique Chaucheyras-Durand e Fonty, 2001; Mosoni *et al.*, 2007). Um dos principais fatores que provocam um efeito benéfico das culturas de leveduras nas bactérias fibrolíticas, é a capacidade de remoção do oxigénio remanescente no rúmen pelas leveduras (Newbold *et al.*, 1996; Chaucheyras-Durand *et al.*, 2012).

O pH ruminal tem um papel importante na regulação da flora microbiana do rúmen e na atividade dos microrganismos responsáveis pela degradação da fibra (Chaucheyras-Durand *et al.*, 2008b). Estabilizar o pH do rúmen, otimiza o ambiente ruminal e estimula os microrganismos fibrolíticos, resultando numa melhor digestibilidade da fibra da dieta (Williams *et al.*, 1991).

Muito recentemente, Chaucheyras-Durand *et al.*, (2015) estudaram o efeito da SC (CNCM I-1077) na degradação da fração fibrosa de diferentes substratos. Neste estudo os animais foram alimentados com uma dieta à base de forragem, em que o pH do rúmen não era baixo, portanto, o risco de acidose foi excluído. A suplementação com SC promoveu a colonização dos substratos fibrosos pelas bactérias celulolíticas e fungos presentes no rúmen, mas o grau de estimulação dependeu da natureza dos substratos e dos microrganismos estudados. Foi observado que os alimentos com níveis de fibra mais elevados e menos hidratos de carbonos de fácil degradação foram mais degradados na presença da levedura. Utilizando a mesma estirpe de leveduras, Guedes *et al.*, (2008) observaram um aumento da degradação da fração NDF de 40 amostras de silagens de milho incubadas *in sacco* em vacas fistuladas, com diferenças no grau de aumento da degradação consoante a degradabilidade da fibra de cada amostra no rúmen. Assim, a levedura teve um efeito positivo mais acentuado na degradação da fração NDF em amostras com menor grau de degradabilidade desta fração do que as amostras de maior degradabilidade (**Figura I**).

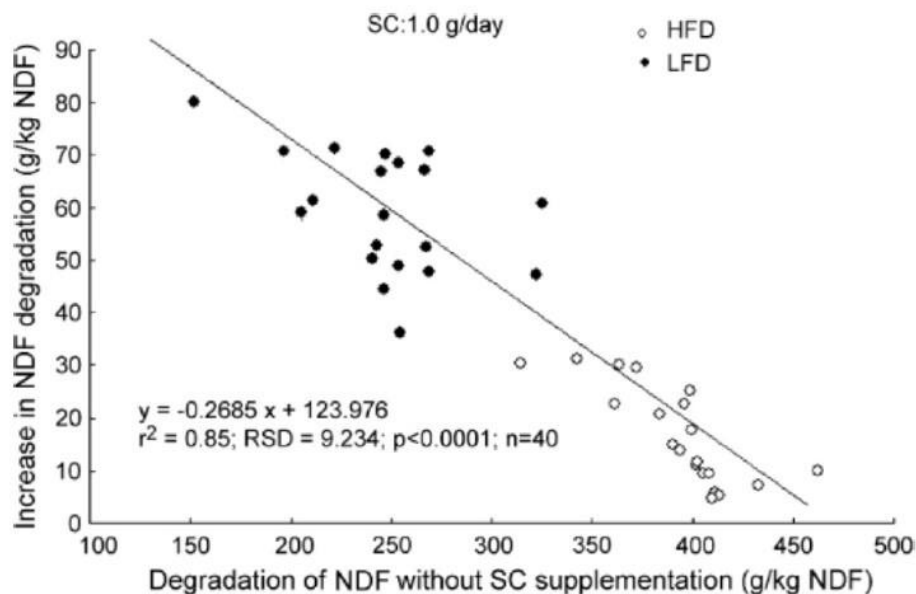


Figura I. Efeito da suplementação com SC (1g/dia) na degradação da fibra (NDF) de silagens de milho, após 36h de incubação no rúmen. SC – *Saccharomyces cerevisiae*; HFD – Grupo de silagens de elevada degradabilidade da fração NDF; LFD – Grupo de silagens de baixa

De igual modo, neste estudo as dietas fornecidas às vacas eram não acidogénicas. A maior parte dos microrganismos fibrolíticos são sensíveis a valores de pH baixos, baixando a atividade destes microrganismos sob estas condições (Fernando *et al.*, 2010; Petri *et al.*, 2013). O efeito positivo da SC na estabilização do pH ruminal foi demonstrado em vários estudos, tendo também um impacto positivo na atividade da flora microbiana responsável pela degradação fibrosa (Mosoni *et al.*, 2007; Chaucheyras-Durand *et al.*, 2012).

Dos trabalhos atrás analisados é notória a inconsistência nos resultados obtidos para a degradação ruminal dos alimentos, sendo possível que tal se deva ao uso de diferentes estirpes de SC e ao modo de ação destas leveduras no rúmen, pelo que ainda existe muito trabalho de investigação a ser feito neste campo.

2.4. Modo de Ação das Leveduras

Vários mecanismos de ação podem explicar os efeitos das leveduras SC nos parâmetros fermentativos do rúmen e na degradabilidade da fibra. Uma das hipóteses assenta na capacidade que as leveduras possuem para se desenvolver no rúmen, pelo menos por um curto espaço de tempo, melhorando diretamente a digestibilidade da fração

fibrosa e/ou a produção de nutrientes, que estimulam a multiplicação das bactérias responsáveis pela degradação da maior parte da fibra presente no rúmen (Vohra *et al.*, 2016). Foi também sugerido que as leveduras influenciam a atividade das bactérias responsáveis pela metabolização do ácido láctico, limitando a sua produção por bactérias como *Streptococcus bovis* e reduzindo a sua acumulação no rúmen, e melhorando o desenvolvimento de bactérias utilizadores de lactato como a *Megasphaera elsdenii*, reduzindo problemas ingestão por diminuição do pH ruminal (Chaucheyras *et al.*, 1996; Rossi *et al.*, 2004; Vohra *et. al.*, 2016). É também referido que as leveduras utilizam o pouco oxigénio dissolvido no rúmen que interfere na interação das bactérias celulolíticas com a componente fibrosa do alimento, favorecendo assim o crescimento das bactérias anaeróbias (Frédérique Chaucheyras-Durand e Fonty, 2002; Denev *et al.*, 2007; Robinson, 2010; Vohra *et. al.*, 2016). Além disso, as leveduras podem servir de micronutrientes para a população microbiana do rúmen, permitindo o seu desenvolvimento, e consequentemente melhorar a digestão da fibra, a utilização dos produtos resultantes da fermentação, prevenindo a sua acumulação no rúmen (Robinson, 2010).

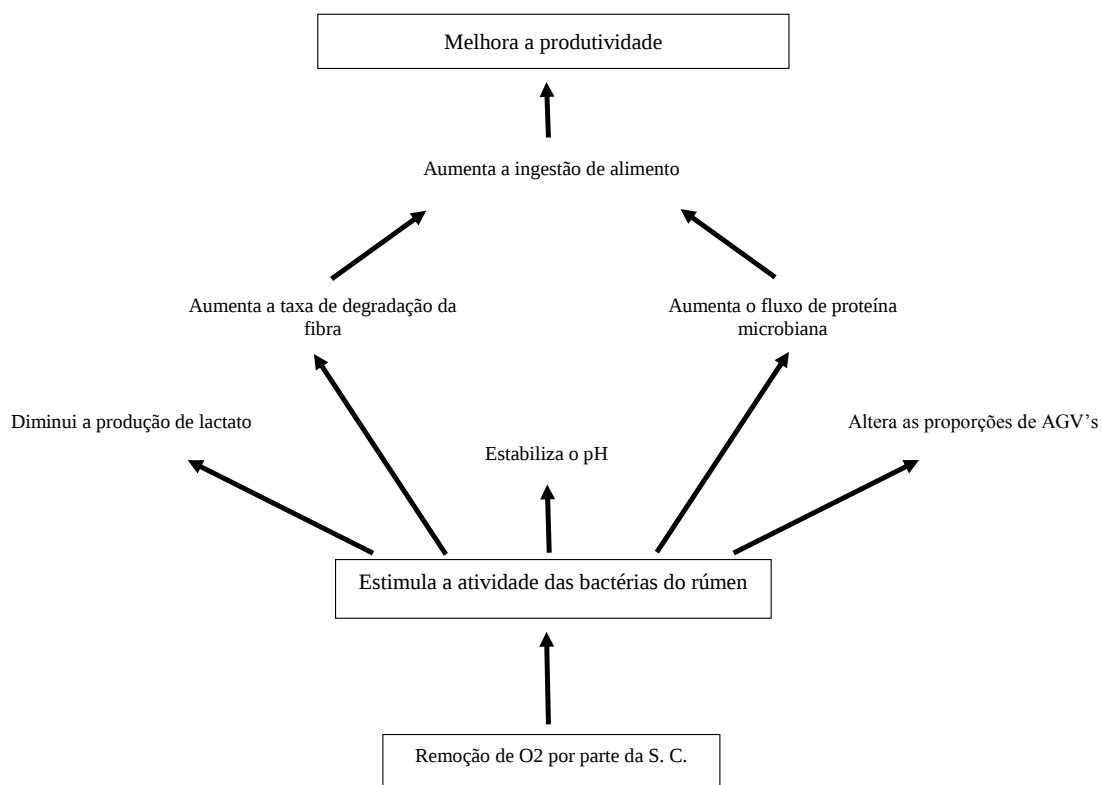


Figura II. Esquema ao modo de ação das culturas de leveduras. Fonte: Adaptado de Wallace (1994).

TRABALHO EXPERIMENTAL

III. TRABALHO EXPERIMENTAL

3.1. Objetivos

Este estudo faz parte de um projeto mais abrangente, financiado por uma empresa privada, que teve como objetivos avaliar o efeito da suplementação de uma dieta não acidogénica e de uma dieta acidogénica com uma cultura viva comercial de *Saccharomyces Cerevisiae* (SC): 1) nos parâmetros de fermentação no rúmen e 2) na degradação no rúmen da fibra de forragens originárias de vários países em vacas não lactantes.

O trabalho experimental que aqui se descreve incidiu apenas sobre o efeito da SC na degradação no rúmen de 10 amostras de SM em vacas alimentadas com uma dieta não acidogénica.

3.2. Material e Métodos

3.2.1. Delineamento Experimental

Este trabalho experimental encontra-se dividido em dois ensaios sequenciais. No primeiro ensaio (Ensaio I) foi determinada a degradação *in sacco* da MS e da fração NDF (NDFdeg) de 10 amostras de SM em vacas alimentadas com uma dieta constituída por silagem de milho, feno de prado natural e concentrado (Dieta LEV-). No segundo ensaio (Ensaio II), as mesmas 10 amostras de SM foram submetidas à determinação da degradação *in sacco* da MS e da fração NDF nas mesmas vacas alimentadas com a mesma dieta do ensaio I suplementada SC (Dieta LEV+).

3.2.2. Animais, Dietas e Maneio

O estudo foi realizado em 4 vacas da raça Frísia, não lactantes, múltiparas e fistuladas no rúmen (cânula *Bar Diamond*[®], modelo #1C), que no início do trabalho apresentavam um peso vivo de $665,2 \pm 56,2$ kg. Os animais foram alojados numa sala com baias individuais, tendo água à disposição *ad libitum*.

Trabalho Experimental

No Ensaio I e no Ensaio II os animais foram alimentados com uma dieta constituída por 13 kg de SM, 3 kg de feno de prado natural (FPN) e 3,4 kg de alimento concentrado (AC), por forma a garantir uma proporção de forragem:concentrado de 70:30 (c.a. 43% SM: 27% FPN: 30% AC na MS da dieta). No Ensaio II foi administrado aos animais 0,5g de uma cultura de leveduras vivas *Saccharomyces cerevisiae*, contendo 2×10^{10} UFC/g (isto é, 10^{10} UFC/dia; nível recomendado pelo fabricante) por dia logo após a refeição da manhã, através da cânula ruminal.

A dieta foi distribuída 2 vezes por dia (9:00h e 19:00h). A quantidade de alimento oferecida foi determinada em período prévio ao início do ensaio, por forma a garantir uma ingestão *ad libitum*, mas evitando a ocorrência de refugos durante o período de medições.

A composição química dos alimentos da dieta base e a composição em ingredientes do alimento composto apresentam-se no **Quadro V** e no **Quadro VI**, respetivamente.

Quadro V. Teor em MS e composição química[†] dos alimentos das dietas utilizadas.

	Silagem de milho	Feno	Concentrado
MS (%)	32,7	88,4	88,7
Composição química (% MS)			
Cinzas	4,3	7,7	10,7
PB	6,5	6,2	25,9
NDF [‡]	43,5	66,6	19,3
ADF	21,7	41,7	11,1
ADL	2,2	5,7	2,5
Amido	34,7	nd	24,1

[†] MS - matéria seca; MO - matéria orgânica; PB - proteína bruta; NDF - fibra de detergente neutro; ADF - fibra de detergente ácido; ADL - lenhina de detergente ácido; nd – não determinado.

Os animais tiveram sempre água à disposição durante todo o período experimental.

Cada ensaio teve a duração de 42 dias, correspondendo os primeiros 21 dias ao período de adaptação à dieta. Durante as 2 primeiras semanas de adaptação, 2 horas após a refeição da manhã, os animais foram retirados das baias para um parque exterior por um período de 4 horas/dia para permitir realização de atividade física.

Durante toda a duração do trabalho experimental foram recolhidas amostras dos alimentos fornecidos aos animais. Foram recolhidas amostras semanais da SM e amostras quinzenais do FPN e do AC. As amostras foram secas a 65°C durante pelo menos 24 h em estufa com circulação forçada de ar para a determinação da MS. As amostras secas foram moídas em moinho equipado com crivo de 1 mm antes de serem enviadas para o laboratório.

Quadro VI. Composição em ingredientes do alimento composto.

Ingrediente	g/kg
Milho	300,0
Bagaço de soja 46,5	275,0
Bagaço de colza	160,0
Bagaço de palmiste	47,0
Polpa de beterraba	50,0
Destilados de milho	48,0
Cascas de soja	40,0
Sabão cálcico	20,0
Melaço de cana	18,0
Bicarbonato de sódio	7,5
Óxido de magnésio	5,0
Carbonato de cálcio	18,5
Sal	4,0
Ureia	2,8
Metionina líquida	2,0
Aroma	0,2
Antioxidante (vit E)	20,0

3.2.3. Silagens de Milho

O estudo incluiu 10 amostras de SM. Foram utilizadas 9 amostras provenientes de 4 países (1 amostra de Itália, 2 amostras do Reino Unido, 2 amostras da Holanda e 4 amostras dos Estados Unidos), colhidas nos anos de 2013 e 2014 e 1 amostra nacional (Portugal) correspondendo à silagem de milho constituinte das dietas experimentais. As 9 amostras de SM provenientes de países europeus e dos Estados Unidos foram secas nos locais de

origem. A amostra da SM nacional foi seca em estufa com circulação forçada de ar a 65°C durante 48 h.

Quadro VII. Origem das 10 amostras de SM estudadas.

Silagem de milho	País de origem
SM1	Itália
SM 2	Holanda
SM 3	Holanda
SM 4	Reino Unido
SM 5	Reino Unido
SM 6	Estados Unidos
SM 7	Estados Unidos
SM 8	Estados Unidos
SM 9	Estados Unidos
SM 10	Portugal

Todas as amostras secas foram moídas em moinho equipado com crivo de 4 mm antes de serem usadas neste estudo. Parte da amostra foi guardada para a determinação da degradação *in sacco* e sendo a restante amostra moída em moinho equipado com crivo de 1 mm antes de serem submetidas a análises laboratoriais.

3.2.4. Determinação da Degradação *In sacco*

Sacos de *nylon* com dimensão de 10 x 20 cm e com porosidade de 53 (+/-10) µm (ref #BG1020, *Bar Diamond*®, EUA) contendo cerca de 6 g de amostra (seca e moída a 4 mm) foram incubados no rúmen de acordo com o método de Ørskov *et. al.* (1980) e seguindo os procedimentos descritos por Guedes e Dias-da-Silva (1994). Os sacos que seriam para as 12 e 36 h de incubação, foram introduzidos no rúmen de cada vaca 2 h após a refeição da tarde, ou seja, às 21h. Os sacos das 12 h foram retirados às 9 h do dia seguinte e

introduzidos os sacos das 24 h imediatamente a seguir. Assim os sacos das 24 e 36 h foram retirados no dia seguinte às 9 h da manhã. As incubações foram repetidas uma vez em cada vaca fazendo, no total, 8 repetições por amostra. Após serem removidos do rúmen, os sacos foram lavados com água corrente e em máquina de lavar roupa com água fria (no programa das lãs, durante 40 minutos), e por fim foram secos a 65°C durante, pelo menos, 24 h em estufa com circulação forçada de ar. Depois de secos, os sacos foram pesados para a determinação da MS do resíduo e posterior cálculo da degradação da MS *in sacco*. De seguida, os resíduos foram retirados dos sacos e armazenados para posterior determinação do teor em NDF e cálculo da degradação da fração NDF *in sacco*.

3.2.5. Análises Laboratoriais

As amostras secas e moídas (1 mm) das SM que foram incubadas no rúmen e dos alimentos fornecidos aos animais foram submetidas a análises laboratoriais.

O teor em cinzas e em PB (azoto Kjeldhal x 6,25) foram determinados de acordo com os métodos propostos pela AOAC (1990). O teor em amido foi determinado através de um *kit* de análise (K-TSTA 07/11, Megazyme, Irlanda), usando um espectrómetro UV/VIS (UV Micro-1240, Shimadzu, Japan). O teor em NDF foi determinado e expresso numa base isenta de cinza (Van Soest *et. al.*, 1991). O teor em fibra de detergente ácido (ADF) foi determinado e expresso numa base isenta de cinza (AOAC, 1990) e em lenhina de detergente ácido (ADL) segundo a metodologia de Robertson e Van Soest (1981). As amostras de SM e de AC foram sujeitas a extração com α -amilase termo-estável antes da determinação da fracção NDF.

3.2.6. Análise Estatística

Foram calculados alguns indicadores de estatística descritiva para analisar os dados da composição química das SM e da degradação da MS e da fração NDF após 12, 24 e 36 h de incubação *in sacco* no rúmen: média, mediana, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV).

Todas as análises foram feitas no programa de estatística *JMP* (Versão 7; SAS Institute Inc. Cary, NC, USA). Os resultados da degradação da MS e da fração NDF para cada tempo de incubação *in sacco* (12, 24 e 36 h) foram submetidos a análise de variância seguindo um modelo fatorial 2 x 10 com a dieta (n = 2) e SM (n = 10) como fatores. As diferenças entre médias foram analisadas pelo teste de *t* múltiplo de *Student*.

3.3. Resultados

3.3.1. Composição Química das Silagens de Milho

No **Quadro VIII** encontram-se o teor em MS e a composição química das 10 amostras de silagem de milho utilizadas neste ensaio, bem como os valores da média, da mediana, do DP e do CV. Os valores mínimos e máximos de cada componente químico estão assinalados a negrito.

Os componentes químicos analisados apresentaram alguma variação apesar de estarem expressos em percentagem da MS. A variação maior foi observada para o teor em ADL (CV = 24,9%) e a variação mais baixa foi observada para o teor em amido (CV = 6,6%). O teor médio em MS das silagens de milho estudadas foi de 33,7%, sendo o valor mais baixo de 28,0% (SM 8) e o mais elevado de 45,4% (SM 9).

A parede celular (NDF) representou a maior proporção da MS das amostras, variando entre 35,4% (SM 3) e 46,6% (SM 4). Estas 2 silagens de milho também apresentaram quer o valor mais baixo (20,5%; SM 3) quer o valor mais elevado (26,9%; SM 4) para o teor em ADF. Verifica-se igualmente que o teor em hemicelulose (calculado como NDF-ADF) e o teor em celulose (calculado como ADF-ADL) é, em média, de 17,9 e 21,8% MS, sendo o valor do CV de 13,1 e 9,1%, respetivamente.

O valor da mediana (medida de localização do centro da distribuição dos dados) dá-nos uma indicação de “localização” dos dados verificando-se que a média e a mediana coincidem (ou quase coincidem) em todos os componentes analíticos pelo que podemos considerar que a distribuição é aproximadamente simétrica, não tendo sido observados valores *outliers*.

Quadro VIII. Teor em MS e composição química das 10 amostras de silagem de milho estudadas (% da MS).

Silagem de milho (SM)	MS (%)	Cinzas	PB	NDF	ADF	ADL	Amido
SM1	32,8	5,0	7,6	41,9	26,7	3,2	39,5
SM 2	35,2	3,3	6,4	43,1	26,5	3,4	35,9
SM 3	35,9	4,0	7,0	35,4	20,5	1,7	42,1
SM 4	30,0	4,1	7,7	46,0	26,9	3,2	36,0
SM 5	34,5	4,3	8,5	37,0	21,9	2,5	35,4
SM 6	38,7	3,7	7,1	43,2	23,1	1,7	37,8
SM 7	31,4	3,5	6,9	44,0	25,9	1,9	35,2
SM 8	28,0	5,7	6,3	45,1	25,8	2,6	36,4
SM 9	45,4	3,5	6,9	42,8	24,4	2,7	40,0
SM 10	32,7	4,3	6,5	43,5	21,7	2,2	34,7
Média	33,7	4,1	7,1	42,2	24,3	2,5	36,3
Mediana	34,5	4,1	7,0	43,1	25,1	2,6	36,2
DP	4,91	0,73	0,68	3,39	2,38	0,62	2,5
CV (%)	14,2	17,7	9,6	8,0	9,8	24,9	6,6

MS - matéria seca; P - proteína bruta; NDF - fibra de detergente neutro; ADF - fibra de detergente ácido; ADL - lenhina de detergente ácido; DP - desvio padrão; CV - coeficiente de variação.

3.3.2. Degradação no Rúmen da MS e da Fração NDF

No **Quadro IX** encontram-se os valores da degradação da MS e da fração NDF após 12, 24 e 36 h de incubação *in sacco* das 10 amostras de silagem de milho utilizadas neste ensaio. Os valores da média, da mediana, do DP e do CV encontram-se também no **Quadro IX**, e os valores mínimos e máximos de cada componente químico estão assinalados a negrito.

Quadro IX. Degradação (%) da MS e da fração NDF após 12, 24 e 36 h de incubação *in sacco* das 10 amostras de silagem de milho estudadas.

Silagem de milho (SM)	Tempo de incubação (horas)					
	12		24		36	
	MS	NDF	MS	NDF	MS	NDF
SM1	54,8	10,9	66,9	34,3	73,7	47,7
SM 2	55,7	15,3	64,2	29,7	70,4	41,3
SM 3	59,1	9,9	70,3	31,0	77,9	48,7
SM 4	57,7	25,5	68,8	44,4	74,1	53,3
SM 5	62,9	19,1	71,9	38,3	78,7	53,1
SM 6	53,8	13,2	64,0	30,7	73,5	49,1
SM 7	54,7	12,0	67,8	37,5	73,4	47,7
SM 8	51,5	11,1	62,5	30,9	72,2	49,9
SM 9	56,2	17,2	67,3	35,3	73,9	48,6
SM 10	58,8	23,7	71,3	45,2	75,5	53,5
Média	56,5	15,8	67,5	35,8	74,3	49,3
Mediana	56,0	14,2	67,6	34,8	73,7	48,9
DP	3,21	5,48	3,20	5,61	2,48	3,64
CV (%)	5,7	34,8	4,7	15,7	3,3	7,4

MS - matéria seca; NDF - fibra de detergente neutro; DP - desvio padrão; CV - coeficiente de variação.

A variação dos valores da degradação (CV) foi mais elevada na degradação da fração NDF do que na degradação da MS, para os 3 tempos de incubação estudados. No entanto, a diferença no CV entre a degradação da MS e a degradação da fração NDF diminuiu com o tempo de incubação, sendo de 29,3, 11,0 e 4,1 unidades, respectivamente para as 12, 24 e 36 h de incubação no rúmen.

Observa-se ainda que após 36 h de incubação a SM 2 apresentou os valores mais baixos de degradação quer da MS quer da fração NDF (70,4 e 41,3%, respectivamente para a MS e a fração NDF). Os valores mais elevados de degradação da MS e de degradação da fração NDF foram obtidos na SM 5 (78,7%) e na SM 10 (53,5%), respectivamente.

Tal como observado para a composição química das silagens de milho, verifica-se que a média e a mediana coincidem (ou quase coincidem) sempre pelo que não existem valores *outliers*.

3.3.3. Efeito da Levedura na Degradação no Rúmen

O efeito da dieta e da silagem de milho na degradação da MS *in sacco* após 12, 24 e 36 h está apresentado no **Quadro X**.

Foi observado um efeito significativo ($P < 0,01$) da incorporação diária de SC na dieta na degradação da MS das silagens de milho após 12 h de incubação no rúmen, sendo o aumento médio de 9,1 unidades. Observa-se ainda que há uma tendência ($P = 0,052$) para o efeito positivo da suplementação com SC na degradação da MS das silagens de milho após 36 h de incubação no rúmen. Não houve efeito da dieta na degradação da MS após 24 h de incubação no rúmen ($P > 0,05$).

A silagem de milho teve um efeito significativo ($P < 0,0001$) na degradação da MS após 12, 24 e 36 h de incubação.

Não houve interação ($P > 0,05$) entre a dieta e a silagem de milho na degradação das silagens *in sacco* durante 24 e 36 h mas observou-se um efeito positivo ($P < 0,05$) da dieta na degradação das silagens de milho após 12 h de incubação.

O efeito da dieta e da silagem de milho na degradação da fração NDF *in sacco* após 12, 24 e 36 h está apresentado no **Quadro XI**.

Não houve efeito significativo ($P > 0,05$) da dieta na degradação da fração NDF das silagens de milho, após 12, 24 e 36 h de incubação no rúmen. No entanto houve uma tendência para um efeito positivo da incorporação de levedura SC na dieta após 24 h ($P = 0,11$) e 36 h ($P = 0,12$) de incubação.

Tal como observado para a degradação da MS *in sacco*, a silagem de milho teve um efeito significativo ($P < 0,0001$) na degradação da fração NDF após 12, 24 e 36 h de incubação.

Trabalho Experimental

Quadro X. Efeito da dieta e da silagem de milho na degradação da MS *in sacco* após 12, 24 e 36 h de incubação (%).

Efeito	Tempo de incubação (horas)		
	12	24	36
Dieta			
LEV-	56,5 b	67,5	74,3
LEV +	57,4 a	68,1	75,1
Probabilidade (P)	0,0095	0,2664	0,0518
Silagem de milho			
SM 1	55,9 def	67,1 cde	73,8 bc
SM 2	55,6 ef	65,5 def	73,7 bc
SM 3	58,6 b	70,3 ab	78,2 a
SM 4	57,1 cd	68,3 bc	74,9 bc
SM 5	63,9 a	72,0 a	79,5 a
SM 6	55,0 f	65,4 ef	73,2 c
SM 7	55,9 def	67,6 cd	74,0 bc
SM 8	52,4 g	63,4 f	69,8 d
SM 9	57,0 cde	68,0 c	74,7 bc
SM 10	58,1 bc	70,2 ab	75,5 b
Probabilidade (P)	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Interação			
LEV- x SM 1	54,8 hijk	66,9	73,7
LEV- x SM 2	55,7 fghij	64,2	70,4
LEV- x SM 3	59,1 c	70,3	77,9
LEV- x SM 4	57,7 cdef	68,8	74,1
LEV- x SM 5	62,9 b	71,9	78,7
LEV- x SM 6	53,8 jk	64,0	73,5
LEV- x SM 7	54,7 ijk	67,8	73,4
LEV- x SM 8	51,5 l	62,5	72,2
LEV- x SM 9	56,2 efghi	67,3	73,9
LEV- x SM 10	58,8 cd	71,3	75,5
LEV+ x SM 1	56,9 defgh	67,4	73,8
LEV+ x SM 2	55,4 ghijk	66,5	69,2
LEV+ x SM 3	58,2 cde	70,1	78,4
LEV+ x SM 4	56,5 efghi	67,9	73,8
LEV+ x SM 5	65,0 a	72,1	80,3
LEV+ x SM 6	56,3 efghi	66,9	74,1
LEV+ x SM 7	57,1 cdefg	68,1	75,9
LEV+ x SM 8	53,4 kl	64,4	74,2
LEV+ x SM 9	57,8 cdef	67,8	75,8
LEV+ x SM 10	57,4 cdefg	69,4	75,5
Probabilidade (P)	0,0189	0,6064	0,5634

Valores referentes ao mesmo efeito e ao mesmo tempo de incubação com letras diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$).

Quadro XI. Efeito da dieta e da silagem de milho na degradação da fração NDF *in sacco* após 12, 24 e 36 h de incubação.

Efeito	Tempo de incubação (horas)		
	12	24	36
Dieta			
LEV-	15,8	35,7	49,3
LEV +	16,5	37,2	50,7
Probabilidade (P)	0,1978	0,1198	0,1072
Silagem de milho			
SM 1	14,2 de	33,9 cde	49,7 cd
SM 2	12,1 ef	32,1 de	49,3 d
SM 3	22,6 ab	44,0 a	53,7 ab
SM 4	18,2 c	37,1 bc	50,4 bcd
SM 5	23,6 a	44,2 a	55,1 a
SM 6	11,6 f	31,5 e	47,9 d
SM 7	14,6 d	35,3 bcde	49,9 bcd
SM 8	9,1 g	31,5 e	40,7 e
SM 9	14,8 d	36,2 bcd	50,3 bcd
SM 10	20,5 bc	39,0 b	53,2 abc
Probabilidade (P)	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Interação			
LEV- x SM 1	10,9 hij	34,3	47,7
LEV- x SM 2	15,3 efg	29,7	41,3
LEV- x SM 3	9,9 ij	31,0	48,7
LEV- x SM 4	25,5 a	44,4	53,3
LEV- x SM 5	19,1 cd	38,3	53,1
LEV- x SM 6	13,2 fghi	30,7	49,1
LEV- x SM 7	12,0 ghi	37,5	47,7
LEV- x SM 8	11,1 hij	30,9	49,9
LEV- x SM 9	17,2 de	35,3	48,6
LEV- x SM 10	23,7 ab	45,2	53,5
LEV+ x SM 1	12,3 ghi	36,4	48,0
LEV+ x SM 2	14,3 efgh	33,2	40,1
LEV+ x SM 3	8,4 j	32,0	49,8
LEV+ x SM 4	21,7 dc	45,0	53,1
LEV+ x SM 5	22,0 bc	39,7	57,0
LEV+ x SM 6	16,0 def	37,0	50,2
LEV+ x SM 7	16,3 def	36,7	52,2
LEV+ x SM 8	13,1 fghi	33,4	50,7
LEV+ x SM 9	19,2 cd	37,0	52,1
LEV+ x SM 10	21,6 dc	42,8	53,9
Probabilidade (P)	0,0202	0,7557	0,9000

Valores referentes ao mesmo efeito e ao mesmo tempo de incubação com letras diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$).

Foi observada uma interação significativa entre a dieta e a silagem de milho ($P < 0,05$) para as 12 h de incubação *in sacco*. Para as 24 e 36 h de incubação *in sacco* não houve efeito significativo ($P > 0,05$) da interação dieta x silagem de milho.

3.4. Discussão

3.4.1. Composição Química

De um modo geral, verificamos que não há grande variação nos componentes químicos analisados, sendo exceção o teor em ADL que é o componente que apresenta a maior variação (CV 24,9%), sendo 3 a 4 vezes superior à variação do teor em PB, NDF, ADF e amido, com CV que varia entre 6,6 e 9,6%.

A composição química das silagens de milho utilizadas neste trabalho é semelhante aos valores de referência apresentados pelo NRC (2001) (**Quadro XII**), FEDIPEDIA (2016) (**Quadro XIII**) e FEDNA (2016) (**Quadro XIV**) que constituem organismos oficiais de recomendações alimentares de alguns países. O teor médio em MS das silagens de milho estudadas variou entre 28,0% (SM 8) e 45,4% (SM 9), sendo a média de 33,7%. Comparando com os valores dos quadros e para silagens de milho com teor em MS da mesma ordem de grandeza da que obtivemos, salientamos que o teor em amido das silagens estudadas (valor médio 36,3%) é superior aos valores apresentados nestes quadros e que o teor em NDF pode ser considerado baixo (valor médio 42,2%). Esta observação segue a tendência do que temos observado atualmente nas amostras de silagem de milho, isto é, maior proporção de grão e menor de caules, resultado do melhoramento genético das variedades atualmente comercializadas (comunicação pessoal). Podemos ainda considerar que isto seja o resultado apenas da altura do corte da planta de milho para ensilar.

Estabelecemos correlações entre alguns componentes químicos das silagens de milho mas não encontramos valores de coeficientes de correlação significativos, apenas entre o teor em NDF e o teor em ADF foi observada uma correlação significativa ($r = 0,849$; $P < 0,01$), o que é de esperar dada a semelhança de constituintes destas duas frações da fibra, representando a fração ADF, em média, 57,7% da fração NDF.

Quadro XII. Composição química de silagens de milho (NRC, 2001).

MS (%)	Cinzas	PB	NDF	ADF	ADL
% da MS					
<25	4,8	9,7	54,1	34,1	3,5
32%-38	4,3	8,8	45,0	28,1	2,6
40	4,0	8,3	44,5	27,5	3,1

MS - matéria seca; PB - proteína bruta; NDF - fibra de detergente neutro; ADF - fibra de detergente ácido; ADL - lenhina de detergente ácido.

Quadro XIII. . Composição química de silagens de milho (FEDIPEDIA, 2016).

MS %	Cinzas	PB	NDF	ADF	ADL	Amido
% MS						
<25	4,8	8,1	47,7	27,1	3,3	15,0
25-30	4,0	7,3	44,4	24,7	2,9	24,3
30-35	3,7	7,0	44,1	23,3	2,7	28,9
35-40	3,6	6,9	43,9	22,8	2,6	31,5

MS - matéria seca; PB - proteína bruta; NDF - fibra de detergente neutro; ADF - fibra de detergente ácido; ADL - lenhina de detergente ácido.

Quadro XIV. Composição química de silagens de milho (FEDNA, 2016).

MS (%)	Cinzas	PB	NDF	ADF	ADL	Amido
% da MS						
<20	6,4	9,3	55,2	32,6	4,1	10,5
20-25	6,3	9,1	52,4	30,3	3,7	12,6
25-30	5,4	8,3	47,6	26,2	3,3	24,2
30-35	4,9	7,6	44,5	23,9	3,2	28,2
>35	4,8	7,6	41,4	22,7	3,2	33,3

MS - matéria seca; PB - proteína bruta; NDF - fibra de detergente neutro; ADF - fibra de detergente ácido; ADL - lenhina de detergente ácido.

Trabalho Experimental

Na **Figura III** podemos observar a representação gráfica da relação entre o teor em amido e em MS (Gráfico 1), o teor em NDF e em MS (Gráfico 2) e entre o teor em amido e o teor em NDF (Gráfico 3), embora todos os coeficientes de correlação sejam não significativos ($P > 0,05$), como referido anteriormente. A correlação entre o teor em amido e a MS é 0,518, entre o teor em NDF e MS é -0,277 e entre o teor em amido e o teor em NDF é -0,495.

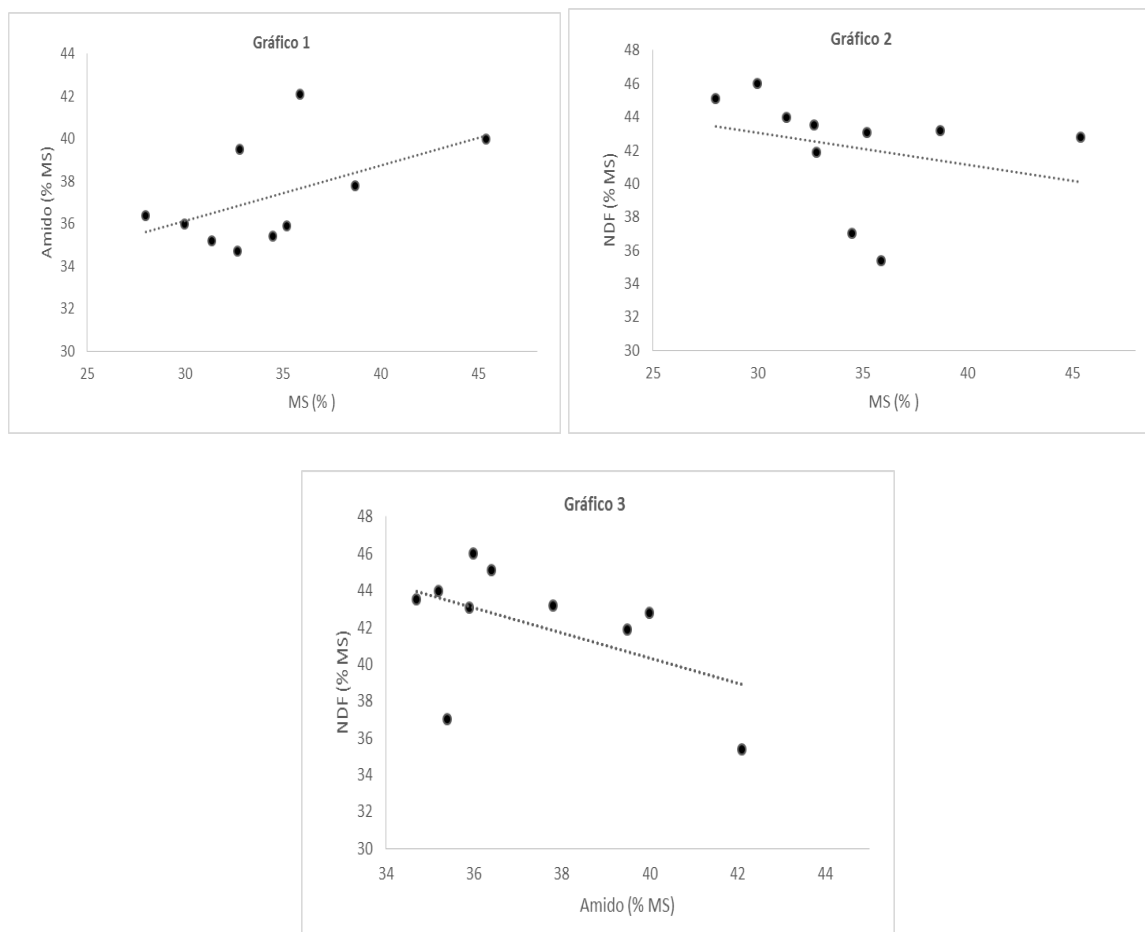


Figura III. Relação entre o teor em amido e a MS (Gráfico 1), o teor em NDF e a MS (Gráfico 2) e entre o teor em amido e o teor em NDF (Gráfico 3).

Observamos que aparecem 2 pontos *outliers* no Gráfico 2 e no Gráfico 3 que correspondem às amostras de silagem SM 3 e SM 5 que apresentam um baixo teor em NDF.

3.4.2. Degradação das Silagens de Milho no Rúmen

A degradação da MS e da fração NDF das silagens de milho utilizadas neste trabalho determinada após 12, 24 e 36 horas de incubação *in sacco*, encontra-se representada na **Figura IV**.

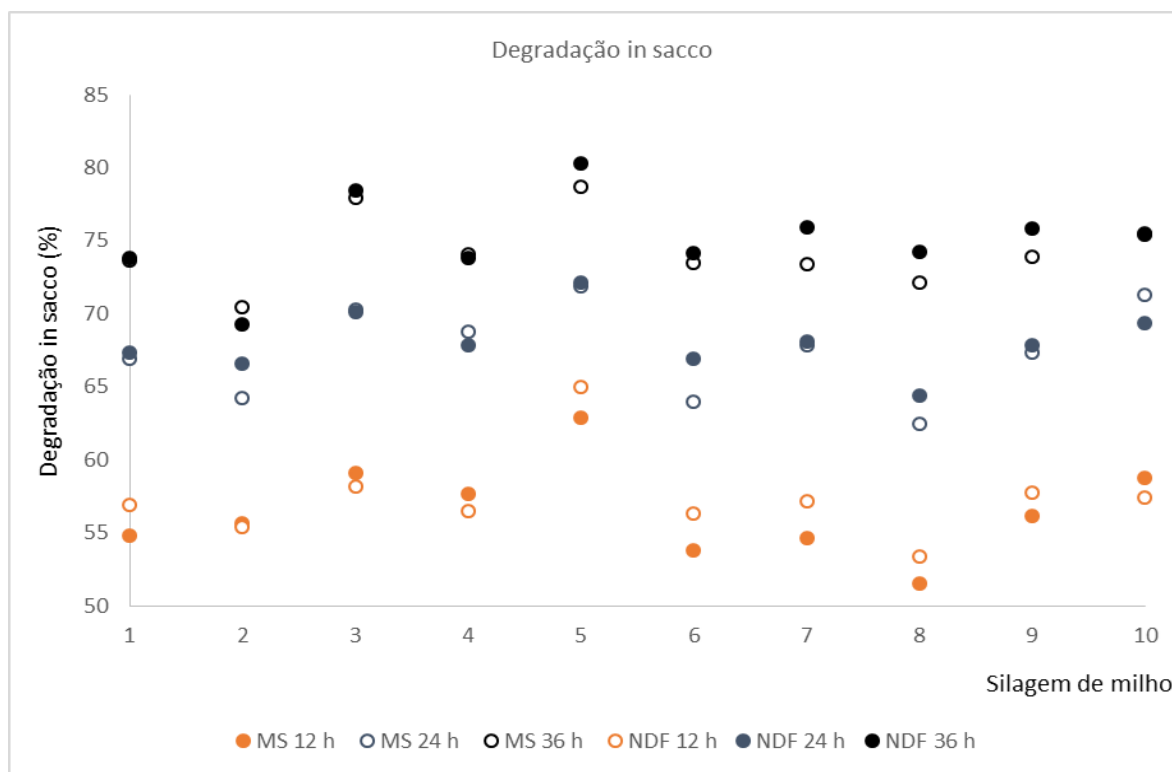


Figura IV. Degradação da MS e da fração NDF das silagens de milho, determinada após 12, 24 e 36

Observamos alguma variação entre amostras na degradação *in sacco* da MS e da fração NDF, sendo que na degradação da fração NDF o CV foi mais elevado para todos os tempos de incubação (CV médio de 19,3% para a fração NDF e 4,6% para a MS). Verificamos que após 12 h de incubação a degradação da MS é, de um modo geral, superior à degradação da fração NDF, sendo que nos tempos de incubação mais longos (24 e 36 h) há uma tendência para que esta situação se inverta. Isto provavelmente resulta do facto da degradação da MS refletir a degradação dos seus principais componentes - amido e NDF, sendo que a degradação do amido é mais rápida do que a degradação da fração NDF pelo que, nos tempos mais longos ocorre essencialmente a degradação da fração NDF.

Trabalho Experimental

Estabelecemos correlações entre os componentes da MS, amido e NDF, e a degradação da MS e verificámos que as correlações foram significativas entre a fração NDF e a degradação da MS para todos os tempos de incubação estudados, $r = -0,656$, $P < 0,001$ para as 12 h; $r = -0,665$, $P < 0,001$ para as 24 h e $r = -0,781$, $P < 0,001$ para as 36 h de incubação *in sacco*. Não foram encontradas correlações significativas entre a degradação da MS e teor em amido, para nenhum dos tempos de incubação estudados.

Na **Figura V** encontra-se o gráfico que representa a relação entre o teor em NDF e a degradação da MS no rúmen após 36 h de incubação *in sacco*.

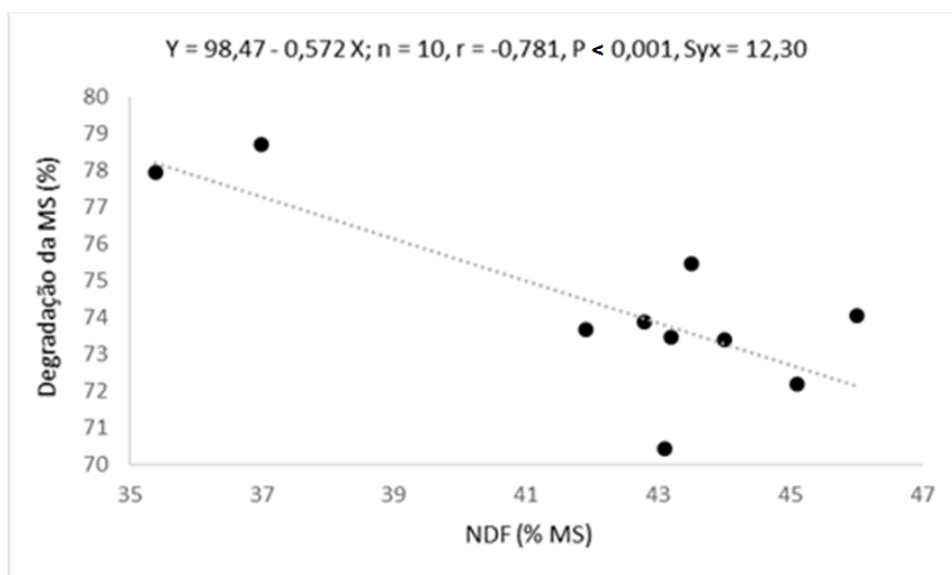


Figura V. Regressão entre o teor em NDF (variável X) e a degradação da MS após 36 h de incubação *in sacco*.

Mais uma vez se destacam as amostras SM3 e SM5 que apresentam o teor em NDF mais baixo e degradação de MS mais elevada (77,9 e 78,7% na SM3 e SM5, respetivamente). Sem estas 2 amostras a correlação não é significativa ($P > 0,05$).

3.4.3. Efeito da Suplementação com Levedura na Degradação no Rúmen

Verificámos que o efeito da suplementação com SC na degradação da MS e da fração NDF das SM para os tempos de incubação 24 e 36 h não foi significativo ($P > 0,05$), sendo que para o tempo de incubação 12 h se observou um efeito significativo ($P < 0,01$ e para a degradação da MS e $P < 0,05$ para a degradação da fração NDF). Em termos médios, o incremento da degradação da fração NDF foi de 2,1, 1,6 e 1,4 unidades percentuais para as 12, 24 e 36 h de incubação, sendo os valores do incremento para a degradação da MS inferiores para os 3 tempos de incubação estudados.

Nos gráficos da **Figura VI**, podemos observar o efeito da suplementação com SC na degradação da fração NDF das SM para as 12 (Gráfico 1), 24 (Gráfico 2) e 36 (Gráfico 3) horas de incubação bem como a variação da degradação desta fração após a suplementação, em unidades percentuais.

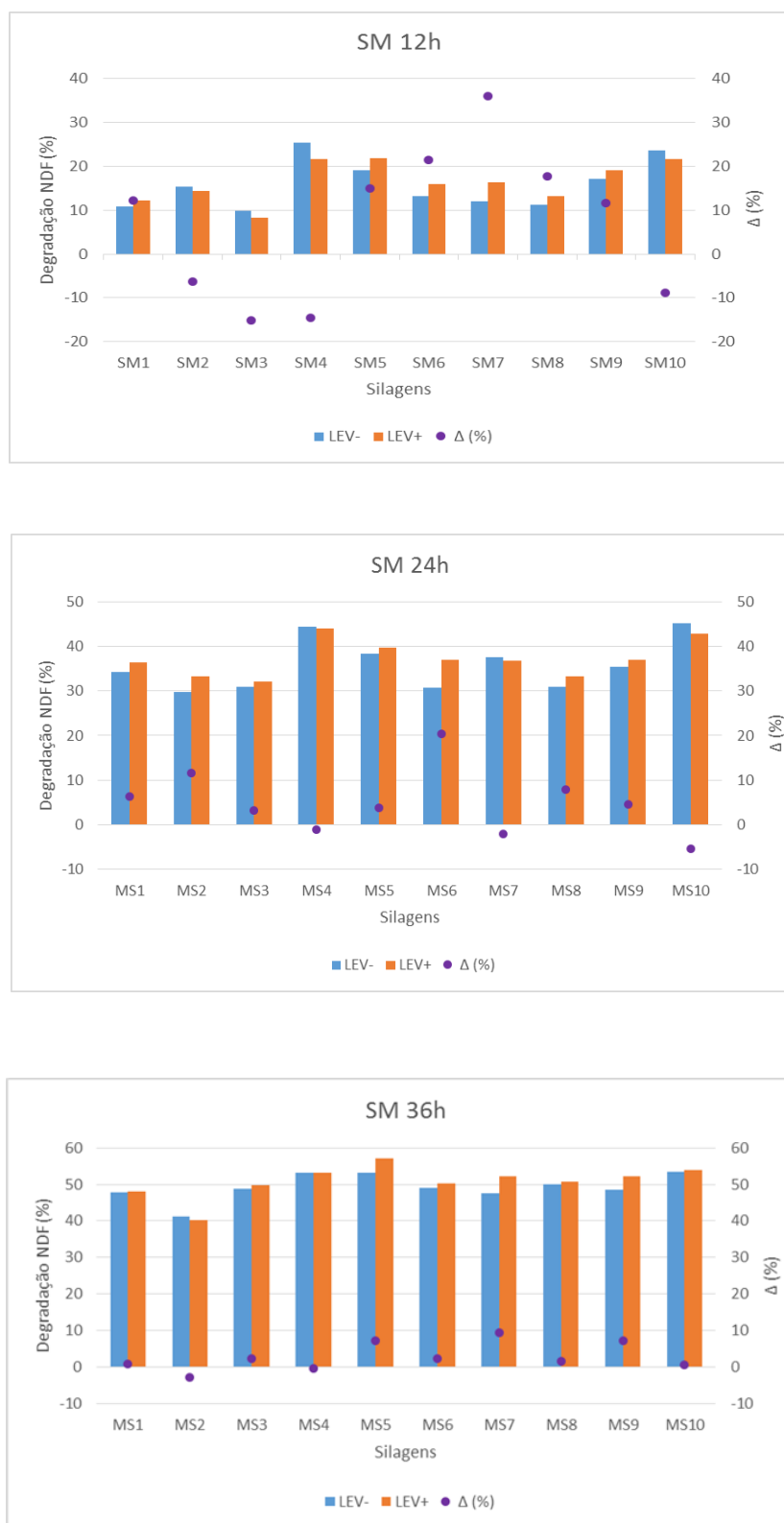


Figura VI. Efeito da suplementação com levedura na degradação da fração NDF das SM após 12 h (Gráfico 1), 24 h (Gráfico 2) e 26 h (Gráfico 3) de incubação *in sacco*.

Observamos que há diferenças na degradação da fração NDF entre silagens, bem como na resposta à suplementação com SC, sendo esta variação muito mais acentuada após 12 h de incubação. Isto traduziu-se, como vimos anteriormente, num efeito significativo da interação ($P < 0,05$) apenas para o tempo de incubação 12 horas. Do mesmo modo, a variação da degradação desta fração após a suplementação, em unidades percentuais, foi menor após 36 h de incubação.

No trabalho de Guedes *et al.* (2008), onde foram estudadas 40 amostras de silagem de milho, foi observado que o efeito da suplementação com levedura SC foi muito mais acentuado nas amostras de baixa degradação da fração NDF (36 h incubação: $<30\%$) do que nas amostras de alta degradação da fração NDF (36 h incubação: $>30\%$). Esta observação foi confirmada por Chaucheyras-Durand *et al.*, (2015) quando incubaram vários subprodutos utilizados em alimentação de vacas leiteiras. No nosso trabalho, a degradação da fração NDF após 36h de incubação foi, em média, de 49,3% e o aumento médio de degradação, após a suplementação com SC, foi de 1,4 unidades percentuais. Este valor situa-se dentro do grupo definido por Guedes *et al.*, (2008), como “alta degradação”, que sofreu um aumento na degradação da fração NDF de 1,8 unidades percentuais.

Acrescenta-se ainda que, de acordo com os resultados de Rocha (2015), nos mesmos animais alimentados com as mesmas dietas não acidogénicas, a suplementação com SC não afetou significativamente os parâmetros de fermentação ruminal, com exceção da concentração de acetato, que diminui com a adição de SC, apesar de alguns parâmetros de fermentação terem apresentado quantitativamente, ligeiras melhorias com adição de SC.

3.5. Conclusões

Os resultados deste trabalho permitem-nos concluir que a adição de SC a uma dieta, com silagem de milho como forragem base, fornecida a vacas não lactantes não provocou aumento significativo da degradação *in sacco* da fração NDF das silagens de milho após 12, 24 e 36 h de incubação. Acrescenta-se ainda que, este estudo suporta o conceito de que o efeito da suplementação com SC depende da degradabilidade potencial da silagem, ou seja, está de acordo com o anteriormente observado por Guedes *et al.* (2008) e por Chaucheyras-Durand *et al.*, (2015).

BIBLIOGRAFIA

IV. BIBLIOGRAFIA

- Agricultural and Food Research Council, (1993). Energy and protein requirements of ruminants. An advisory manual prepared by the AFRC technical Committee on response to Nutrients, CAB International, Wallingford, UK.
- Anpromis. (2015). 8º Colóquio Nacional do Milho. *Anpromis*. Ponta Delgada, Açores. Retirado de www.anpromis.pt
- AOAC, (1990). Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemist, 16th ed. Association of Official Analytical Chemist, Arlington, VA, USA.
- Arambel, M.J. e Kent, B.A. (1988). Effect of yeast culture on milk production response and apparent nutrient digestibility in early lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 71 (Suppl 1), 220.
- Arambel, M.J., Kent, B.A. e Walters, J.L. (1990). Effect of graded levels of dried fermentation extract and cellulase enzyme on fermentation characteristics of nonlactating holstein heifers. *J. Dairy Sci.* 73 (Suppl 1), 236.
- Batt, C. A. e Tortorello, M. Lou. (2014). *Encyclopedia of Food Microbiology. Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)*.
- Bitencourt, L. L., Silva, J. R. M., Lopes de Oliveira, B. M., Júnior, G. S. D., Lopes, F., Júnior, S. S., Zacaroni, Ozana de Fátima e Pereira, M. N. (2011). Diet digestability and performance of dairy cows supplemented with live yeast. *Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.)*, 68(3), 301–307.
- Brossard, L., Chaucheyras-Durand, F., Michalet-Doreau, B. e Martin, C. (2006). Dose effect of live yeasts on rumen microbial communities and fermentations during butyric latent acidosis in sheep: new type of interaction. *Animal Science*, 82(2006), 829. <http://doi.org/10.1017/ASC200693>
- Campanile, G., Zicarelli, F., Vecchio, D., Pacelli, C., Neglia, G., Balestrieri, A., Di Palo, R. e Infascelli, F. (2008). Effects of *Saccharomyces cerevisiae* on in vivo organic matter digestibility and milk yield in buffalo cows. *Livestock Science*, 114, 358–361. <http://doi.org/10.1016/j.livsci.2007.11.002>

Bibliografia

- Chaucheyras-Durand, F., Ameilbonne, A., Bichat, A., Mosoni, P., Ossa, F. e Forano, E., 2015. Live yeasts enhance fibre degradation in the cow rumen through an increase in plant substrate colonization by fibrolytic bacteria and fungi. *J. Applied Microbiology*, 120, 560-570.
- Chaucheyras, F., Fonty, G., Bertin, G., Salmon, J. M. e Gouet, P. (1996). Effects of a strain of *Saccharomyces cerevisiae* (Levucell SC1), a microbial additive for ruminants, on lactate metabolism *in vitro*. *Canadian Journal of Microbiology*, 42(9), 927–33. <http://doi.org/10.1139/m96-119>
- Chaucheyras-Durand, F., Chevaux, E., Martin, C. e Forano, E. (2012). Use of Yeast Probiotics in Ruminants: Effects and Mechanisms of Action on Rumen pH, Fibre Degradation, and Microbiota According to the Diet. *Probiotic in Animals*, 119–162. <http://doi.org/10.5772/50192>
- Chaucheyras-Durand, F. e Fonty, G. (2001). Establishment of cellulolytic bacteria and development of fermentative activities in the rumen of gnotobiotically-reared lambs receiving the microbial additive *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-1077. *Reproduction Nutrition Development*, 41(1), 57–68.
- Chaucheyras-Durand, F. e Fonty, G. (2002). Influence of a Probiotic Yeast (*Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-1077) on Microbial Colonization and Fermentations in the Rumen of Newborn Lambs. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 14(1), 30–36. <http://doi.org/10.1080/089106002760002739>
- Chaucheyras-Durand, F., Walker, N. D. e Bach, A. (2008). Effects of active dry yeasts on the rumen microbial ecosystem: Past, present and future. *Animal Feed Science and Technology*, 145(1–4), 5–26. <http://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.04.019>
- Chadema, I. e Offer, N.W. (1990). The effect of dietary inclusion of yeast culture on digestion in the sheep. *Anim. Prod.*, 50:483:489.
- Denev, S. A., Peeva, T., Radulova, P., Stancheva, N. e Staykova, G. (2007). Yeast Cultures in Ruminant Nutrition. *Bulgarian Journal of Agricultural Science* 13, 357–374.
- Ding, Gengzhi; Chang, Ying; Zhao, Liping; Zhou, Zhenming; Ren, Liping e Meng, Q. (2014). Effect of S.C. on alfalfa nutrient degradation characteristics and rumen

- microbial populations of steers. *World Journal of Agricultural Research*, 2(6), 303-308. <http://doi.org/10.12691/wjar-2-6-10>
- Ding, G., Chang, Y., Zhou, Z., Ren, L. e Meng, Q. (2014). Effect of *Saccharomyces cerevisiae* on Rumen Fermentation Characteristics , Nutrient Degradation and Cellulase Activity of Steers Fed Diets with Different Concentrate to Forage Ratios. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 5(1), 1-9. <http://doi.org/10.1186/2049-1891-5-24>
- Dolezal, P., Dvoracek, J., Dolezal, J., Cermáková, J., Zeman, L. e Szwedziak, K. (2011). Effect of feeding yeast cultures on ruminal fermentation and blood indicators of Holstein dairy cows. *Journal of the University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences in Brno, Czech Republic*, 80, 139–145. Retirado de <http://actavet.vfu.cz/80/2/0139/>
- Erasmus, L.J., Botha, P.M. e Kistner, A. (1992). Effects of yeast culture supplement on production, rumen fermentation and duodenal nitrogen flow in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 75, 3056-3065.
- FEDIPEDIA (2016). <http://www.feedipedia.org/content/feeds?category=13593>. Consultado em Maio.
- FEDNA (2016). <http://www.fundacionfedna.org/tablas-fedna-composicion-alimentos-valor-nutritivo>. Consultado em Maio.
- Fernando, S. C., Li, H. T. P., Najar, F. Z., Sukharnikov, L. O., Krehbiel, C. R., Nagaraja, T. G., Roe, B. A. e Desilva, U. (2010). Rumen Microbial Population Dynamics during Adaptation to a High-Grain Diet. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(22), 7482–7490. <http://doi.org/10.1128/AEM.00388-10>
- Fondevila, M., Newbold, C.J., Hotten, P.M. e Ørskov, E.R. (1990). A note on the effect of *Aspergillus oryzae* fermentation extract on the rumen fermentation of sheep fed straw. *Anim. Prod.* 51, 422-425.
- Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *The Journal of Applied Bacteriology*, 66(5), 365–378. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1989.tb05105.x>
- Gaggia, F., Mattarelli, P. e Biavati, B. (2010). Probiotics and prebiotics in animal feeding

Bibliografia

- for safe food production. *International Journal of Food Microbiology*, 141, S15–S28.
<http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.02.031>
- Ghazanfar, S., Anjum, M. I., Azim, A., e Ahmed, I. (2015). Effects of dietary supplementation of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) culture on growth performance, blood parameters, nutrient digestibility and fecal flora of dairy heifers. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 25(1), 53–59.
- Gomes, M., 1994. *Fermentação no rúmen e metabolismo em ruminantes. Desenvolvimentos recentes na sua manipulação*. Trabalho de síntese apresentado para provas de aptidão pedagógica e capacidade científica. UTAD, Vila Real, 1994.
- Gomez-Alarcon, R A., D. Dudas e I. T. Huber. (1990). Influence of *Aspergillus oryzae* on rumen and total tract digestion of dietary components. *J. Dairy Sci.* 73: 703.
- Gomez-Alarcon, R A., Olivera, J. S. e Huber, J. T. (1988). Effect of *Aspergillus oryzae* on *in vitro* and *in situ* rumen fermentation. *J. Anim Sci.*, 66 (Suppl 1), 638.
- Guedes, C.M. e Dias-da-Silva, A. (1994). Effects of fish meal supplementation on the digestion and rumen degradation of ammoniated wheat straw. *Ann. Zootech.* 43, 333–340.
- Guedes, C. M., Rodrigues, M. A. M. e Dias-da-Silva, A. (2008). Effect of a S.C. yeast on ruminal fermentation and fibre degradation of maize silages in cows. *Animal Feed Science and Technology*, 145, 27–40.
- Harrison, G.A., Hemken, R.W., Dawson, K.A., Harmon, R.J., Barker, K.B., 1988. Influence of addition of yeast culture supplement to diets of lactating dairy cows on ruminal function and microbial populations. *J. Dairy Sci.* 71, 2967–2972.
- Jones, C. M., Heinrichs, A. J., Roth, G. W. e Ishler, V. A. (2004). From harvest to feed: Understanding silage management.
- Jouany, J. P. e Morgavi, D. P. (2007). Use of “natural” products as alternatives to antibiotic feed additives in ruminant production. *Animal*, 1(10), 1443–1466.
<http://doi.org/10.1017/S1751731107000742>
- Kirchof, B. (s.d.). Alimentação da vaca leiteira.

- Lascano, G. J., Zanton, G. I. e Heinrichs, A. J. (2009). Effect of limit feeding high- and low-concentrate diets with *Saccharomyces cerevisiae* on digestibility and on dairy heifer growth. *Journal of Dairy Science*, 92(10), 5100–5110. <http://doi.org/10.3168/jds.2009-2177>
- Lee, C. (2013). *COOPERATIVE EXTENSION SERVICE UNIVERSITY OF KENTUCKY COLLEGE OF AGRICULTURE, FOOD AND ENVIRONMENT*. Corn for Grain & Silage. Kentucky: University of Kentucky. Retirado de <http://www.uky.edu/Ag/CCD/introsheets/corn.pdf>
- Lopuszanska-Rusev, M. e Bilik, K. (2011). Fibrolytic enzymes and live yeast cultures in rations for dairy cows.pdf. *Animal Science*, 11(3), 393–403.
- Lynch, H.A. e Martin, S.A. (2002). Effects of *Saccharomyces cerevisiae* culture and *Saccharomyces cerevisiae* live cells on *in vitro* mixed ruminal microorganisms fermentation. *J. Dairy Sci.*, 85, 2603-2608.
- Marden, J. P., Julien, C., Monteils, V., Auclair, E., Moncoulon, R. e Bayourthe, C. (2008). How Does Live Yeast Differ from Sodium Bicarbonate to Stabilize Ruminal pH in High-Yielding Dairy Cows? *Journal of Dairy Science*, 91(9), 3528–3535. <http://doi.org/10.3168/jds.2007-0889>
- Martin, S. A. e Nisbet, D. J. (1992). Effect of Direct-Fed Microbials on Rumen Microbial Fermentation. *Journal of Animal Science*, 75, 1736–1744. [http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(92\)77932-6](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(92)77932-6)
- Mathieu, F., J. P. Jouany, J. Senaud, J. Bohatier, G. Bertin e M. Mercier (1996). The effects of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* on fermentations in the rumen of faunated and defaunated sheep; protozoal and probiotic interactions. *Reprod. Nutr. Dev.* 36, 271-287.
- McGinn, S.M., Beauchemin, K.A., Coates, T. e Colombatto, D. (2004). Methane emissions from beef cattle: Effects of monensin, sunflower oil, enzymes, yeast, and fumaric acid. *J. Anim. Sci.*, 82: 3346-3366.
- Moallem, U., Lehrer, H., Livshitz, L., Zachut, M. e Yakoby, S. (2009). The effects of live yeast supplementation to dairy cows during the hot season on production, feed

Bibliografia

- efficiency, and digestibility. *Journal of Dairy Science*, 92(1), 343–351. <http://doi.org/10.3168/jds.2007-0839>
- Mosoni, P., Chaucheyras-Durand, F., Béra-Maillet, C. e Forano, E. (2007). Quantification by real-time PCR of cellulolytic bacteria in the rumen of sheep after supplementation of a forage diet with readily fermentable carbohydrates: effect of a yeast additive. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 2676–2685. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03517.x>
- Newbold, C. J. (1996). Probiotics for ruminants. 45(Suppl 1), 329–335. Retirado de <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00889646>
- Newbold, C.J. e Rode, L.M. (2006). Dietary additives to control methanogenesis in the rumen. In ‘Greenhouse gases and animal agriculture: an update’. Elsevier International Congress Series 1293. pp. 138-147.
- Newbold, C. J., Wallace, R. J. e McIntosh, F. M. (1996). Mode of action of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a feed additive for ruminants. *British Journal of Nutrition*, 76(1 996), 249–261.
- NRC (2001). Nutrient Requirements of Dairy Cattle, 7th Edition, The National Academic Press, USA, 381pp.
- Oellerman, S. O., Arambel, M. J., Kent, B. A. e Walters, J. L., (1990). Effects of grades amounts of *Aspergillus orizae* fermentation extract on ruminal characteristics and nutrient digestibility in cattle. *J. DSairy Sci.* 736; 2412-2416.
- Oliveira, B. M. L., Bitencourt, L. L., Silva, J. R. M., Dias Júnior, G. S., Branco, I. C. C., Pereira, R. A. N. e Pereira, M. N. (2008). Suplementação de vacas leiteiras com *Saccharomyces cerevisiae* cepa KA500. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 62(5), 1174–1182. Retirado de http://www.livrosgratis.com.br/arquivos_livros/cp067806.pdf
- Ørskov, E.R., Ded Hovell, F.D., Mould, F. (1980). The use of the nylon bag technique for the evaluation of feedstuffs. *Trop. Anim. Prod.* 5, 195-213.
- Petri, R. M., Schwaiger, T., Penner, G. B., Beauchemin, K. A., Forster, R. J., Mckinnon, J. J. e Mcallister, T. A. (2013). Characterization of the Core Rumen Microbiome in Cattle during Transition from Forage to Concentrate as Well as during and after an

- Acidotic Challenge, 8(12). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0083424>
- Putnam, D.E., Schwab, C.G., Socha, M.T., Whitehouse, N.L., Kierstead, N.A. e Garthwaite, B.D. (1997). Effect of yeast culture in the diets of early lactation dairy cows on ruminal fermentation and passage of nitrogen fractions and amino acids to the small intestine. *J Dairy Sci* 80, 374-384.
- Reis, R. A., Jucileia, A., Moraes, S. e Siqueira, G. R. (2006). Aditivos Alternativos Para a Alimentação De Ruminantes. In *II Congresso Latino-Americano de Nutrição Animal (II CLANA)* (pp. 1–40). São Paulo, Brasil.
- Rocha, Ana (2015). Monitorização do pH e modulação da fermentação ruminal com *Saccharomyces cerevisiae* em vacas leiteiras. Dissertação de Mestrado, UTAD, Vila Real, 34-47.
- Robertson, J.B., Van Soest, P.J. (1981). The detergent system of analysis and its application to human food. *The Analysis of Dietary Fiber in Food*. Eds. W.P.T. James e O. Theander, marcel Dekker Inc., New York, 123-138.
- Robinson, P. H. (2010). *Yeast Products for Growing and Lactating Ruminants: A Literature Summary of Impacts on Rumen Fermentation and Performance* (No. 95616). Davis, CA.
- Rodrigues, A., Guimarães, J. e Oliveira, C. (2012). Rentabilidade das explorações leiteiras em Portugal-dados técnicos e económicos. *V Jornadas de Bovinicultura*, 129, 109–129. Retirado de <http://repositorio.ipcb.pt/handle/10400.11/1239>
- Rossi, F., Di Luccia, A., Vincenti, D. e Cocconcelli, P. (2004). Effects of peptidic fractions from *Saccharomyces cerevisiae* culture on growth and metabolism of the ruminal bacteria *Megasphaera elsdenii*. *Anim. Res.*, 53, 177–186. Retirado de www.edpsciences.org
- Roth, G. W. e Heinrichs, A. J. (2001). *Corn silage production and management. Penn State Extension*. Retirado de http://extension.psu.edu/plants/crops/grains/corn/silage/corn-silage-production-and-management/extension_publication_file
- Schroeder, J. W. (2004). Forage Nutrition for Ruminants. Retirado de <https://www.ag.ndsu.edu>

Bibliografia

- Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74, 3583-3597.
- Vohra, A., Syal, P. e Madan, A. (2016). Probiotic yeasts in livestock sector. *Animal Feed Science and Technology*, 219, 31–47.
- Wallace, R. J. (1994). Ruminant Microbiology , Biotechnology , and Ruminant Nutrition : Progress and Problems. *Journal of Animal Science*, 72, 2992–3003.
- Wallace, R. J. (1996). The mode of action of a yeast culture in modifying rumen fermentation. Em: *Biotechnology in the Feed Industry*. Proceeding of Alltech's 12th Annual Symposium, Alltech Inc.
- Wallace, R. J., Newbold, C. J. (1992). Rumen fermentation and its manipulation. The development of yeast cultures as feed additives. In *Biotechnology in the Feed Industry*. Ed. T.P Lions, Alltech Technical Publications, Nicholasville, Kentucky, pp 173-192.
- Wallace, R. J. e Newbold, C. J. (1995). Microbial feed additives for ruminants, 125, 101–125.
- Wiedmeier, R.D., Arambel, M.J. e Wlaters, J.L. (1987). Effects of yeast culture and *Aspergillus orizae* fermentation extract on ruminal characteristics and nutrient digestibility. *J. Dairy Sci.* 70, 2063-2068
- Williams, P. E. V., Tait, C. A. G., Innes, G. M. e Newbold, C. J. (1991). 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*, 69, 3016–3026.
- Wohlt, J. E., Corcione, T. T. e Zajac, P. K. (1998). Effect of yeast on feed intake and performance of cows fed diets based on corn silage during early lactation. *Journal of Dairy Science*, 81(5), 1345–1352. [http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75697-8](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75697-8)
- Yalç, S., Yalç, S., Can, P., Gürdal, A. O., Ba, C. e Eltan, Ö. (2011). The Nutritive Value of Live Yeast Culture (*Saccharomyces cerevisiae*) and Its Effect on Milk Yield , Milk Composition and Some Blood Parameters of Dairy Cows. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 24(10), 1377–1385.

