



Estabilidade xilanásica no rúmen e digestibilidade *in vitro* de volumosos tratados com extrato enzimático de *Aspergillus niveus*¹

Xylanase stability inside de rúmen and *in vitro* digestibility of different food treated with enzymatic extract from *Aspergillus niveus*

Simone de Carvalho Peixoto Nogueira², Liandra Bertpágia³, Giovana da Silva Leandro², Ricardo Andrade Reis³, João Atílio Jorge², Maria de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli¹

¹ Projeto financiado pelo CNPq. Esses resultados são parte da tese intitulada Produção, propriedades bioquímicas e funcionais do sistema xilanolítico de *Aspergilli* e aplicação biotecnológica no branqueamento da polpa de celulose e em ração animal. Tese apresentada ao Departamento de Bioquímica e Imunologia da FMRP.

² Departamento de Biologia - Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto - SP, Brasil.

³ Departamento de Ciência Animal, Universidade Estadual Paulista (UNESP), São Paulo-SP, Brasil.

* Autora correspondente - Tel./fax: +55 16 3639-3624. E-mail: polizeli@ffclrp.usp.br.

Resumo: O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da adição de xilanases sobre a digestibilidade *in vitro* de diferentes volumosos, bem como a estabilidade enzimática no ambiente ruminal. As xilanases utilizadas neste estudo foram obtidas a partir do cultivo de *Aspergillus niveus* em meio líquido mínimo Czapeck, suplementado com farelo de trigo 1%, a 40°C, condições estáticas, por 120 horas. Na avaliação da digestibilidade *in vitro* foram utilizados como volumosos feno de alfafa (*Medicago sativa*), feno de capim-jaraguá (*Hyparrhenia rufa*), capim-Marandu (*Brachiaria brizantha* cv. Marandu) e silagem de milho, sendo os níveis de xilanase testados de 100, 200 e 400 U totais. Testou-se a estabilidade enzimática nas condições ruminais em seis cabras canuladas da raça Saanen com adição de 1000U totais de xilanase, e procederam as amostragens periodicamente até 8 horas. Nos testes *in vitro* houve um aumento de 6,0-33,6% da digestibilidade e, nos testes *in vivo*, as xilanases de *A. niveus* mantiveram-se estáveis por até 8 horas dentro do rúmen de caprinos. Ressalta-se ainda que o extrato enzimático de *A. niveus* não apresentou nenhum caráter citotóxico.

Palavras-chave: aditivos em rações, enzimas exógenas

Abstract: The aim of this study was to evaluate the effects of xylanases addition on digestibility *in vitro* using different forages, and evaluate enzymatic stability inside the rumen. The xylanases used were obtained from *Aspergillus niveus* cultivation on Czapeck minimum liquid medium supplemented with 1% wheat bran, 40 °C, on static conditions, during 120 hours. To evaluate the *in vitro* digestibility it was used alfalfa (*Medicago sativa*), jaragua grass (*Hyparrhenia rufa*) hays, Marandu grass (*Brachiaria brizantha* cv. Marandu) and corn silage as feeds. The xylanase levels used were 100, 200 and 400 total U. The *in vitro* tests, it was noticed an improvement in

digestibility from 6.0-33.6% and *in vivo* tests, it was used 1000 total U of xylanases from *A. niveus* which remained stable up to 8 hours inside the rumen of goats. We still emphasize that the crude extract from *A. niveus* also did not presented any cytotoxic character.

Key words: animal feed additive, exogenous enzymes

* Autora correspondente - Tel./fax: +55 16 3639-3624. E-mail: polizeli@ffclrp.usp.br.
Recebido em 20.03.2013. Aceito em 10.05.2013

Introdução

Enzimas exógenas têm sido aplicadas em ruminantes para melhorar a digestibilidade da forragem e, conseqüentemente, o consumo voluntário dos volumosos. As respostas obtidas têm sido positivas – melhora de digestibilidade e desempenho animal (QUEIROZ et al., 2004, SALES et al., 2002 a,b,c).

Segundo QUEIROZ et al. (2004) o aditivo à base de enzima é caracterizado pelo extrato enzimático concentrado produzido por fermentação fúngica e/ou bacteriana.

Fisiologicamente, existe

uma série de possíveis modos de ação das enzimas exógenas e, conforme descrito, esses efeitos podem ser tão simples como a liberação de carboidratos solúveis ou tão complexos como a remoção de íons de barreiras estruturais à absorção de nutrientes (BEAUCHEMIN et al., 2002). O grau de liberação dependerá do tipo de alimento e do tipo de enzima utilizada. Neste tipo de aplicação biotecnológica o objetivo é que a enzima adicionada trabalhe em conjunto com os microrganismos presentes no rúmen ajudando na liberação de açúcares e outros componentes dos carboidratos

complexos.

As xilanases têm importante papel na degradação de carboidratos hemicelulósicos do alimento, fornecendo açúcares menores para as bactérias presentes no rúmen. Na presença desses xilooligossacarídeos, rapidamente assimiláveis, há uma maior e mais rápida proliferação das bactérias do rúmen aumentando a eficiência do processo de digestão (LOURES, 2004).

Fungos do gênero *Aspergillus* são considerados bons produtores de xilanase utilizada na indústria de alimentos para animais. Os fungos apresentam destacada importância na digestão da fibra, já que penetram na cutícula e na parede celular dos tecidos lignificados. No rúmen, os fungos da flora ruminal atuam de modo semelhante. A adição de xilanases pode, até mesmo, alterar as atividades fisiológicas da população bacteriana ruminal (COLOMBATTO et al., 2003b). Assim, é comum observar

aumento na produção de propionato e butirato e menos acetato e metano, resultantes do emprego de enzimas fibrolíticas (EUN & BEAUCHEMIN, 2007) e melhorar na digestibilidade do alimento. Outra vantagem na adição de enzimas é a redução na liberação de gás metano, uma vez que este, juntamente com o CO₂ é um dos principais gases responsáveis pelo efeito estufa (RIVERA et al., 2010).

Neste contexto os objetivos deste trabalho foram adicionar xilanases de *Aspergillus niveus* na presença de diferentes volumosos *in vitro* para verificar seu efeito sobre a digestibilidade, além de analisar a estabilidade das enzimas em condições ruminais (*in vivo*) e o caráter citotóxico do extrato enzimático.

Material e Métodos

O fungo *Aspergillus niveus* foi mantido em meio sólido de aveia (Emerson, 1941), a 30°C durante 5 a 7 dias e, posteriormente, armazenadas à

4°C. Para produção de xilanases *A. niveus* foi cultivado em meio líquido conforme descrito por PEIXOTO-NOGUEIRA et al. (2009) contendo NaNO₃ 0,3%, KH₂PO₄ 0,1%, MgSO₄.7H₂O 0,05% e KCl 0,05%, suplementado com farelo de trigo 1% como fonte de carbono. Em cada meio foram inoculados 1,5.10¹⁰ esporos/mL de meio. Após crescimento nas condições padronizadas, as culturas foram filtradas a vácuo com auxílio de um funil de Büchner e papel de filtro, sendo o filtrado utilizado para os ensaios enzimáticos e experimentação animal.

As atividades xilanolítica, amilolítica, poligalacturonásica e celulolítica foram mensuradas utilizando-se, respectivamente, os substratos xilana, amido, polipectato de sódio e CM-celulose. Verificou-se a formação de açúcares redutores pelo método de Miller que utiliza ácido 3',5'-dinitrosalicílico (MILLER, 1959).

A mistura da reação foi composta de 0,2 mL de solução de substrato 1% (p/v) em tampão citrato-fosfato, pH 5,5 e 0,2 mL do extrato enzimático. As reações foram realizadas a 65°C. As leituras espectrofotométricas foram realizadas a 540nm, utilizando-se curvas padrões de xilose, glicose e ácido monogalacturônico (0 – 1 mg/mL) para xilanase, amilase ou celulase e poligalacturonase, respectivamente. A unidade de atividade enzimática foi definida como sendo a quantidade de enzima capaz de liberar 1µmol de açúcares redutores por minuto.

Para a avaliação da concentração de enzima, empregou-se o método de avaliação da digestibilidade *in vitro* segundo Tilley & Terry (1963) adicionando-se 16mL de enzima (equivalente a 400 U totais) em diferentes diluições.

O processo de digestão consistiu em duas etapas, primeiramente, houve uma fermentação

anaeróbia do líquido ruminal onde se adicionaram 5 mL do líquido ruminal, as diferentes quantidades de enzima testadas (100, 200 e 400 U totais), 40 mL solução tampão (saliva artificial McDougall – composta por NaHCO_3 9,8 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 7 g, KCl 0,57 g, NaCl 0,47 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,12 g, CaCl_2 0,04 g e uréia 0,2 a 0,8 g dependendo do volumoso testado) e 0,5 g dos volumosos analisados.

Todas as misturas foram incubadas a 39°C, pH 6,9, por 48 horas. Posteriormente, promoveu-se a digestão com 2 mL de HCl 40% e de 5 mL de solução aquosa de pepsina a 4,0% (atividade de 1:10.000), por 24 horas em estufa bacteriológica, simulando a digestão ácida que ocorre no estômago verdadeiro do ruminante. A quantidade de matéria seca ou matéria orgânica dos alimentos foi medida inicialmente, possibilitando a determinação da quantidade de forragem que desapareceu após os dois estágios, que

foi considerada como tendo sido digerida. O líquido ruminal utilizado foi obtido de um bovino da raça Nelore, macho, castrado, de aproximadamente 450 kg, cirurgicamente fistulado no rúmen e mantido em pasto de capim *Braquiaria brizantha*. Após coleta o líquido foi filtrado em quatro camadas de gaze sendo, a fração obtida usada para os experimentos de digestibilidade.

Os volumosos testados foram feno de alfafa (*Medicago sativa*), feno de capim-jaraguá (*Hyparrhenia rufa*), capim-Marandu (*Brachiaria brizantha* cv. Marandu) e silagem de milho. As forragens foram previamente secas em estufa de circulação forçada de ar a 55 °C e processadas em moinho Willey dotado de peneira com abertura de malha de 1 mm. Utilizaram-se seis cabras, da raça Saanen, fêmeas fistuladas no rúmen e alimentadas com dieta à base de silagem de milho. Adicionou, diretamente no rúmen dos animais, 1000 U totais de xilanase.

Foram colhidas amostras de líquido ruminal a cada hora por um período total de 8 horas, para observação dos níveis de atividade xilanásica presentes no líquido ruminal.

Para determinar o potencial citotóxico do extrato enzimático produzido por *A. niveus* utilizou-se linfócitos humanos para as análises. Neste experimento $\pm 10^6$ células foram semeadas e tratadas com o extrato bruto de *A. niveus* durante 24 horas. Após o tratamento, as células tratadas foram soltas por tripsinização e quantificadas em câmara de Neubauer. Foram semeadas 300 dessas células em frasco de cultivo (25 cm²). O mesmo procedimento foi realizado com os controles (+) e (-) que constituíram, respectivamente, em células que não passaram por nenhum tratamento (receberam apenas solução salina) ou células previamente tratadas com cisplatina (um quimioterápico que

provoca morte celular e impede a multiplicação dos linfócitos semeados). Os experimentos duraram em média 10-15 dias, sendo os frascos observados diariamente com o auxílio de um microscópio de luz com objetiva invertida. Decorrido o período de cultivo, realizou-se a contagem das colônias formadas nos controles (+), (-) e nas culturas tratadas com os extratos fúngicos. Para a realização das contagens as colônias foram coradas com 5 mL de corante Giemsa diluído em tampão fosfato (1:20 – v/v). Após a coloração os frascos foram lavados para a retirada do excesso de corante. Considerou-se na contagem aquelas colônias com mais de 50 células (aumento 16X). Para o cálculo de determinação das frações de sobrevivência (FS), considerou-se 100% o número de colônias contadas no grupo controle (+). O controle (-) não deveria ter células.

Portanto: $FS = (n^\circ \text{ de colônias contadas em cada tratamento}/n^\circ \text{ de colônias observadas no controle (+)}) \times 100$.

Todos os experimentos foram realizados de três vezes para a confirmação dos resultados obtidos e um desvio padrão foi determinado para todos os resultados.

Resultados e Discussão

Os efeitos positivos obtidos com a adição de enzimas à alimentação animal dependem das características da enzima (pH e temperatura de reação, estabilidade química ou térmica e estabilidade às condições ruminais) também das características e composição das forragens, cujos constituintes da parede celular apresentam uma matriz complexa contendo interações dos polímeros, ligações do tipo éster e éter e proporções de siringil, guaiacil e hidroxicinamil na fração da lignina. São estas estruturas que definem a

habilidade dos microrganismos do trato digestivo dos ruminantes em digerir a parede celular, bem como das enzimas adicionadas atuarem melhorando ou não o aproveitamento dos nutrientes. Quando se trata de forragens de clima tropical, comparada às forragens de clima temperado, normalmente apresentam qualidade nutricional inferior em função da maior proporção de parede celular espessa (esclerênquima, feixes vasculares) com maior conteúdo de lignina, e menores teores de proteína, acarretando assim, em uma menor digestibilidade. Assim, a lignificação da parede celular vegetal e as ligações químicas da lignina e compostos fenólicos aos polissacarídeos limitam a digestão da fibra.

As enzimas xilanolíticas produzidas por *Aspergillus niveus* foram obtidas conforme PEIXOTO-NOGUEIRA et al. (2009) utilizando-se farelo de trigo como fonte de carbono. Neste extrato, além das xilanases que

foram nosso foco de estudo, outras hidrolases foram produzidas pelo microrganismo (Tabela 1) e provavelmente também atuaram na parede celular vegetal influenciando no

aumento da digestibilidade. Enzimas celulolíticas e amilolíticas também tiveram sua atividade determinada, entretanto, não se detectou níveis significativos das mesmas.

Tabela 1. Enzimas presentes no extrato enzimático produzido por *Aspergillus niveus*.

ENZIMA	U/mL
Xilanase	25,0
Poligalacturonase	8,3

Aspergillus niveus foi cultivado nas condições descritas por Peixoto-Nogueira et al. (2009).

Antes de iniciarmos os estudos sobre o efeito do extrato enzimático de *A. niveus* na digestibilidade do alimento em ruminantes, este foi testado quanto à sua citotoxicidade. Não se observou desenvolvimento de colônias apenas nos controles (-) onde os linfócitos foram previamente tratados com cisplatina (droga quimioterápica). Já no controle (+) onde as células não foram tratadas com nenhuma droga ou extrato fúngico, observou-se multiplicação dos linfócitos semeados. Nos linfócitos tratados com 25, 50 e 100µM de extrato bruto de *A.*

niveus, o número de colônias formadas foi semelhante ao controle (+) (Figura 1), o que significa que os extratos brutos produzidos não apresentaram um caráter citotóxico para células humanas uma vez que não provocaram, nem mesmo em menor proporção que a cisplatina, qualquer efeito maléfico ao crescimento celular.

Crescentes quantidades de xilanase (100, 200 e 400 U totais) foram testadas com os volumosos feno de alfafa, capim Jaraguá, capim *Brachiaria brizantha* e silagem de milho.

Observou-se maior digestibilidade da matéria orgânica, quando os volumosos receberam a xilanase de *A. niveus*, em comparação às amostras não tratadas com o extrato enzimático (Tabela 2). No feno de alfafa, o melhor resultado foi com a adição de 400U de enzima onde a digestibilidade foi 10,8% maior em relação ao controle. Já no capim braquiária, o resultado mais satisfatório correspondeu a uma digestibilidade 6,0% maior com a adição de apenas 100 U de xilanase, em comparação ao controle. No feno de capim Jaraguá, o

aumento da digestibilidade foi em média 33,6%, independente da quantidade de xilanase adicionada. Na silagem de milho, o aumento na digestibilidade foi de 6,2% com a adição de 100 ou 200 U de xilanase em comparação ao controle. Assim, observou-se que o tratamento foi satisfatório após a adição de xilanase em todos os volumosos. A diferença entre os resultados obtidos em cada um dos alimentos deveu-se, provavelmente, à diferença na composição entre os diferentes alimentos testados.

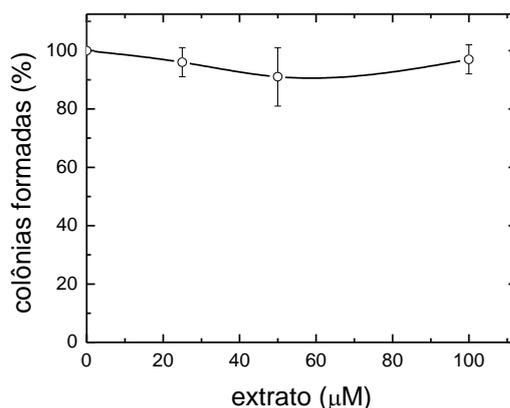


Figura 1. Determinação da citotoxicidade do extrato bruto de *Aspergillus niveus*. Erro padrão variando de $\pm 0,004$.

A adição de xilanase nos volumosos provocou aumento na digestibilidade porque, ao atuarem na xilana presente na parede das células vegetais, houve a liberação de xilooligossacarídeos, açúcares menores e, portanto, mais facilmente assimiláveis. Esses açúcares foram mais rapidamente assimilados pela microbiota presente no rúmen bovino. Quanto maior a proliferação desses microrganismos, maior a quantidade de enzimas (como as celulasas) produzidas por eles e, por isso, ocorreu aumento na velocidade da digestão (melhor digestão).

Esses resultados estão de acordo com os encontrados na literatura

como, por exemplo, os de MARTINS (2003) e QUEIROZ et al. (2004) que observaram aumento 4,0% na digestibilidade de volumosos em resposta a aplicação de enzimas. Há também trabalhos cujos resultados para este tipo de teste *in vitro* foram semelhantes ou até mais promissores (COLOMBATTO et al., 2003a).

Entretanto, a enzima exógena utilizada foi um produto comercial, cujo custo é geralmente elevado em comparação ao produto testado, genuinamente nacional, e que pode ser obtido a partir do cultivo de *A. niveus* em resíduos agroindustriais.

Tabela 2. Digestibilidade *in vitro* (%) de diferentes volumosos na presença de xilanases produzidas por *Aspergillus niveus*.

VOLUMOSO	SEM ENZIMA	100U	200U	400U
Feno alfafa	53,0	61,0	61,8	63,8
Capim braquiária	51,6	57,3	55,4	54,5
Feno Jaraguá	20,8	27,8	27,8	27,8
Silagem de milho	56,8	60,3	60,3	59,9

O fungo *Aspergillus niveus* foi cultivado nas condições descritas em Peixoto-Nogueira et al. (2009). Erro padrão variando de $\pm 0,0013$.

Observando-se a Figura 2A, vê-se que a atividade de xilanase nos animais tratados com a enzima foi maior do que naqueles não tratados durante a maior parte do tempo de avaliação. Somente após sete horas de enquanto dos não tratados começaram a aumentar. O mesmo quadro pode ser observado, ao se fazer uma relação entre os níveis de xilanase presentes nos animais tratados e não tratados com xilanase (Figura 2B) ou quando se faz a diferença entre os níveis da enzima presentes nos animais tratados e não tratados (Figura 2C).

No início do experimento, a quantidade de xilanase presente nos animais tratados era maior porque eles acabaram de receber o extrato enzimático contendo a xilanase de *Aspergillus niveus* (Figura 2). Após meia hora de experimento, a quantidade de xilanase ainda permaneceu maior nos animais tratados, entretanto se observou

tratamento, as quantidades de xilanase daqueles que não receberam a enzima atingiram níveis semelhantes aos dos animais tratados. Passadas 8 horas de tratamento, os níveis enzimáticos dos animais tratados começaram a decair, uma grande redução da atividade nestes e no controle, uma vez que as cabras receberam a alimentação e a enzima acabou sendo diluída dentro do rúmen.

Verificou-se que a enzima estava presente no rúmen mesmo após 7 horas de sua administração. Assim, pode-se afirmar que o extrato bruto, contendo as xilanases produzidas por *A. niveus*, foi estável às condições ruminais e, provavelmente, se rotineiramente adicionado à alimentação, ocasionará um aumento na digestibilidade da fração fibrosa dos alimentos, e conseqüentemente no desempenho desses animais em relação ao ganho de peso, produção de leite, conforme observado por QUEIROZ et

al. (2004).

Os resultados obtidos com xilanases de *A. niveus* foram bastante promissores para o tratamento de volumosos utilizados na alimentação de ruminantes. Estudos semelhantes sobre a utilização de enzimas exógenas, como

aditivo em rações de ruminantes para melhorar a digestibilidade do alimento, também vêm sendo realizados com enzimas proteolíticas (Eun & Beauchemin, 2005) ou com *mix* enzimáticos (YU et al., 2005).

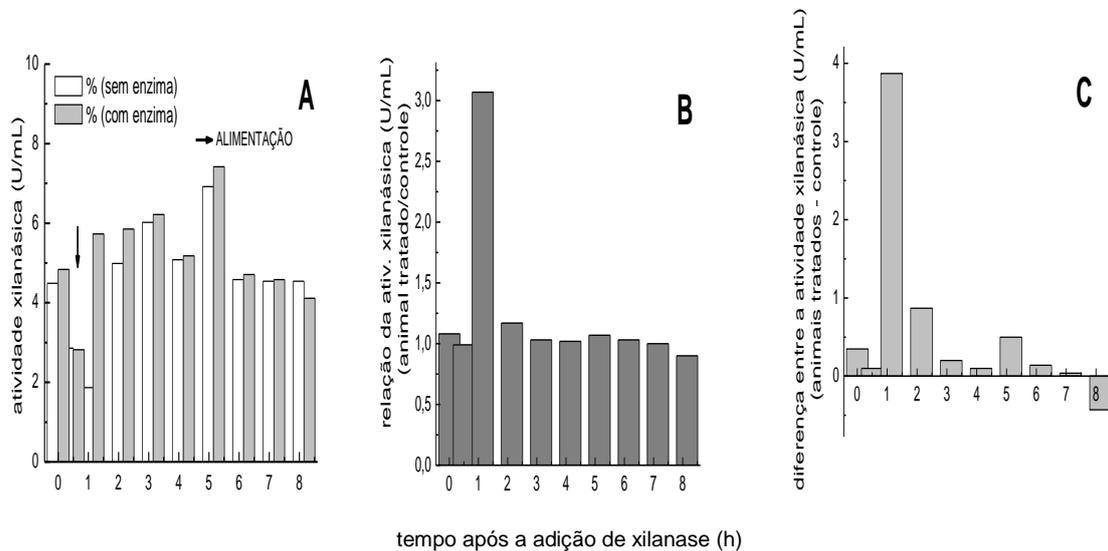


Figura 2. Desempenho das xilanases em rúmen de caprinos. Extrato enzimático produzido por *Aspergillus niveus*. **(A)** atividade xilanásica total em rúmen de caprinos tratados e não tratados com a enzima; **(B)** relação entre a atividade xilanásica total em rúmen de caprinos tratados e não tratados; **(C)** diferença entre a atividade xilanásica total em rúmen de caprinos tratados e não tratados. Erro padrão variando de $\pm 0,0022$.

Conclusões

A utilização de enzimas fibrolíticas como aditivo em volumosos aumentou a digestibilidade dos volumosos de 6-33,6%.

O extrato bruto, contendo as xilanases produzidas por *A. niveus*, foi estável às condições ruminais e não apresenta qualquer efeito citotóxico às células de mamíferos.

Agradecimentos

Este trabalho fez parte da tese de doutoramento de Simone C. Peixoto-

Nogueira. Agradecemos também ao CNPq, CAPES e FAPESP pelo suporte financeiro.

A Dra. Maria de Lourdes T. M. Polizeli, ao Dr. Ricardo A. Reis e ao Dr. João Atílio Jorge, que são bolsistas de produtividade em pesquisa do CNPq.

Aos técnicos Ricardo Fernandes Alarcon e Maurício de Oliveira pelo apoio técnico e à Profa. Dra. Elza Tiemy S. Hojo, por permitir o uso de suas instalações para a realização dos testes de citotoxicidade nos ensaios enzimáticos e experimentação animal.

Referências Bibliográficas

BEAUCHEMIN, K.A.; COLOMBATTO, D.; MORGAVI, D. P. Use of exogenous Fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. **Journal of Animal Science**, v81, p.37, 2002.

COLOMBATTO, D.; MORGAVI, D. P.; FURTADO, A. F.; BEAUCHEMIN, K.A. Screening of exogenous enzymes for ruminant diets: relationship between biochemical characteristics and in vitro ruminal degradation. **Journal of Animal Science**, v.81, p.2628-2638, 2003a.

COLOMBATTO, D.; MOULD, F.L.; BHAT, M.K.; MORGAVI, D.P.; BEAUCHEMIN, K.A.; OWEN, E. Influence of fibrolytic enzymes on the hydrolysis and fermentation of pure cellulose and xylan by mixed ruminal microorganisms *in vitro*. **Journal of Animal Science**, v.81, p.1040-1050, 2003b.

EMERSON, R. An experimental study of the life cycles and taxonomy of Allomyces. **Lloydia**, v.4, p.77-144, 1941.

EUN, J.S. & BEAUCHEMIN, K.A. Effects of a proteolytic feed enzyme on intake, digestion, ruminal fermentation and milk production. **Journal of Dairy Science**, v.88, n.6, p. 2140-2153, 2005.

EUN, J. S. & BEAUCHEMIN, K. A. Enhancing in vitro degradation of alfalfa hay and corn silage using feed enzymes. **Journal of Dairy Science**, v.90, n.6, p.2839-2851, 2007.

LOURES, D.R.S. **Enzimas fibrolíticas e emurchecimento no controle de perdas da ensilagem na digestão de nutrientes em bovinos alimentados com rações contendo silagem de capim tanzânia.** Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, - USP, para obtenção do título de Doutor em Agronomia, área de concentração: **Ciência Animal e Pastagens**. pp. 146, 2004.

MARTINS, A.S. **Enzimas fibrolíticas exógenas.** Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Campus de Jaboticabal – UNESP, para obtenção do título de Doutor em Zootecnia, área de concentração: **Produção Animal**. pp. 125, 2003.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p.426-428, 1959.

PEIXOTO-NOGUEIRA, S.C.; MICHELIN, M.; BETINI, J.H.A.; JORGE, J.A.; TERENCEZI, H.F.; POLIZELI, M.L.T.M. Production of xylanase by *Aspergilli* using alternative carbon sources: application of the crude extract on cellulose pulp Biobleaching. **Journal Industrial of Microbiology Biotechnology**, v.36, p.149-155, 2009.

QUEIROZ, R.C.; BERGAMASCHINE, A.F.; BASTOS, J.F.P.; SANTOS, P.C.; LEMOS, G.C. Uso de Produto à Base de Enzima na Dieta de Bovinos: Digestibilidade dos Nutrientes e Desempenho em Confinamento. **Revista Brasileira Zootecnia**, v.33, n.6, p.1548-1556, 2004.

RIVERA, A.R.; BERCHIELLI, T.T.; MESSANA, J.D.; VELASQUEZ, P.T.; FRANCO, A.V.M.; FERNANDES, B. Fermentação ruminal e produção de metano em bovinos alimentados com feno de capim-tifton 85 e concentrado com aditivos. **Revista Brasileira Zootecnia**, v.39, n.3, p.617-624, 2010.

ILLEY, J.M.A.; TERRY, R.A. A two - stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. **Journal of British Grassland Society**, v.18, n.2, p.104-111, 1963.

YU, P.; MCKINNON, J.J.; CHRISTENSEN, D. A. Improving the nutritional value of oat hulls for ruminant animals with pretreatment of multienzyme cocktail: *in vitro* studies. **Journal of Animal Science**, v.83, p.1113-1141, 2005.

