**PERFIL DE AMINOÁCIDOS E ESTUDO DA CINÉTICA DE
DEGRADAÇÃO RUMINAL DE ALIMENTOS EM BOVINOS
NELORE RECEBENDO DIFERENTES PROPORÇÕES DE
CONCENTRADO**

MARCELO DE QUEIROZ MANELLA

Médico Veterinário

Orientador : Prof. Dr. **CELSO BOIN**

Tese apresentada à Escola Superior
de Agricultura "Luiz de Queiroz",
Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Doutor em
Agronomia, Área de Concentração:
Ciência Animal e Pastagens.

PIRACICABA
Estado de São Paulo – Brasil
Janeiro - 2004

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Manella, Marcelo de Queiroz

Perfil de aminoácidos e estudo a cinética de degradação ruminal de alimentos em bovinos nelore recebendo diferentes proporções de concentrado / Marcelo de Queiroz Manella. - - Piracicaba, 2003.

104 p. : il.

Tese (doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2004.
Bibliografia.

1. Aminoácidos 2. Bovinos de corte 3. Contaminação microbiana 4. Digestibilidade 5. Isótopos estáveis 6. Nutrição animal 7. Proteínas 8. Rúmen 9. Suplementos concentrados para animais I. Título

CDD 636.2085

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Data de depósito junto à CPG/ESALQ

06 / 03 / 04

À minha filha, Marina,

Cujo os olhos azuis e o eterno sorriso são minha maior inspiração

E aos meus pais Maria Aparecida e José Nazareno, e aos Tios Paulo e Amélia por sempre me incentivaram e apoiaram nas decisões da minha carreira.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (USP) e em especial ao Departamento de Produção Animal, pela oportunidade de realização deste curso.

Ao Prof. Dr. Celso Boin pela orientação segura, pelos ensinamentos valiosos, pela confiança e exemplo de profissional.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de estudos durante o transcorrer do curso e pelo financiamento do projeto.

Ao Instituto de Zootecnia de Nova Odessa por ter cedido a estrutura e permitir a realização de meus trabalhos, bem como aos seus pesquisadores pelos laços de amizade lá criados.

Aos amigos Dr. Antônio João Lourenço, Dr. Guilherme Fernando Alleoni e Dr. João José A. A. Demarchi que muito colaboraram no meu aprendizado e pela oportunidade de participar de outros trabalhos ao longo do período de convivência.

Aos colegas Dr. Luis Orlindo Tedeshi e Ivani Posar Otsuk que pacientemente me auxiliaram na análise estatística dos dados.

Ao amigo José Oliveira de Andrade, o Zé Mineiro, pelo adestramento dos animais, e auxílio na condução do experimento, sendo ele o principal responsável pelo bom andamento de todo o experimento.

Aos técnicos do laboratório e funcionários do Instituto de Zootecnia: Maria Aparecida Menale, Sergio Roberto Miente, Neusa Aparecida Chaves, Carmen de Lourdes Terra, Zenairde Ribeiro da Silva Paloma, Nivaldo Martins, José Aparecido de Oliveira, Olinda Aparecida de Oliveira, Floripes Maria do Amaral e Antônia Casagrande, que de alguma forma contribuíram para a execução dos trabalhos.

Ao Prof. Dr. Paulo C. O. Trivilin e ao CENA pelas determinações de ¹⁵N.

Aos amigos André Alves de Souza e Vicente França Turino pelo auxílio na cirurgia de colocação das cânulas nos animais.

Aos colegas do Laboratório de Nutrição e Crescimento Animal (Sergio, Amanda, Marco, Dimas, Marina, Rodrigo, Liana, Adriana, Liris, Andrea, Juliano, Alexandre, Rodrigo, Laudi, Tuka, Ana Paulae ao Prof. Dr. Dante Pazzanese Duarte Lanna, cuja convivência permitiu desfrutar de vários momentos agradáveis.

Às pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

OBRIGADO

SUMÁRIO

	Pagina
RESUMOS.....	viii
SUMMARY.....	x
1 INTRODUÇÃO GERAL	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Estudo do valor nutritivo dos alimentos	3
2.2 Contaminação Microbiana do resíduo da incubação ruminal.....	8
2.3 Aminoácidos para ruminantes.....	11
3 EFEITO DA DIFERENTES PROPORÇÕES DE CONCENTRADO NA CONTAMINAÇÃO MICROBIANA PELA TÉCNICA DO ¹⁵ N NOS RESÍDUOS DOS ALIMENTOS E NAS CARACTERÍSTICAS DE FERMENTAÇÃO RUMINAL.....	20
Resumo.....	20
Summary	21
3.1 Introdução.....	22
3.2 Material e Métodos.....	25
3.2.1 Animais e dieta experimental.....	25
3.2.2 Infusão de ¹⁵ N no rúmen.....	27
3.2.3 Separação do pool de bactérias do conteúdo ruminal.....	27
3.2.4 Avaliação da contaminação do resíduo de incubação ruminal.....	27
3.2.5 Determinação do ¹⁵ N e N da contaminação microbiana do resíduo	28
3.2.6 Coleta do líquido ruminal.....	30
3.2.7 Determinação do nitrogênio amoniacal no rúmen.....	30
3.2.8 Determinação de ácidos graxos voláteis.....	31
3.2.9 Análise bromatológica.....	32
3.2.10 Análise estatística.....	32

3.3	Resultados e discussão.....	32
3.4	Conclusões.....	44
4	EFEITO DA DIFERENTES PROPORÇÕES DE CONCENTRADO NA NA CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DOS ALIMENTOS CORRIGIDOS OU NÃO PARA CONTAMINAÇÃO MICROBIANA.....	46
	Resumo.....	46
	Summary.....	47
4.1	Introdução.....	48
4.2	Material e Métodos.....	50
4.2.1	Animais e dieta experimental.....	50
4.2.2	Degradabilidade ruminal.....	52
4.2.3	Infusão de ^{15}N no rúmen.....	54
4.2.4	Determinação do ^{15}N e N da contaminação microbiana do resíduo...	54
4.2.5	Digestibilidade intestinal <i>in vitro</i> da proteína bruta.....	55
4.2.6	Análise bromatológica.....	56
4.2.7	Análise estatística.....	56
4.2	Resultados e discussões.....	56
4.4	Conclusões.....	69
5	EFEITO DA DIFERENTES PROPORÇÕES DE CONCENTRADO NA DEGRADAÇÃO E PERFIL DOS AMINOÁCIDOS.....	70
	Resumo.....	70
	Summary.....	71
5.1	Introdução.....	71
5.2	Material e Métodos.....	73
5.2.1	Animais e dieta experimental.....	73
5.2.2	Degradabilidade dos aminoácidos.....	74
5.2.3	Determinação dos aminoácidos dos alimentos.....	75
5.2.4	Determinação da contaminação microbiana do resíduo.....	76
5.2.5	Análise estatística.....	77
5.3	Resultados e discussão.....	78
5.4	Conclusões.....	91
	CONCLUSÕES GERAIS.....	92

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 94

PERFIL DE AMINOÁCIDOS E ESTUDO DA CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO RUMINAL DE ALIMENTOS EM BOVINOS NELORE RECEBENDO DIFERENTES PROPORÇÕES DE CONCENTRADO

Aluno: MARCELO DE QUEIROZ MANELLA

Orientador: Prof. Dr. CELSO BOIN

RESUMO

Foram utilizados seis bovinos Nelore canulados no rúmen dispostos em quadrado latino (3x3) com repetição, com o objetivo de avaliar os efeitos de diferentes proporções de concentrado (20, 40 e 60%) na dieta. Os alimentos testados foram: casca de soja, milho, sorgo, farelo de algodão, farelo de soja e farelo proteinoso de milho. Foi observada interação entre alimento e tempo de incubação, para a contaminação microbiana. A contaminação do resíduo de incubação ruminal aumentou, de forma geral, com o tempo de exposição ruminal, sendo que as principais variações ocorreram em relação à %Nbact. O milho, farelo de algodão e sorgo apresentaram maiores %Nbact nos tempos de 24 e 48 h e o farelo de soja apenas com 48h. O farelo proteinoso do milho e a casca de soja apresentaram maiores %NBact nos tempos de 24, 48 e 60h. O tratamento com 60% quando comparado com os tratamentos com 20 e 40% de concentrado apresentou menor valor médio de pH, maior produção de ácidos graxos voláteis, menor proporção de ácido acético, aumento da proporção molar de ácido propiónico, menores relações entre acético:propiónico . maior

proporção de ácido butírico e menor concentração N-NH₃. A casca de soja apresentou valores de degradabilidade efetiva (DE) da PB corrigida para contaminação microbiana maiores para todas as taxas de passagem que as estimativas feitas sem correção. O milho teve maior DE para o tratamento 60% para a MS (2,0, 5,0 e 8,0%/h), e para PB (k_p = 8,0 %/h). As DE's da PB do farelo proteinoso de milho com k_p de 2, 5 e 8%/h apresentaram efeito significativos para correção da contaminação microbiana do resíduo. O farelo de soja apresentou efeito de tratamento para a DE da MS com k_p de 5,0 e 8,0%/h e da PB com k_p de 8,0%/h, sendo menor os valores para o tratamento 60%. A correção do resíduo do farelo de algodão para contaminação microbiano apresentou efeito significativo ($P < 0,10$) na DE da MS para todas as taxas de passagem e na DE da PB apenas para k_p de 2%/h. Os maiores valores para digestibilidade intestinal da proteína não degradada no rúmen foram observados para casca de soja (81,7%), milho (87,1%) e sorgo (82,4%), enquanto que os menores foram os do farelo proteinoso de milho (57,6%) e do farelo de soja (53,4%, $P < 0,10$), e o farelo de algodão (70,9%) valor intermediário. A digestibilidade total da proteína dos alimentos diferiram entre si, sendo que apenas o milho e o farelo proteinoso de milho apresentaram digestibilidade semelhantes.. Houve efeito apenas do tipo de alimentos para a degradação de aminoácidos, onde as menores degradações foram observadas para o sorgo e as maiores para o farelo proteinoso de milho. A degradabilidade de cada aminoácido no alimento foi bastante variável, destacando a Iso, Leu e Val, que foram os de menor degradação em relação à média dos aminoácidos totais para quase todos os alimento, com exceção da casca de soja. Os aminoácidos individuais apresentam diferentes degradações, sendo variável entre os alimentos. Estas diferenças promoveram alterações significativas no perfil de aminoácidos dos alimentos incubados em relação ao original, devendo ser considerada pelos sistemas de avaliação de dietas.

AMINO ACIDS PROFILE AND RUMEN DEGRADATION KINETICS OF FEEDSTUFFS INCUBATED IN NELORE STEERS FED WITH DIFFERENT RATIOS OF CONCENTRATES

Author: MARCELO DE QUEIROZ MANELLA
Adviser: Prof. Dr. CELSO BOIN

SUMMARY

Six rumen cannulated Nelore steer were used in replicated latin square design (3 x 3), with the objective of analyze the effects of different ratios of concentrate (20, 40, 60%). The feed evaluated were soybean hulls, corn, sorghum grain, soybean meal, cottonseed meal and corn gluten feed. There was an interaction among feed and incubation period for microbial contamination. The residue contamination increased with rumen exposure for all feeds, and the main variations detected were with % residual bacterial nitrogen (%Nbact). The corn, cottonseed meal and the sorghum showed higher %Nbact after 24 and 48h of rumen exposure, and the soy bean meal only after 48 h. The corn gluten feed and soy bean hulls had the largest %Nbact contamination after 24, 48 and 60h of rumen exposure. The treatment with 60% of concentrate, when compared with 20 and 40% had lower mean pH, higher volatile fatty acids production ($P<0,05$), lower acetic acid proportion, because the increased of the proportion of propionic acid ($P<0,05$), which caused a lower ratios of acetate:propionate, higher molar proportion of butyric acid, and lower rumen ammonia nitrogen ($N-NH_3$). The soybean hulls had higher rumen effective degradability when corrected for microbial contamination for all estimated

passages rates. The corn had higher rumen dry matter effective degradability (ED) with animals on 60% concentrated treatment, and the CP were higher only with passage rates of 5%/h. The CP effective degradability of the corn gluten feed showed a significant difference when corrected for microbial nitrogen contamination. The dry matter ED of soy bean meal of animal on 60% concentrate diet showed lower values with passage rates of 5 and 8%/h. The microbial contamination correction of the cottonseed meal residues had a significant effect of dry matter ED with all the passage rates, and for the CP were significant only with estimates of 2%/h. The *in vitro* intestinal digestibilities rumen undegradable protein (RUP) were higher to soy bean hulls (81,7%), corn (87,1%) and sorghum (82,4%) than corn gluten meal (57,6). The total digestibility estimated (rumen and intestine) were different and only corn and corn gluten meal had similar values. It was not detected variations on bacterial CP and amino acid composition among diets. There was a significant effect of feed for amino acids degradation, with the lower values for sorghum and the higher for corn gluten feed. The individual amino acid degradability were variable with different rates of degradability, and that resulted on profile changes after rumen exposure.

1 INTRODUÇÃO

Bovinos têm como principal função a conversão de nutrientes de origem vegetal em alimentos (leite e carne) de alto valor nutritivo para alimentação humana. Na bovinocultura moderna a principal meta é aumentar a eficiência desta conversão, com menores custos de produção, sem causar impactos negativos ao meio ambiente. A eficiência desta conversão se deve a fatores como a genética do animal e a sua adaptação às condições ambientais em que se encontra. Entretanto, isto tem importância secundária em relação aos aspectos qualitativos dos ingredientes da dieta dos animais e da combinação destes para suprir as exigências nutricionais e explorar o potencial genético.

A digestão em ruminantes é um processo complexo, envolvendo atividade simbiótica dos microrganismos ruminais com o hospedeiro, sendo que estes são altamente susceptíveis a alterações do meio, e conseqüentemente afetando não só a extensão da degradação dos componentes dos alimentos como as quantidades e as proporções dos produtos resultantes da ação destes. Com base nisto, os sistemas de avaliação e formulação de dietas vem aprimorando seus modelos através do uso de informações da cinética da degradação das diferentes frações dos alimentos, e suas implicações nos padrões de fermentação e síntese de proteína microbiana e na disponibilidade e qualidade dos ingredientes a serem absorvidos.

Nos últimos anos os nutricionistas de bovinos vêm desenvolvendo sistemas de formulação de dietas que visam adequar o balanço de proteína com a mesma precisão que a avicultura e suinocultura (Oldhan, 1993; Cozzi et al., 1995). Dietas ajustadas em função das estimativas das exigências dos

aminoácidos, bem como o perfil destes, tendem a diminuir o teor proteína nas dietas (Boisen et al., 2000).

Desta maneira torna-se necessário o desenvolvimento de banco de dados para incorporação de novas informações, com diferentes condições ambientais e alimentares, aprimorando ainda mais os modelos já existentes.

O modelo Cornell Net Carbohydrate and Protein System (CNCPS, Fox et al., 2003) possui uma biblioteca tropical de alimentos com diversos dados gerados no Brasil (Tedeschi et al., 2002). Entretanto, ainda há a necessidade do aprimoramento e desenvolvimento de novas informações para o banco de dados tropical, principalmente em relação a cinética de degradação e perfil dos aminoácidos da proteína não degradável no rúmen (PNDR) dos alimentos, que ainda são escassos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Estudo do valor nutritivo dos alimentos

As diferenças de valor nutritivo entre as fontes protéicas se devem principalmente não só em relação ao teor da proteína bruta (PB), mas também ao seu perfil de aminoácidos. Comparando-se animais monogástricos e ruminantes, o valor nutritivo difere de forma significativa em função das características da anatomia e fisiologia digestiva (Boisen et al., 2000). Em ruminantes o valor nutritivo da proteína, em algumas condições, tem importância reduzida em função do processo de fermentação microbiana.

A eficiência de conversão do alimento em produto animal (e.g. carne, leite) é determinada, principalmente, pelo valor nutritivo do alimento. Para monogástricos o valor pode ser dado apenas pela composição química do ingredientes, e pela quantidade absorvida nos intestinos. Para bovinos, além destes fatores deve-se considerar os efeitos da fermentação ruminal na degradação dos componentes dos alimentos e na síntese de compostos a serem utilizados pelo hospedeiro através da absorção ruminal e intestinal.

O valor nutritivo dos alimentos, em geral é avaliado pela sua composição química, principalmente em relação aos teores de proteína e de carboidratos, além é claro de vitaminas e minerais. Entretanto, associado-se as informações da composição química dos alimentos, o valor nutritivo também é dado pela disponibilidade dos nutrientes para fermentação microbiana, determinando a eficiência da mesma. A eficiência de digestão dos alimentos no rúmen, e a

capacidade de transformação dos nutrientes em proteína de alta qualidade ocorrem em função da disponibilidade de energia e nitrogênio no rúmen para ótima atividade microbiana (Russell et al., 1992).

A associação entre a composição química e o potencial de degradação dos alimentos vai determinar o maior ou menor crescimento microbiano e produção de ácidos graxos voláteis no rúmen, que são as principais fontes de proteína e energia para bovinos, respectivamente (Church, 1990)

Os modelos para estimativas de exigência de proteína são os que mais vem recebendo alterações nos últimos anos. Na edição do National Research Council (NRC, 1984) expressava-se as exigências na forma de PB. No ano seguinte o sub-comite de "Nitrogen Usage in Ruminants" (National Research Council, 1985) propôs o uso das exigências de proteína em termos de proteína metabolizável. Este sistema considera a eficiência da síntese de proteína microbiana em função da relação entre a proteína degradável no rúmen (PDR) e os nutrientes digestíveis totais (NDT), e a proteína não degradada no rúmen (PNDR) da dieta, e a digestão de ambas no duodeno (NRC, 1985). Este é o sistema atualmente adotado pelo NRC (2000), NRC (2001) e o nível 1 do CNCPS. O Agriculture and Food Research Center (AFRC, 1995) adota conceitos semelhantes, porém a eficiência microbiana é dada em função da energia metabolizável fermentada no rúmen.

Já o nível 2 do sistema de CNCPS (Fox et al., 2000) integra as taxas de degradação das diferentes frações de carboidratos e proteína na síntese de proteína microbiana, fermentação ruminal e fluxo de nutrientes para absorção intestinal. A proteína é fracionada em: fração A (fração solúvel-Nitrogênio não protéico, NNP); fração B₁ (fração solúvel rapidamente degradada no rúmen); fração B₂ (fração solúvel, com taxa de degradação intermediária no rúmen); fração B₃ (fração insolúvel lentamente degradada no rúmen); e a fração C (fração que é indigestível durante a sua permanência no trato gastrointestinal). O nível 2 aplica não só o conceito da proteína metabolizável (proteína microbiana

+ PNDR) que chega ao duodeno, mas a qualidade desta proteína em função do perfil dos aminoácidos.

A deficiência de PDR, e conseqüentemente baixo teor de nitrogênio amoniacal (N-NH_3), é o principal fator limitante para digestão da fibra devido à menor atividade bacteriana (Satter & Slyter, 1974; Hoover & Stokes, 1991). Segundo Church (1990) a maioria das bactérias são capazes de usar o N-NH_3 como única fonte de nitrogênio, desta forma é necessário que a dieta promova concentrações adequadas no rúmen para a ótima atividade microbiana. Satter e Roffler (1979) propuseram que para a otimização da digestão da fibra a concentração ruminal deve estar entre 2,0 a 5,0 mg/dl.

Bactérias celulolíticas usam basicamente apenas amônia como fonte de nitrogênio, e sua capacidade fermentativa é consideravelmente reduzida na ausência de N-NH_3 , já que sua capacidade de usar N na forma de aminoácidos e peptídeos é bastante reduzida. Já as bactérias amilolíticas apresentam crescimento mais rápido, utilizando cerca de 64% de peptídeos e aminoácidos e 34 % de amônia, como fontes de N para seu crescimento (Russell et al., 1992). Além disso, as bactérias que degradam amido, pectina ou açúcares são capazes de continuar a degradação do substrato mesmo quando N é limitante (Tedeschi et al., 2000a), ao passo que as bactérias que degradam fibra não. Esse fenômeno é conhecido como “energy spilling” ou gasto inútil de energia.

Para a otimização da produção de proteína microbiana é necessária a sincronização entre a disponibilidade de energia e compostos nitrogenados no ambiente ruminal (Russell et al., 1992; Firkins, 1996). Os microrganismos dependem da energia na forma de adenosina tri fosfato (ATP) oriunda da fermentação dos carboidratos para que a biosíntese de proteína microbiana, caso contrário os peptídeos e aminoácidos passam a ser utilizados como fontes de energia, ocorrendo acúmulo de amônia no meio (Russell et al., 1992). Desta forma, a concentração de N-NH_3 no rúmen depende da degradabilidade da fonte protéica da disponibilidade de carboidratos (Satter e Roffler, 1979, Nocek

e Russell, 1988) e do equilíbrio entre sua produção e utilização pelos microrganismos.

Os trabalhos realizados nos últimos anos têm demonstrado que a taxa e a quantidade de nutrientes degradados no rúmen podem ter grande impacto nos produtos finais da fermentação ruminal, e conseqüentemente no desempenho animal. Com isto, nos últimos anos os nutricionistas vem buscando balancear dietas de modo a sincronizar a degradação da proteína e dos carboidratos. Se a taxa de degradação de proteína exceder a de carboidratos, grandes quantidades de nitrogênio podem ser perdidas na forma de amônia. Por outro lado, se a degradação de carboidratos for maior que a de proteína, a síntese microbiana vai ser menor (Russell et al., 1992; Van Kessel e Russell, 1996). A extensão com que os nutrientes são degradados é determinada estreitamente pela competição entre taxa de degradação e passagem, sendo que o conhecimento de ambas é necessário para estimar as quantidades de energia e de compostos nitrogenados disponíveis no rúmen (Russell et al., 1992).

Segundo Stokes et al. (1991), tanto níveis adequados de proteína degradável, e de carboidratos não estruturais, aumentam a eficiência microbiana, com melhoria na digestão dos alimentos, aumento na produção de ácidos graxos voláteis e conseqüentemente maior síntese de proteína microbiana.

Tedeschi et al. (2000a) concluíram que a inclusão, no modelo CNCPS, do balanço de nitrogênio no rúmen, melhora as estimativas para ganho de peso e consumo de matéria seca de bovinos de corte. Desta forma, torna-se ainda mais importante a busca por informações sobre as características dos alimentos, em diferentes condições alimentares, para estimar com maior precisão o balanço de N ruminal, e conseqüentemente prever consumo e desempenho dos animais.

As informações necessárias para estimar o balanço de nitrogênio para o ótimo crescimento bacteriano usado no modelo CNCPS (Fox et al 2000), são as

taxas de degradação ruminal das frações de N e de carboidratos de cada ingrediente usado na dieta. A metodologia adotada pelos principais modelos (AFRC, 1995; INRA, 1989; NRC 1985, 2000, 2001) para determinação da cinética de degradação da proteína no rúmen é o método *in situ* com sacolas de nylon, além de métodos *in vitro*.

O método *in situ*, apesar das grandes variações entre laboratórios (Broderick e Cochran, 2000) é o mais utilizado, enquanto que o modelo matemático exponencial proposto por Ørskov e McDonald (1979) é comumente usado para descrever a cinética de degradação ruminal dos alimentos. As constantes matemáticas identificadas no modelo podem ser interpretadas como porção solúvel (a), potencialmente degradável (b), e a taxa de degradação da fração b (c). Para estimar a degradabilidade efetiva o modelo usa a taxa de passagem do alimento, podendo usar um valor determinado ou pré-fixado. Modelo similar foi adotado pelo NRC (2001) para descrever a cinética de degradação das frações protéicas.

A cinética de degradação de carboidratos e proteínas varia amplamente de acordo com o alimento, sua composição e arranjo estrutural, além do método de processamento (NRC, 2001). A extensão com que a proteína é degradada no rúmen é determinada pela atividade proteolítica microbiana, taxa de reciclagem no rúmen e a oportunidade de acesso do microrganismo ao nutriente (NRC, 1985), sendo este último fator também determinado pela permanência do alimento no rúmen. Desta forma, para a predição da extensão de degradação dos nutrientes, é necessário o conhecimento das taxas de passagem e de degradação do alimento, que aplicadas ao modelo de Ørskov e McDonald (1979), permitem estimar a quantidade de energia e proteína efetivamente disponíveis para degradação ruminal.

O NRC (2001) para bovinos leiteiros adotou o método *in situ* para identificar e estimar as três frações nitrogenadas, definidas como A, B e C, e a taxa de degradação (k_d) da fração B, onde: A representa o NNP, a proteína rapidamente solubilizada e a proteína presente no alimento em partículas

menores que a porosidade do saco de nylon/poliéster usados nos ensaios; B corresponde à proteína potencialmente degradável, a qual é dependente da taxa de degradação (K_d) e da taxa de passagem (K_p). A fração C é definida como sendo a fração de proteína remanescente na sacola ao fim da incubação, que corresponde ao resíduo resistente à degradação ruminal.

A metodologia *in situ* para estudo da degradabilidade da proteína apresenta grandes variações entre laboratórios. As principais fontes de erro, e que requerem padronização metodológica são: tamanho de partícula, tamanho do saquinho e poros, além do material usado para confeccionar os sacos (Vanzant et al. 1998; Broderick & Cochran, 2000).

Segundo revisão feita por Vanzant et al. (1998) e mais recentemente por Broderick & Cochran (2000), uma das principais fontes de erro da técnica *in situ* é a contaminação microbiana do resíduo, podendo levar a sub estimativas da degradabilidade da matéria seca (MS), e principalmente da PB.

2.2 Contaminação microbiana do resíduo da incubação ruminal

A degradabilidade *in situ* apresenta, muitas vezes valores viciados em função da contaminação microbiana dos resíduos alimentares, subestimando a degradação protéica dos alimentos (Mathers & Aithicson, 1981).

Dixon & Chanchai (2000) e Beckers et al. (1995) relatam que as digestibilidade da matéria seca e da proteína são significativamente subestimadas quando não são feitas as correções para contaminação microbiana. Segundo Dixon & Chanchai (2000), a proporção de N microbiano/N total no resíduo pode variar de 54 a 69% (6 e 24h) para feno de alfafa e de 76 a 85% (6 e 24h) para palha de cevada.

A adesão bacteriana dos alimentos quando expostos ao ambiente ruminal comporta-se de maneira diferente, principalmente devido à composição química de cada ingrediente em particular, sendo que alimentos mais fibrosos e com

menor teor de N tendem a apresentar maior proporção de N-bacteriano (Wanderley et al. 1993; Beckers et al. 1995; Perez et al., 1996).

Várias são as técnicas que podem ser utilizadas para a determinação da contaminação microbiana. As mais utilizadas são as técnicas do ácido diaminopimélico (DAPA) (Ling & Buttery, 1978) e derivados de purinas (Zinn & Owens, 1986) como marcadores internos, e a diluição isotópica através da técnica do ^{15}N como marcador externo (Broderick & Merchen, 1992).

A técnica do DAPA apresenta limitações, pois este composto está presente em alguns alimentos (Von Keyserlingk *et al.*, 1996), apresentando alta variabilidade nos resultados e superestimando a proteína microbiana (Sadik *et al.*, 1990) além de ser degradado no rúmen (Masson, et al., 1991). Segundo Broderick & Merchen (1992), baseando-se em diversos trabalhos que narram a síntese de proteína microbiana, esta técnica não é adequada para quantificar o crescimento microbiano.

Os marcadores microbianos devem apresentar as seguintes características: 1) não estar presente no alimento; 2) não ser absorvido; 3) ser biologicamente estável; 4) fácil metodologia de determinação, 5) ocorrer similarmente entre os microrganismos e 6) ser constante na célula em todos os estágios de crescimento. Baseando-se em vários trabalhos Broderick e Merchen (1992) afirmam que os derivados de purinas e a técnica do isótopo estável do ^{15}N satisfazem a maioria destas exigências.

Trabalhos realizados por Wanderley et al. (1993), Varvikko et al. (1983) e a revisão feita por Broderick & Merchen (1992), indicam que a técnica da diluição isotópica do ^{15}N é aplicável para estimar a colonização do resíduo, usando correções para estimar a degradabilidade da MS e do nitrogênio dos alimentos com maior precisão.

Por definição, isótopos são átomos de um mesmo elemento químico onde existe uma diferença no número de nêutrons no núcleo mas com mesmo número de prótons (Trivellin, 1990). Os isótopos podem ser estáveis, que não emitem radiações, ocorrendo na natureza em proporções quase constantes. Da

mesma forma podem ocorrer de maneira natural os radio-isótopos, ou seja isótopos radioativos que emitem radiações (Alfa ou Beta), assim como é possível a produção de tais elementos de maneira artificial. Portanto nem todo isótopo é radioativo.

A abundância isotópica de isótopos estáveis dos elementos ocorre na natureza em proporções quase que constantes, sendo a do ^{14}N de 99,634% e do ^{15}N de 0,366% (Trivelin, 2002). Os isótopos pesados são usados como traçadores em diversos tipos de estudos, usando-se elementos com proporções de isótopos diferentes daquela da ocorrência natural (compostos enriquecidos com isótopo pesado).

Trabalhos realizados por Wanderley et al. (1993), Varvikko et al. (1983) e na revisão feita Broderick & Merchen (1992) indicam que a técnica da diluição isotópica é aplicável para estimar a correção da colonização do resíduo, e estimar a degradabilidade da MS e do nitrogênio dos alimentos com maior precisão.

Para a estimativa da contaminação microbiana através da técnica de diluição isotópica do ^{15}N (Broderick & Merchen, 1992), pode ser feita através da infusão ruminal diária (continua ou pulso) de ^{15}N na forma de sulfato de amônio ($(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), devendo ser mantida até ao final das incubações. A incubação dos saquinhos deve ser feita após a o enriquecimento atingir o platô às 48h, (Beckers et al., 1995). Amostras do conteúdo ruminal devem ser tomadas para separação das bactérias associadas às fases sólida e líquida (BAS e BAL) para determinação do enriquecimento.

Outra forma de determinar a contaminação microbiana é a incorporação do ^{15}N como marcador interno das plantas a serem usadas, através da fertilização nitrogenada de produtos enriquecidos (Varvikko et al., 1983; Wanderley et al., 1993), possibilitando redução nos custos com o marcador. A contaminação microbiana é determinada após a incubação ruminal também através da diluição isotópica. Entretanto Broderick & Merchen (1992) relatam que tal metodologia pode subestimar a contaminação microbiana, em função da

possibilidade das bactérias incorporarem o ^{15}N do alimento, estando aderidas ao mesmo.

Beckers et al. (1995) avaliaram a contaminação microbiana do farelo de soja, farelo de trigo e farinha de ossos e carne em vários tempos de incubação ruminal, utilizando a técnica da diluição isotópica com ^{15}N . A contaminação microbiana do farelo de soja e do farelo de trigo aumentou linearmente com o tempo de incubação até 32 e 50% Nbact (% nitrogênio bacteriano no resíduo) com o tempo de incubação de 48h. A farinha de ossos e carne manteve valores constantes de colonização (5% Nbact) durante o período de incubação ruminal. Os autores relataram diferenças para todos os alimentos entre a degradação aparente e a corrigida.

Dixon & Chanchai (2000), trabalhando com carneiros, observaram interação entre fonte de alimento e tempo de incubação ruminal para a colonização microbiana do resíduo através da técnica do ^{15}N . Os autores, assim como Beckers et al. (1995) relatam que a digestibilidade da MS e da proteína são significativamente subestimadas quando não são feitas as correções.

A técnica de diluição isotópica com ^{15}N como marcador microbiano é a de maior precisão para determinação da síntese de proteína microbiana ou contaminação da proteína microbiana, pois é um composto de fácil assimilação pela bactéria, sendo distribuído de forma homogênea (Broderick e Merchen, 1992). Porém, assim como outros marcadores, as vantagens esbarram quando se diz respeito a protozoários, pois estes apresentam concentrações de N e enriquecimentos de ^{15}N diferentes.

2.3 Aminoácidos para ruminantes

Animais ruminantes e não ruminantes necessitam receber quantidade adequadas de aminoácidos essenciais nos tecidos para atender as suas exigências de crescimento e ou produção. Estas exigências são influenciadas por diferentes fatores, como genótipo, sexo, ambiente, tipo de produção (leite

ou carne) e estágio fisiológico. As diferenças nas quantidades de aminoácidos exigidos, não alteram o seu perfil. Assim as alterações nas exigências podem referir-se a quantidade de proteína balanceada, ou proteína ideal (Boisen et al., 2000).

Segundo Boisen et al. (2000), a proteína ideal pode ser definida como “a perfeita relação entre os aminoácidos essenciais e o N exigido para o ótimo desempenho”. Segundo os autores, a aplicação do conceito de proteína ideal na formulação de ração para animais de produção é uma ferramenta importante na diminuição não só na quantidade de N na dieta, mas como também na excreção deste composto via fezes e urina.

Dietas podem ser facilmente formuladas para satisfazer as exigências de aminoácidos e energia para animais monogástricos. Por outro lado, quando se trata de ruminantes a tarefa é mais difícil, pois o suprimento de aminoácidos para absorção no duodeno dos ruminantes é uma mistura da proteína do alimento que escapa à degradação e da proteína produzida no rúmen. A alteração na estrutura do alimento, e a eficiência com que isto é feito no rúmen, não é constante entre as dietas (Boisen et al., 2000).

A proteína de origem microbiana é de alta qualidade pois possui o perfil de aminoácidos semelhante ao do tecido animal e leite, porém muitas não é capaz de satisfazer as exigências de novilhos com elevadas taxas de crescimento, e o desempenho pode ser menor que o esperado, a não ser que sejam fornecidos aminoácidos de origem “não microbiana” (O'Connor et al., 1993; NRC, 2000; Beermann *et al.*, 1998; Kunkle & Hopkins, 1999).

A estimativa do perfil de aminoácidos disponíveis para absorção intestinal em bovinos, feita pelo Cornell Net Carbohydrate and Protein System (CNCPS), depende de estimativas da composição dos aminoácidos essenciais (metionina (Met), lisina (Lis), histidina (His), fenilalanina (Fen), triptofano (Trp), treonina (Tre), leucina (Leu), isoleucina (Iso), valina (Val), e arginina (Arg)) disponíveis na proteína microbiana e na proteína dietética resistentes à degradação no rúmen (O'Connor et al., 1993).

A suplementação de fontes de proteína (verdadeira e não verdadeira) para ruminantes visa suprir as exigências de nitrogênio ruminal para síntese de proteína microbiana, e fornecer aminoácidos essenciais para a absorção intestinal (Ludden & Cecava, 1995).

Bovinos em crescimento têm alta deposição de proteína nos tecidos, e conseqüentemente, altos requerimentos de aminoácidos digestíveis. Nestas condições, os requerimentos não podem ser satisfeitos somente por proteína de origem microbiana, havendo a necessidade de suplementar com proteína não degradada no rúmen, aumentando o fluxo total e alterando o perfil de aminoácidos para o intestino delgado (NRC, 1985; Merchen & Titgemeyer, 1992; Ludden et al., 1995, Schwab, 1996).

Para a ótima deposição de proteína no tecido muscular é necessária a absorção intestinal adequada não só na quantidade mas o perfil ideal de aminoácidos. Qualquer desbalanço no perfil, ou deficiência de um único aminoácido na dieta, vai limitar o crescimento animal (Merchen e Titgemeyer, 1992). Esse desbalanceamento está provavelmente relacionado com a competição de absorção entre aminoácidos que compartilham do mesmo tipo de transporte tanto para entrar como para sair do enterócito. Além da competição entre aminoácidos, existe a competição entre aminoácidos e peptídeos (di e tri), pois esses possuem uma maior taxa de absorção, contribuindo para uma menor absorção intestinal dos aminoácidos devido a concentração interna ser maior que a concentração externa do enterócito (Fox & Tedeschi, 2003).

A Met, Cis, Lis, His, e possivelmente a Tre, Val e Iso, podem ser limitantes ou co-limitantes para o crescimento satisfatório de bovinos de corte (Merchen & Titgemeyer, 1992). Poppi & McLennan (1995) relatam que Met, Lis, His, Arg, Trp e Cis são os principais aminoácidos que limitam o desempenho de bovinos, provavelmente devido a composição de aminoácidos dos tecidos.

A lisina e metionina são os aminoácidos mais limitantes para vacas em lactação (Rulquin & Vérité, 1996; Schwab et al. 1996) e para animais em

crescimento sugere-se além destes, a treonina como sendo o terceiro aminoácido limitante (Richardson & Hatfield, 1978; Church, 1990). Entretanto, essas limitações dependem da dieta, tipo de animal, ambiente, e outros fatores inerentes ao animal. Por exemplo, tem-se demonstrado que His é limitante em animais em pastejo ao passo que Met geralmente é limitante em animais em confinamento.

Vários trabalhos relatam que a metionina é o principal amino ácido limitante para o crescimento de bovinos de corte (Merchen & Titgemeyer, 1992; Wilkerson et al., 1993; Kunkle & Hopkins, 1999). Por outro lado, ao suplementar apenas metionina, não há suficiente melhorar dos ganhos, ou no balanço de nitrogênio, devido ao desbalanço no perfil de aminoácidos. Porém ao utilizar misturas de aminoácidos essenciais adequadamente balanceados as respostas em ganhos são superiores (Merchen & Titgemeyer, 1992; Poppi & Mclennan, 1995). Löest et al (2001) demonstraram que leucina e valina foram limitantes quando a proteína microbiana era a única fonte de proteína metabolizável para bovinos. Esse fato por estar relacionado às deficiências de ácidos graxos ramificados em nível ruminal (Tedeschi et al., 2000b), devido a menor degradabilidade destes aminoácidos em relação aos demais, independente do tipo de alimento (Varvikko, et al., 1986; Erasmus et al., 1994; Harstad e PrestØKen, 2000; Miranda, 2002) .

Sloan et al. (1998) recomenda o uso de 6,82% e 2,19% de proteína metabolizável para os respectivos teores de lisina e metionina digestíveis, no balanceamento de misturas para vacas em lactação. Schwab (1996) considera que os teores de lisina e metionina na digesta duodenal devem ser de 14,7 a 16,7 e de 5,3 a 5,6% do total de aminoácidos essenciais, respectivamente, semelhante às proposições de Rulquin & Vérité (1993) de 15 e de 5% de lisina e metionina (% do total de aminoácidos essenciais) na digesta duodenal. Sempre deve ser respeitada a relação de 3:1 entre lisina e metionina (Rulquin e Vérité, 1993; Schwab, 1996; Sloan et al., 1998). Quando dietas são formuladas para fornecimento de lisina e metionina de acordo com os autores supra

citados, observam-se aumentos significativos na produção e no teor de proteína do leite. Por outro lado, respostas negativas são observadas na produção de leite e consumo de matéria seca quando há excesso de metionina em relação a lisina (Garthwaite et al., 1998).

Segundo Schwab et al. (1993), o balanço perfeito de aminoácidos absorvidos no duodeno é o fator mais importante para aumentar a produção de proteína láctea do que o teor de proteína na dieta. Fato este também foi constatado por Bach et al. (2000), onde vacas recebendo dietas com 15 % de proteína, mas com balanço adequado de aminoácidos, apresentaram produções de leite e de proteína láctea semelhantes às vacas recebendo dietas com 18% de PB, mas com balanço de aminoácidos inadequado. Isto implica que o correto balanceamento de aminoácidos promove o uso mais eficiente de N na síntese de proteína do leite.

Wilkerson et al. (1993) sugerem que as exigências de aminoácidos em relação às de proteína metabolizável, para bovinos de corte em crescimento, são de 3,0% de metionina, 8,0% de lisina, 1,0% triptofano, 5,2% treonina, 5,7% valina, 6,9% leucina, 3,9% fenilalanina e 1,6% de histidina. A relação entre lisina e metionina foi de 2,7:1, sendo bem próximo das relações de 3:1 sugeridas para vacas leiteiras.

Alguns autores afirmam que a composição de aminoácidos da proteína microbiana é constante, e independentemente da dieta oferecida ao animal (Varvikko, 1986; Von Keyserlingk et al., 1996). Sendo assim, qualquer alteração na composição de aminoácidos da digesta duodenal irá ocorrer devido ao perfil de aminoácidos do alimento que escapa a degradação ruminal. Por outro lado, Clark et al. (1992) relatam que a composição química de bactérias isoladas no rúmen de vacas podem diferir de maneira significativa em função da dieta.

Quando a quantidade de proteína não degradada no rúmen é aumentada, o balanço de aminoácidos desta parcela se torna muito importante, indicando que a seleção e combinação de várias fontes são importantes para assegurar a

absorção com um adequado balanceamento de aminoácidos (Wilkerson et al., 1993; Palmquist et al., 1993; Maiga et al., 1996).

Desta forma ao preconizar o incremento de aminoácidos na dieta para ruminantes, deve-se considerar: a degradabilidade da proteína do alimento no rúmen; o conteúdo de aminoácidos da proteína não degradável no rúmen; e a digestibilidade intestinal dos aminoácidos da proteína não degradada no rúmen (Mupeta et al., 1997). Também deve ser considerado que a degradação dos alimentos ocorrida no rúmen pode alterar o perfil de aminoácidos, quer no aspecto qualitativo ou quantitativo, em relação a composição original do alimento (Oldhan, 1993; Cozzi et al., 1995; Beermann et al., 1998). Entretanto, Tedeschi et al. (2001) não encontraram diferenças entre o perfil de aminoácidos de forragens e de seus resíduos após tratamento com tampão de borato-fosfato, que é utilizado para estimar a quantidade de proteína solúvel no ambiente ruminal.

A diminuição da degradabilidade dos aminoácidos da proteína está relacionada ao tratamento físico-químico dos alimentos (Prestøkken, 1999; Harstad e Prestløkken, 2000), ou pelo aumento na proporção de concentrado na dieta que resulta em aumento da taxa de diluição (NRC, 1985; Church, 1988).

Harstad e Prestløkken (2000) avaliaram a degradabilidade intestinal e ruminal do farelo de soja e da soja tratada com xilose (SoyPass®). A degradabilidade ruminal efetiva dos aminoácidos totais foram respectivamente de 53,3 e 28,7%.

Lycos e Varga (1995) realizaram estudo para determinar efeitos do tamanho da partícula e tratamento pelo calor na degradação cinética dos aminoácidos na soja crua, quebrada, moída e tostada. O tratamento pelo calor diminuiu a degradabilidade e o padrão de degradação fracionada no rúmen para todos os aminoácidos, exceto para lisina, porém a redução do tamanho da partícula teve efeito contrário. Metionina, leucina e treonina foram os aminoácidos que apresentaram menor degradação. Os autores também

relataram diferenças no perfil de aminoácidos no alimento após a incubação ruminal.

Prestløkken (1999) trabalhando com cevada e aveia, e Von Keyserlingk et al. (1996) avaliando 19 silagens de gramíneas, concluíram que a degradação ruminal da proteína e dos aminoácidos totais não podem ser usadas para determinação da degradação ruminal de aminoácidos individuais, pois estes apresentaram diferentes taxas de degradação ruminal. Prestløkken (1999) ainda observou que a arginina, ácido glutâmico, cisteína e histidina têm maior degradabilidade, enquanto que isoleucina, leucina, metionina, tirosina, valina, e fenilalanina, têm menor degradação.

Os aminoácidos essenciais, segundo Varvikko *et al.* (1986), têm degradação mais lenta que os não essenciais, aumentando as proporções relativas dos essenciais. Os aminoácidos de cadeia ramificada (isoleucina, leucina e valina) são mais resistentes à degradação microbiana que os outros aminoácidos (Varvikko, 1986).

Ao avaliar os efeitos do nível de ingestão de dietas com proteínas de diferentes degradabilidade, Volden (1999) observou alterações no fluxo duodenal de aminoácidos. Nas dietas com fontes protéicas de menor degradabilidade houve maior fluxo duodenal de aminoácidos totais. Nos menores níveis de ingestão de concentrado houve aumento nas proporções de cistina, isoleucina, ornitina, e histidina, enquanto que o conteúdo de metionina diminuiu. Concluiu-se que o nível de ingestão e a quantidade de proteína não degradável no rúmen alteraram a quantidade e a composição do fluxo de aminoácidos para o intestino.

Em outro ensaio, Volden et al. (1998) estudou a cinética da lisina, metionina e treonina após infusão intra-ruminal em vacas lactentes, com dois níveis de ingestão de alimento. Com o aumento na dosagem, todos os aminoácidos mostraram diminuição linear na degradação ruminal. A taxa de degradação relativa da metionina foi menor que a da lisina para o maior nível de

ingestão, por outro lado o menor nível de ingestão resultou na maior degradação da metionina.

Crooker et al. (1987) alimentaram vacas em lactação com dietas mistas (25% silagem de milho, 25% feno de alfafa, 50% mistura de grãos com sete suplementos protéicos) e utilizaram-se do DAPA (ácido diaminopimélico) como marcador da contaminação microbiana. Os autores concluíram que a fermentação ruminal altera o perfil de aminoácidos do resíduo após incubação em relação ao alimento original. A determinação da extensão dessas alterações em função do tempo, assim como a taxa de proteína sobre passante, permitirá estimar a contribuição da dinâmica dos aminoácidos da dieta no intestino.

Cozzi et al. (1995) revisou que há diferenças nas taxas de degradação de aminoácidos específicos *in vitro* e *in vivo*, indicando a remoção seletiva pelos microrganismos ruminais. Em alguns trabalhos (Varvikko et al., 1983; Weakley et al., 1983 e Maiga et al., 1996) o perfil de aminoácidos dos resíduos após exposição ruminal continuavam semelhantes aos do alimento original. Outros trabalhos (Cozzi et al., 1995; Crooker et al., 1986 e Von Keyserlingk et al. 1998) que avaliaram a composição de aminoácidos nas frações de proteína não degradáveis no rúmen, após correção para contaminação microbiana do resíduo, observaram diferenças no perfil de aminoácidos entre a proteína ingerida e a proteína não degradada no rúmen.

Maiga et al. (1996) incubaram por 12h amostras de farinha de sangue, glúten de milho, farelo de soja e farinha de ossos e sangue. Os autores relatam que não houve diferença entre o perfil de aminoácidos do alimento e do resíduo. Isto, segundo os autores, pode ter ocorrido em função da contaminação de aminoácidos de origem microbiana, já que não foram feitas as correções por marcadores.

Foi avaliada a degradação de aminoácidos, corrigindo para contaminação microbiana, após período de incubação de quatro fontes de proteína no rúmen de vacas Holandesas. Cozzi et al. (1995) concluíram que o padrão de desaparecimento dos aminoácidos é diferente entre os alimentos. A

degradação ruminal modificou a concentração dos aminoácidos essenciais em relação à proteína original. Isto indica a necessidade da determinação do perfil de aminoácidos nas frações não degradadas do rúmen, pois a utilização dos aminoácidos do alimento para estimar a absorção intestinal não é precisa.

Varvikko (1986) trabalhando com amostras de alimentos marcadas com ^{15}N , e utilizando a técnica de diluição isotópica, quantificou a contaminação microbiana das amostras após incubação ruminal. Os autores concluíram que o ambiente ruminal altera a composição de aminoácidos do alimento original.

As observações feitas por Varkikko (1986), Crooker *et al.* (1986), Cozzi *et al.* (1995) e Von Keyserlingk *et al.* (1996) indicam a necessidade do uso de marcadores microbianos para a correta determinação do perfil de aminoácidos das frações da proteína não degradável no rúmen.

Para que o ajuste de proteína visando as exigências de aminoácidos nas dietas para bovinos de corte tenha a mesma precisão que em monogástricos, é necessário detalhar o perfil de aminoácidos de alimentos disponíveis para digestão intestinal sob diferentes condições de rúmen. Modelos como o CNCPS vem sendo desenvolvidos para determinar as exigências e as proporções de aminoácidos para absorção intestinal. Desta forma, há uma necessidade de detalhar informações sobre a composição dos alimentos. Dados na literatura sobre alimentos para bovinos utilizados no Brasil ainda são escassos.

O objetivo desse estudo foi de avaliar o efeito da proporção de concentrado da dieta no tempo de colonização, nas características da fermentação ruminal, na degradação de alimentos concentrados e na composição de aminoácidos da proteína não degradada no rúmen.

3 EFEITO DA DIFERENTES PROPORÇÕES DE CONCENTRADO NA CONTAMINAÇÃO MICROBIANA PELA TÉCNICA DO ^{15}N NOS RESÍDUOS DOS ALIMENTOS E NAS CARACTERÍSTICAS DE FERMENTAÇÃO RUMINAL

Resumo

Foi avaliada a contaminação microbiana nos resíduos de incubação ruminal de alguns alimentos e as características da fermentação ruminal utilizando seis novilhos Nelore, canulados no rumem, alojados em gaiolas de metabolismo e dispostos em Quadrado Latino (3x3) com repetição, recebendo aleatoriamente um das três proporções de concentrado (20, 40, 60%). Os alimentos testados foram: casca de soja, milho, sorgo, farelo de algodão, farelo de soja e farelo proteinoso de milho. Após adaptação, a dose pulso diária de 360 mg ^{15}N foi inoculada no rúmen por seis dias. Os alimentos foram incubados no rúmen pelo método dos saquinhos de nylon no terceiro dia de infusão durante 3, 6, 12, 24 e 48h, além de 60h para o farelo proteinoso de milho e a casca de soja. O líquido ruminal foi coletado ao final das incubações saquinhos com 0, 1, 2, 3, 4, 6 e 8h após a alimentação. Foi observada interação entre alimento e tempo de incubação ($P < 0,05$), para a contaminação microbiana. A contaminação do resíduo de incubação ruminal aumentou, de forma geral, com o tempo de exposição ruminal, sendo que as principais variações ocorreram em relação a % de nitrogênio bacteriano no resíduo (%Nbact). O milho, e farelo de algodão e sorgo apresentaram maiores %Nbact nos tempos de 24 e 48 h ($P < 0,05$) e o farelo de soja apenas com 48h. O farelo proteinoso do milho e a

casca de soja apresentaram maiores %NBact nos tempos de 24, 48 e 60h ($P<0,05$). O tratamento com 60% quando comparado com os tratamentos com 20 e 40% de concentrado apresentou menor valor médio de pH ($P<0,05$), maior produção de AGV's ($P<0,05$), menor proporção de ácido acético ($P<0,05$), em decorrência do aumento da proporção molar de ácido propiónico ($P<0,05$), levando a menores relações entre acético:propiónico ($P<0,05$), e maior proporção molar de ácido butírico ($P<0,05$), e menor concentração N-NH₃ ($P<0,05$).

Effects of different concentrate ratios on bacterial contamination with ¹⁵N technique of feed residues and rumen fermentation characteristics.

Summary

Six rumen cannulated Nelore steer were used in replicated latin square design (3 x 3), with the objective of analyze the effects of different ratios of concentrate (20, 40, 60%) on microbial contamination of incubated feed residues with ¹⁵N stable isotope technique and ruminal fermentative characteristics. The tested feed were soy bean hulls, corn, sorghum grain, soy bean meal, cottonseed meal and corn gluten feed. After 8 days of adaptation period, a daily pulse dose of 360 mg ¹⁵N were infused into the rumen during 6 days. The feed were incubated in the rumen using the nylon bag technique starting on the third day of infusion during 3, 6 12, 24 and 48h, and an extra period of 60h for corn gluten feed and soy bean hulls. Rumen liquor were collected at 0, 1, 2, 3, 4, 6 and 8h post feeding. There was an interaction among feed and incubation period ($P<0,05$) for microbial contamination. The residue contamination increased with rumen exposure for all feeds, and the main variations detected were with % o residual bacterial nitrogen (%NBact). The corn, cottonseed meal and the sorghum showed higher %NBact after 24 and 48h of rumen exposure, and the soy bean meal only after 48 h. The corn gluten

feed and soy bean hulls had the largest %Nbact contamination after 24, 48 and 60h of rumen exposure. The treatment with 60% of concentrated, when compared with 20 and 40% had lower mean pH ($P<0,05$), higher volatile fatty acids production ($P<0,05$), lower acetic acid proportion ($P<0,05$), because of a increased proportion of propionic acid ($P<0,05$), which caused a lower ratios of acetate:propionate ($P<0,05$), higher molar proportion of butyric acid ($P<0,05$), and lower rumen ammonia nitrogen (N-NH_3 ; $P<0,05$).

3.1 Introdução

A digestão ruminal é um sistema anaeróbio e dinâmico envolvendo microorganismos, como bactérias, protozoários e fungos. Para tal, a adesão microbiana a superfícies é muito importante no qual tem numerosas implicações em um ecossistema onde é constante a introdução e remoção de material (Church, 1990). A adesão bacteriana aos alimentos, quando expostos ao ambiente ruminal, comporta-se de maneira diferente em função da composição química de cada ingrediente, sendo que alimentos mais fibrosos e com menor teor de nitrogênio tendem a apresentar maior proporção de nitrogênio bacteriano (Wanderley et al. 1993; Beckers et al. 1995; Perez et al., 1996). Dixon e Chanchai (2000) relatam que a proporção de N microbiano/N total no resíduo pode variar de 54 a 69% (6 e 24h) para feno de alfafa e de 76 a 85% (6 e 24h) para palha de cevada. A capacidade de adesão dos microorganismos ao resíduo podem ser influenciadas por fatores como temperatura, pH e produtos finais da digestão do substrato (Church, 1990).

A técnica de saquinho de nylon para avaliação da degradabilidade *in situ* é a ferramenta usada em diversos estudos para estimar a disponibilidade e a cinética da degradação de substratos no rúmen. Entretanto, a degradabilidade *in situ* apresenta, muitas vezes, valores viciados em função da contaminação microbiana dos resíduos alimentares, subestimando a degradação protéica dos alimentos (Mathers & Aithinson, 1981). Dixon & Chanchai (2000) e Beckers et

al. (1995) relatam que as degradabilidade da matéria seca e da proteína são significativamente subestimadas quando não são feitas as correções para contaminação microbiana. Várias são as técnicas que podem ser utilizadas para a determinação da contaminação microbiana. As mais utilizadas são as técnicas que usam o ácido diaminopimélico (DAPA) (Ling & Buttery, 1978), derivados de purinas (Zinn & Owens, 1986) como marcadores internos e a diluição isotópica através da técnica do ^{15}N como marcador externo (Broderick & Merchen, 1992). Trabalhos realizados por Wanderley et al. (1993), Varvikko et al. (1983) e em revisão feita por Broderick e Merchen (1992) indicam que a técnica da diluição isotópica do ^{15}N é aplicável para estimar a colonização do resíduo, possibilitando correções para estimar a degradabilidade da MS e do nitrogênio dos alimentos com maior precisão

Como resultado do processo de fermentação microbiana do substrato tem-se a produção de metabólitos, os ácidos graxos voláteis (AGV's) e lactato, principais responsáveis pela diminuição do pH ruminal. Os AGV's (ácido acético, ácido propiónico e ácido butírico) são absorvidos por difusão através da parede ruminal, participando do metabolismo energético dos animais como principais fontes de energia (50 a 70%; Church, 1990; Van Soest, 1994; Allen, 1997). A inclusão de concentrado na dieta, e conseqüentemente maior disponibilidade de amido para degradação ruminal, causa um aumento na concentração total de ácidos graxos voláteis (Chen, 1994), com alteração nas proporções, principalmente com aumento de ácido propiónico, e redução de ácido acético, e conseqüentemente redução na proporção acetato:propionato (Church, 1990; Vanzant et al., 1990; Chen, 1994; Theurer et al., 1996).

Para que este processo de fermentação e digestão seja eficiente, em função da otimização do crescimento/atividade microbiana, deve-se garantir um balanço de adequado de N (Tedeschi et al., 2000a) e pH adequado (Dixon & Stockdale 1999). Para a otimização da digestão da fibra a concentração nitrogênio amoniacal (N-NH_3) no rúmen deve estar entre 2,0 a 5,0 mg/dl (Satter e Roffler (1979) e em relação ao pH, a digestão da fibra é intensamente

reduzida quando for inferior a 6,2, e mínima, quando os valores apresentados forem inferiores a 6,0 (Dixon & Stockdale, 1999)).

Bactérias celulolíticas usam basicamente apenas amônia como fonte de nitrogênio, e sua capacidade fermentativa é consideravelmente reduzida na ausência de N-NH_3 , já que sua capacidade de usar N na forma de aminoácidos e peptídeos é bastante reduzida. Já as bactérias amilolíticas apresentam crescimento mais rápido, utilizando cerca de 64% de peptídeos e aminoácidos e 34 % de amônia, como fontes de N para seu crescimento (Bryant, 1973; Russell et al., 1992). Além disso, as bactérias que degradam amido, pectina ou açúcares são capazes de continuar a degradação do substrato mesmo quando N é limitante (Tedeschi et al., 2000a), ao passo que as bactérias que degradam fibra não. Esse fenômeno é conhecido como “energy spilling” ou gasto inútil de energia. Por outro lado, os microrganismos dependem da energia oriunda da fermentação dos carboidratos para que a biosíntese de proteína microbiana, caso contrário os peptídeos e aminoácidos passam a ser utilizados como fontes de energia, ocorrendo acúmulo de amônia no meio (Russell et al., 1992). Desta forma, a concentração de N-NH_3 no rúmen depende da degradabilidade da fonte protéica e da disponibilidade de carboidratos (Satter & Roffler, 1979, Nocek & Russell, 1988) e do equilíbrio entre sua produção e utilização pelos microrganismos.

O objetivo do presente trabalho foi determinar os efeitos das diferentes proporções de concentrado na adesão microbiana em resíduos de alimentos após a incubação ruminal, utilizando-se da técnica do isótopo do ^{15}N e as variações nos parâmetros de fermentação ruminal.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Animais e dieta experimental

O trabalho foi realizado na Estação Experimental Central do Instituto de Zootecnia, localizado no município de Nova Odessa, SP. Foram utilizados seis bovinos Nelore providos de fistula ruminal com peso inicial de aproximadamente 380kg, alojados em gaiolas de metabolismo, em um delineamento do tipo Quadrado Latino 3 x 3, com duas repetições por tratamento em cada período. No primeiro período experimental os 6 animais foram distribuídos por sorteio para os diferentes tratamentos, sendo 2 animais para cada tratamento, e nos períodos subsequentes os animais mudavam de tratamento.

Os tratamentos testados foram: **80:20**- 80% de volumoso e 20% de concentrado, **60:40**- 60% de volumoso e 40% de concentrado ou **40:60**- 40% de volumoso e 60% de concentrado. O volumoso utilizado foi a silagem de milho, e no concentrado utilizou-se milho triturado, farelo de soja, farelo de algodão, casca de soja, sorgo em grão moído e farelo proteinoso de milho. Os alimentos bem como as proporções de concentrado utilizadas foram escolhidas pois são tipicamente utilizadas em confinamentos no Brasil para bovinos Nelore.

Na Tabela 1 são apresentadas as composições químicas de cada ingrediente utilizados na formulação das diferentes dietas (Tabela 2), balanceadas em função dos tratamentos.

As dietas foram formuladas com base no “Cornell Net Carbohydrate and Protein System” (CNCPS 4.2; Fox et al., 2000), com a otimização da função ruminal. A quantidade de alimento fornecido foi de 100 g de MS / kg PVJ^{0,75}, sendo realizados ajustes quando necessário, de modo que não ocorressem sobras. A ração foi fornecida em duas refeições diárias as 8:00 e 15:00 horas.

Tabela 1. Composição química dos ingredientes

Alimento	MS	PB	EE	FDN	FDA	PBFDA (%PB)	Lig	MM
Milho	87,5	10,4	4,3	25,6	5,1	6,8	1,1	1,1
Casca de soja	89,7	13,6	3,1	69,0	51,7	3,7	2,2	4,6
Sorgo	84,4	10,1	2,5	32,6	7,3	5,6	4,5	1,6
F. p. Milho	90,4	25,7	3,0	44,6	10,9	10,3	1,2	5,0
F. soja	90,3	54,5	0,7	16,6	11,6	4,3	0,8	6,5
F. algodão	92,2	37,0	1,1	51,5	33,7	9,3	14,8	5,1
Silagem de milho	29,1	8,3	1,6	61,2	32,9	-	2,7	5,3

MS- Matéria seca; PB-Proteína bruta, EE- Extrato etéreo. FDN- Fibra em detergente neutro, FDA- Fibra em detergente ácido, PBFDA-Proteína bruta ligada ao FDA (% da PB) Lig.- lignina, MM- matéria mineral, EB- Energia bruta.

Tabela 2. Proporções dos ingredientes e composição química dos concentrados

Ingredientes (%MS)	80:20	60:40	40:60
Silagem de milho	79,6	58,5	39,4
Farelo de Soja	3,5	3,6	5,4
Farelo de grão de milho	4,2	9,4	13,5
f. algodão	2,2	3,6	4,1
Sorgo em grãos	2,8	8,0	13,5
F. proteinoso de milho	2,1	4,7	6,1
Casca de soja	2,8	9,8	16,2
Uréia	1,3	1,0	0,5
Mistura Mineral*	1,5	1,4	1,4
Composição química das dietas			
MS (%MO)	40,7	52,8	63,7
PB (%MS)	15,6	17,8	16,8
EE (%MS)	2,2	2,2	2,3
FDN (%MS)	50,7	47,4	44,8
FDA (%MS)	30,5	27,6	25,8
MM (%MS)	6,2	6,0	5,4
Consumo da ração			
KgMS/dia	7,9	9,1	9,0
g/PV^{0,75}	84,6	97,6	96,5

*28,09% S. Cálcio, 46,8% Calcário, 18,73% NaCl, 0,34% S. Mn., 5,15% F. Bical., 0,08% S. Cu, 0,004% S. Co, 0,004% Selenito.

3.2.1 Infusão ^{15}N no rúmen

Após sete dias de adaptação à dieta foram feitas infusões diárias no rúmen de uma dose pulso com 360 mg de ^{15}N na forma de $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (35,6 atm% $^{15}\text{N}/\text{N}$ total), imediatamente após o fornecimento da ração da manhã, durante seis dias (Broderick e Merchen, 1992).

A incubação dos saquinhos para estudo da degradabilidade iniciou-se três dias após a primeira infusão, quando as bactérias apresentam o máximo do seu enriquecimento (Firkins et al. 1987; Beckers et al. 1995).

3.2.2 Separação do *pool* de bactérias do conteúdo ruminal

No quinto dia de aplicação de ^{15}N no rúmen e quatro horas após o fornecimento da primeira refeição, foram coletados 500 g de conteúdo ruminal em cinco pontos diferentes do rúmen, em cada um dos animais. O conteúdo ruminal foi imediatamente misturado a solução salina 0,9%, e homogeneizado em liquidificador por 20 segundos, sendo em seguida congelado.

A separação das bactérias foi feita segundo metodologia descrita por Cecava et al. (1990). Após descongelamento o conteúdo ruminal era centrifugado a 500 x g por 20 minutos, o sobrenadante foi novamente centrifugado a 27000 x g durante 30 minutos. O precipitado (*pellet* de bactérias) foi coletado e congelado, para liofilização e encaminhados para determinação do ^{15}N .

3.2.3 Avaliação da contaminação do resíduo de incubação ruminal

Os saquinhos (12 x 21 cm) com porosidade de 50 μ foram preenchidos com aproximadamente 12 gramas de amostras das diferentes fontes alimentares, tendo-se uma relação de tamanho da amostra por área do saquinho de 23,8 mg/cm², próximo ao intervalo de 10 a 20 mg cm² proposto por

Nocek (1988). Os saquinhos continham 2 bolas de gude para manter os sacos submersos no rúmen, e uma argola de metal para serem fixados a mosquetão, que estava amarrado a corda de nylon de 50 cm de comprimento. Os saquinhos eram posicionados e submersos no rúmen em triplicata por 0, 3, 6, 12, 24, 48 h, sendo que o farelo proteínoso de milho e a casca de soja tiveram um período extra referentes a 60 h de incubação ruminal. As incubações foram feitas imediatamente após fornecimento da ração aos animais. As incubações dos saquinhos foram feitas seguindo os esquema do quadro 1:

Dia	Atividade:
1 a 7	Adaptação as dietas experimentais
8 a 13	Dosagem de 360 mg ^{15}N .
10	Incubação dos saquinhos 48h e 60h
11	Incubação dos saquinhos 24h
12	Retirada dos saquinhos 48 e 24h, incubação e retirada dos saquinhos de 12h, e retirada dos saquinhos de 60h.
13	Incubação e retirada dos saquinhos 3h e 6h.

Quadro 1- Esquematização das atividades de dosagem de ^{15}N e incubação dos saquinhos de nylon no rúmen

Após a retirada dos sacos, estes foram lavados em lavadora automática por cerca de 20 minutos com 4 enxágües no modo para tecidos delicados, para que a água fluísse incolor. Após lavagem os mesmos foram secos em estufa com ventilação de ar forçada a 60 °C por 72 horas, sendo em seguida pesados.

3.2.5 Determinação do ^{15}N e N e da contaminação microbiana do resíduo

As amostras dos resíduos de alimentos após a incubação ruminal ou de bactérias ruminais foram colocadas em capsulas de estanho em auto amostrador, sendo que a quantidade pesada foi a estimada para conter no mínimo 50 μg de N aproximadamente. A combustão total da amostra foi obtida a temperatura de 1700°C. Os produtos da combustão (CO_2 , N_2 , NO_2 e H_2O) eram levados para um tubo de redução a 600°C, onde os óxidos de nitrogênio

eram reduzidos a N₂, sendo retido o excesso de O₂. Em seguida os gases foram conduzidos para uma coluna preenchida com perclorato de magnésio [Mg(ClO₄)₂] retendo o vapor de água. O CO₂ era retido em uma armadilha de carboxi, e por último uma coluna cromatográfica separava as impurezas do N₂. O efluente entrava no espectrofotômetro de massa atômica para análise do N-total e a razão ¹⁵N/¹⁴N por meio das intensidade das massas atômicas 28(¹⁴N¹⁴N), 29(¹⁵N¹⁴N) e 30(¹⁵N¹⁵N), sendo calculado automaticamente a abundância de ¹⁵N (% de átomos).

As determinações foram realizadas no Laboratório de Isótopos Estáveis do CENA /USP, Piracicaba, SP, em espectrômetro de massas contendo analisador automático para nitrogênio, modelo ANCA-SL, da Europa Scientific LTDA (Barrie & Prosser, 1996).

A contaminação microbiana do resíduo foram calculados da seguinte forma (Beckers et al., 1995):

$$\%Nbact = \frac{(^{15}\text{N } \%atm \text{ no resíduo} - ^{15}\text{N } \%atm \text{ no alimento}) \times 100}{(^{15}\text{N } \%atm \text{ no pool bacteriano} - ^{15}\text{N } \%atm \text{ no alimento})}$$

$$\%MSbact = \frac{\%Nbact \times \%N \text{ resíduo}}{\%N \text{ no pool bacteriano}}$$

onde:

%Nbact é a % de nitrogênio bacteriano no resíduo em relação ao nitrogênio total, %MSbact é a % de matéria seca microbiana no resíduo, ¹⁵N %atm é a % de átomos de ¹⁵N no resíduo, no alimento ou no *pool* bacteriano.

O excesso de ¹⁵N no resíduo para cálculo da contaminação microbiana foi calculado assumindo a abundância natural de cada alimento, determinado antes da incubação ruminal. Os valores da abundância natural de ¹⁵N em cada alimento foram de 0,367% para o farelo de algodão, farelo proteinoso de milho e sorgo, 0,366% para soja e milho e 0,365% para casca de soja.

3.2.6 Coleta de líquido ruminal

As coletas de líquido ruminal nos tempos de 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8 horas após a alimentação da manhã, ao término do período de incubação ruminal. Cerca de 500 gramas de conteúdo ruminal foi coletado, em cinco pontos diferentes no rúmen e peneirado em fralda de pano dobrada formando dupla camada.

O pH do líquido ruminal era imediatamente aferido após a colheita e filtragem do com potenciômetro digital portátil.

Cerca de 5 ml de líquido ruminal foram acondicionados em 2 tubos de ensaio, e imediatamente congelados. Um dos tubos era destinado as avaliações de ácidos graxos voláteis e outro para nitrogênio amoniacal.

As dietas foram fornecidas apenas pelo período da manhã, pois após as coletas de líquido ruminal os animais iniciavam o jejum completo para se submeterem a pesagem no dia seguinte

3.2.7 Determinação de nitrogênio amoniacal do rúmen

O princípio da técnica envolve a reação da amônia com hipoclorito e fenol na presença de catalizador (nitroprussiato de sódio) para formar indofenol (reação de Berthelot). A concentração da amônia é diretamente proporcional a absorbância de indofenol medida por colorimetria.

Na preparação das amostras para determinação das concentrações de amônia no líquido ruminal, foram colocados 2 ml de fluido ruminal em tubos de ensaios contendo 1 ml de ácido sulfúrico 1 N e armazenados sob refrigeração até a realização das análises. As determinações de amônia foram feitas segundo método proposto por Chaney & Marbach (1962), adaptado para leitura em leitor de microplaca (BIO-RAD, Hercules, CA, EUA) utilizando-se filtro para absorbância de 550 nm. As soluções padrões utilizadas foram de 0; 1; 2; 4; 8; 16; e 32 mg/dL de amônia. Foram utilizadas alíquotas de 40µl de amostra ou padrão incubados em banho-maria a 37 °C por 10 minutos, juntamente com 2,5

ml de reagente fenol e 2,0 ml de reagente hipoclorito. As amostras foram submetidas ao leitor de microplacas. Somente foram aceitos resultados provenientes de placas com $r^2 = 0,99$ e coeficiente de variação entre duplicatas $\leq 5\%$.

As avaliações de amônia ruminal foram realizadas no laboratório de análises químicas do Departamento de Nutrição e Produção Animal da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP.

3.2.8 Determinação de ácidos graxos voláteis

Uma alíquota de aproximadamente 100 ml de líquido ruminal foi centrifugada a 3500 rpm por 15 minutos; 1 ml do sobrenadante foi colocado em tubo de ensaio contendo 0,2 ml de ácido fórmico P.A., sendo armazenado à -20°C até o momento da análise.

A determinação de ácidos graxos voláteis foi feita, em duplicata, por cromatografia gasosa (Modelo 9001 Gas Chromatograph, Marca Finnigan) equipado com coluna de vidro de 02 metros de comprimento x 1/4", empacotada com 80/120 Carbopack B-DA/4% Carbowax 20M. Os gases utilizados foram o nitrogênio, como gás de arraste na vazão de 25 ml/minuto, oxigênio, como gás comburente na vazão de 175 ml/minuto, e hidrogênio, como gás combustível na vazão de 15 ml/minuto. As temperaturas utilizadas para operação foram, do vaporizador 240°C, da coluna de separação iniciou-se com 175 °C aumentando 10 °C por minuto até 205 °C e detector de ionização de chamas 260 °C, segundo método preconizado por Erwin et al. (1961), no laboratório de análises químicas do Departamento de Nutrição e Produção Animal (VNP) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), campus Pirassununga".

As determinações foram realizadas injetando-se 01 micrometro de amostra em cromatografo, integrado a um computador, que processava os

cálculos de quantificação, utilizando-se do software BORWIN versão 1.21 para cromatografia.

3.2.9 Análise Bromatológica

As amostras dos alimentos determinadas para os seguintes componentes: matéria seca a 105°C (MS), matéria mineral (MM), extrato etéreo (EE), proteína bruta (PB) através do método micro Keejdahl (A.O.A.C., 1990), fibra detergente neutro (FDN) e fibra detergente ácido (FDA; Van Soest, et al, 1991).

3.2.10 Análise estatística

A análise estatística da contaminação microbiana e das características de fermentação ruminal foram realizadas através da análise de medidas repetidas pelo procedimento Mixed do programa computacional Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., 1999), testando-se efeitos de alimento, tempo e suas interações. A comparação das médias foi feita através do teste de tukey ajustado.

3.3 Resultados e discussão

A proporção de ^{15}N e o teor de N encontrado no *pool* bacteriano após 4 dias da infusão foi em média de 0,527% e 6,71% da MS, respectivamente, não havendo diferenças significativas entre tratamentos e períodos (Tabela 3). A abundância natural do isótopo ^{15}N é de 0,366 %, desta forma o enriquecimento médio foi de 0,161%. Gonzales et al. (1998) observaram proporção de ^{15}N nas bactérias de 0,521% e teor de nitrogênio de 7,03%. Valores próximos aos observados no presente trabalho. Por outro lado os valores de enriquecimento do ^{15}N encontrados por Beckers et al (1995) foram mais elevados que o do

presente trabalho, sendo de 0,243 e 0,194% para bactéria associadas a fração líquida e a fração sólida, respectivamente.

Tabela 3. Teor de nitrogênio, proteína bruta e abundância isotópica do *pool* de bactérias do rúmen de bovinos nelore recebendo diferente proporções de volumoso e concentrado (V:C)

Tratamento (V:C)	N (%MS)	PB(%MS)	¹⁵ N (% atm)
80:20	6,64	41,48	0,537
60:40	6,63	41,44	0,530
40:60	6,87	42,96	0,515
Média	6,71	41,96	0,527

Os valores de N determinados nas bactérias isoladas no rúmen foi de 6,71% N, valor aproximadamente 13,0% menor que o recomendado pelo NRC (1985). A composição química da bactéria varia com o tempo após a alimentação, nível e frequência do fornecimento da dieta e taxa e estágio de crescimento das bactérias. Segundo Clark et al. (1992) a composição química das bactérias isoladas no rúmen de vacas podem diferir de maneira significativa em função da dieta. Em sua revisão %Nbact em 441 trabalhos variou de 4,8 a 10,9%, estando os resultados no trabalho atual dentro deste intervalo.

A análise de variância indicou efeitos significativos para contaminação de nitrogênio (%Nbact) e matéria seca de origem bacteriana (%MSbact) nos resíduos após diferentes tempos de incubação ruminal ($P < 0,05$), não sendo observada diferenças entre as dietas ($P > 0,05$). De modo semelhante Dixon e Chanchai (2000) trabalhando com ovinos e fornecendo dietas apenas de feno de alfafa e aveia, ou com a adição de grãos de cevada, não observaram influência da dieta na proporção de nitrogênio bacteriano, porém houve efeito do tipo de alimento incubado.

As análises das médias para %MSbact e %Nbact nos resíduos nos diferentes tempos de incubação são apresentadas nas tabelas 4 e 5, respectivamente.

Tabela 4. Contaminação de matéria seca bacteriana (%MSbact) nos resíduos após diversos tempos de incubação ruminal de alguns alimentos

Tempo h	Milho	Sorgo	Casca de soja	f. soja	f. Algodão	f. proteinoso de milho
%MSbact ¹						
3	1,8	1,5 ^{ab}	2,0 ^a	2,4 ^{ab}	2,6	2,0 ^a
6	2,0	1,6 ^{ab}	1,4 ^a	2,2 ^{ab}	2,4	1,6 ^a
12	1,2	1,1 ^b	1,4 ^a	1,7 ^b	1,9	1,3 ^a
24	2,0	2,2 ^{ab}	3,8 ^b	2,9 ^a	2,7	2,2 ^a
48	2,1	2,7 ^a	3,6 ^b	2,1 ^{ab}	2,3	5,0 ^b
60	-		3,5 ^b		-	4,1 ^b
EPM ²	0,3	0,3	0,4	0,4	0,4	0,5

¹ Matéria seca bacteriana/matéria seca resíduo; ² Erro padrão da média

a, b, c Médias seguidas por letras sobrescritas distintas na mesma coluna são diferentes estatisticamente (P<0,05).

Tabela 5. Contaminação nitrogênio bacteriana (%N-bact/N-total) nos resíduos após diversos tempos de incubação ruminal de alguns alimentos

Tempo h	Milho	Sorgo	Casca de soja	f. soja	f. Algodão	f. proteinoso de milho
%Nbact ¹						
3	4,7 ^{ab}	3,7 ^a	8,9 ^{bc}	1,8 ^{ab}	4,1 ^a	5,9 ^c
6	5,2 ^{ab}	2,6 ^a	6,5 ^c	1,4 ^{ab}	3,3 ^a	5,8 ^c
12	4,3 ^b	3,2 ^a	7,2 ^c	1,2 ^a	3,9 ^a	6,9 ^c
24	8,4 ^c	6,1 ^b	16,8 ^a	2,9 ^b	7,5 ^b	11,2 ^b
48	15,5 ^d	6,8 ^b	13,1 ^{ab}	4,7 ^c	8,9 ^b	21,0 ^a
60			11,4 ^{abc}		-	15,6 ^{ab}
EPM ²	1,1	0,6	2,2	0,6	0,6	2,1

¹ N-bacteriano/N-resíduo; ² Erro padrão da média

a, b, c Médias seguidas por letras sobrescritas distintas na mesma coluna são diferentes estatisticamente (P<0,05).

Alexandrov (1998) encontrou padrão de contaminação de nitrogênio bacteriano no resíduo de milho semelhante ao do presente trabalho, porém os valores encontrados para 24 h e 48 h de incubação ruminal foram de 18,0 e 40,0 %Nbact, respectivamente. Os valores encontrados pelos autores citados

para %MSbact no resíduo variou de 1,0 a 6,1 para os tempos de incubação de 2 e 48 h, respectivamente.

Wanderley et al. (1993) usando a técnica de diluição isotópica com o isótopo estável de ^{15}N , porém trabalhando com alimentos enriquecidos através da fertilização com $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, observaram aumento linear na %Nbact no resíduo de milho de 8 a 31%Nbact (3 e 48 h de incubação, respectivamente). Valores estes bem superiores ao do presente trabalho.

A contaminação bacteriana dos resíduos de milho foi maior nos tempos de 24 e 48 h (8,4 e 15,5 %Nbact, $P < 0,05$). A %MSbact não mostrou variações nos tempos de exposição ruminal, dessa forma a proporção de nitrogênio bacteriano aumentou em função do desaparecimento da proteína do alimento.

Os resíduos de sorgo apresentaram a maior %Nbact com 24 e 48 h (6,8 e 6,1 %Nbact), e a %MSbact foi diferente apenas entre os tempos de incubação de 12 e 48 h ($1,1 \times 2,7\%$ MSbact, $P < 0,05$).

A casca de soja teve uma rápida contaminação microbiana com 3h de exposição ruminal do alimento, tendo um pico com 24h (16,8%), reduzindo-se nos tempos subseqüentes (48 e 60h). A %MSbact nos resíduos apresentaram as mesmas tendências que o %Nbact.

Devido ao maior teor de proteína dos resíduos do farelo de soja, este apresentou menores proporções de Nbact em relação ao milho, sendo que a maior contaminação de nitrogênio de origem bacteriana no resíduo ocorreu apenas após 48 h de exposição (4,7%, $P < 0,05$), quando quase que praticamente toda a proteína da soja fora degradada. A %MSbact do resíduo não apresentou variações ao longo do tempo, exceto entre 12 e 24h ($1,7 \times 2,9\%$ MSbact, $P < 0,05$).

Os valores de contaminação microbiana encontrados neste trabalho, especialmente nos resíduos do farelo de soja, foram inferiores aos descritos por Beckers et al. (1995), que observaram que a contaminação microbiana do farelo de soja e no farelo de trigo aumentou linearmente até 32 e 50 %Nbact com o tempo de incubação de 48h, respectivamente. A farinha de carne e ossos

manteve valores constantes de colonização (5%Nbact) durante o período de incubação ruminal.

As contaminações encontradas nos resíduos alimentares do presente trabalho foram inferiores aos relatados por Wanderley et al. (1993), Beckers et al. (1995) e Alexandrov et al. (1998). Possivelmente esta diferença pode estar relacionada aos valores de N na composição bacteriana utilizados por aqueles autores, que adotaram 7,6 %N (NRC, 1985), enquanto que em nosso trabalho os teores de N utilizados foram os determinados após isolamento do *pool* bacteriano.

A contaminação do resíduo de farelo de algodão com N bacteriano apresentou maiores valores ($P < 0,05$) para 24 e 48 h de incubação (7,5 e 8,9% do N-total), em relação aos outros tempos (3, 6, 12). Entretanto não houve diferença significativa para os valores de %MSbact no resíduo. A menor proporção de N-bacteriano nos tempos iniciais é função da maior concentração de PB da amostra (Varvikko, 1986; Wanderley et al., 1993), aumentando ao longo do tempo com o desaparecimento desta. Provavelmente, em função da baixa degradabilidade dos constituintes da parede celular do farelo de algodão, diferente da fração protéica, não houve um correspondente aumento na MS microbiana.

O farelo proteinoso de milho apresentou um aumento significativo na %N microbiana após 24h e 48h de exposição ruminal (11,2 e 21,0%), com diminuição após 60h (15,6%). A %MSbact no resíduo foi maior com o tempo de 48h e 60h (5,0 e 4,1%). O aumento na contaminação do resíduo com 24 e 48h pode ser explicado pela alta solubilidade da proteína do produto aumentando a relação Nbact/Ntotal.

Nocek (1985), usando o DAPA como marcador mostrou que a %Nbact no resíduo do farelo de soja apresentou um comportamento quadrático ao longo dos períodos de incubação, com uma rápida contaminação microbiana durante as primeiras 4 horas de incubação, e o pico com 12 h de incubação. De forma semelhante Wanderley et al. (1993) e Perez et al. (1996) observaram que a

contaminação de bactéria nos resíduos dos alimentos estudados foi rápida entre 12 e 24 h, com diminuição após 24 e 48h.

As observações apresentadas na tabela 5 estão de acordo com os autores supracitados, sendo que a maior contaminação microbiana para os resíduos de milho, casca de soja, sorgo e farelo de algodão foi maior entre 12 e 24 h. Já os resíduos da soja e do farelo proteinoso do milho apresentaram elevada contaminação entre 12 até 48 h.

Segundo Nocek (1985) e posteriormente Gonzales et al. (1998), as bactérias continuam a se aderir as partículas até que os sítios de adesão sejam saturados. Após o máximo de contaminação microbiana na casca de soja (24h) e no farelo proteinoso de milho (48h) houve redução na proporção de Nbact no resíduo, talvez pelo esgotamento de tais sítios, e aumento na concentração da proteína (proteína de baixa degradabilidade ruminal) do alimento em relação ao resíduo dos saquinhos. Segundo Church (1990) conforme digestão vai ocorrendo, a população bacteriana aderida se multiplica no substrato até que as células se soltam do resíduo em busca de recolonizar novo substrato ou sair do rúmen. A redução na proporção de bactérias aderidas ao resíduo também poderia ser observado nos demais alimentos, desde que houvesse tempo adicional de incubação.

A contaminação bacteriana de cada alimento, quando expostos ao ambiente ruminal, ocorre de maneira diferente principalmente devido à composição química de cada ingrediente em particular, sendo que alimentos mais fibrosos e com menor teor de N tendem a apresentar maior %Nbact (Varvikko et al., 1986; Wanderley et al. 1993; Perez et al., 1996; Alexandrov, 1998).

As alterações no pH do líquido ruminal apresentaram interação entre tratamento e tempo de avaliação ($P < 0,05$, tabela 6). Os resultados demonstram rápida queda ($P < 0,05$) com 1 e 2 h após a alimentação para o tratamento com 60% de concentrado ($P < 0,05$), em relação as outras duas proporções de

concentrado. Esta rápida queda do pH se deve a degradação dos ingredientes altamente fermentecíveis do concentrado, como o milho.

Os tratamentos com 20 e 40% de concentrado apresentaram valores similares de pH ($P>0,05$) durante todos os tempos de coleta de líquido ruminal após a alimentação. Apenas nas determinações feitas com 3 e 4 h os animais recebendo 40 % de concentrado apresentaram pH intermediário ($P<0,05$) as proporções de 20 e 60 % de concentrado. As mensurações de pH ao longo dos diferentes períodos após a alimentação refletiram em médias menores para o tratamento 60 % em relação a 20 e 40 % ($6,5 \times 6,7$ and $6,8$; $P<0,05$).

Tabela 6. Efeitos de diferentes proporções de concentrado no pH do líquido ruminal de bovinos Nelore

Tratamento	Tempo							Média
	0	1	2	3	4	6	8	
80:20	6,9	6,9 ^a	6,8 ^a	6,8 ^a	6,7 ^a	6,6	6,9 ^a	6,8 ^a
60:40	6,9	6,9 ^a	6,8 ^a	6,6 ^a	6,6 ^{ab}	6,6	6,8 ^a	6,7 ^a
40:60	6,8	6,6 ^b	6,5 ^b	6,4 ^b	6,4 ^b	6,3	6,5 ^b	6,5 ^b
Média	6,9	6,8	6,7	6,6	6,6	6,7	6,7	-

^{a,b} médias na mesma coluna seguidas por letras distintas são significativamente diferentes ($P<0,05$)

Detmann et al. (2001) não encontraram diferenças entre as fontes de energia, milho (amido) ou farelo de trigo (fibra de alta digestão), e nem das quantidades de suplementos (1 ou 2 kg por cabeça por dia) sobre os valores de pH ruminal. O único efeito significativo foi o horário de coleta, onde se observou valor mínimo de 6,32, ocorrendo 3,2 horas após a suplementação. Observação esta condizentes com os resultados da tabela 6, especialmente para os tratamentos com 60 e 40% de concentrado.

Já para o tratamento com 20 % de concentrado o menor valor ocorreu após 6 h da alimentação, indicando que para este tratamento o que afetou a redução do pH foi a fermentação da forragem que a do concentrado. De forma semelhante, Soriano et al. (2000) sugeriram que as reduções no pH do líquido

ruminal foram afetadas mais pela fermentação da forragem que pela fermentação do amido contido nos suplementos.

Sabe-se que o pH é um dos fatores de maior importância na eficiência de crescimento dos microrganismos e que pode afetar a adesão destes as partículas dos alimentos (Church, 1990). No presente trabalho, pode-se observar que os valores de pH, mesmo para a maior proporção de concentrado na dieta esteve acima do valor mínimo (6,2) para a ótima função ruminal (Dixon & Stockdale, 1999). Pode-se especular, em função da ausência de efeitos de tratamento para %Msbact e %Nbact (Tabelas 4 e 5, respectivamente) nos resíduos, não houve nenhum efeito negativo quanto a capacidade de adesão microbiana (tabela 4 e 5), podendo estender estas suposições e inferir que a proliferação bacteriana também não tenha sido afetada.

Na tabela 7 são apresentados as concentrações totais de AGV's no fluido ruminal, bem como as proporções individuais de cada AGV. As concentrações totais dos AGV's foi maior ($P < 0,05$) para o tratamento com 60 % de após 2 h da alimentação em relação ao tratamento com 20%. No entanto apesar de não ter sido observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) nos outros tempos após a alimentação, a concentração dos AGV's sempre apresentaram numericamente maiores valores em relação aos outros tratamentos. Esta tendência refletiu na média final em concentrações superiores ($P < 0,05$) para o tratamento com 60 % em relação aos tratamentos com 20 e 40% de concentrado (91,4 x 71,7 e 79,7 mM/ml, respectivamente).

Os menores valores observados para o pH do líquido ruminal dos animais quando consumiram 60% de concentrado, muito provavelmente está diretamente relacionada com as maiores produções de ácidos graxos voláteis, além do provável aumento na produção de lactato (Dixon & Stockdale 1999), que no presente trabalho não foi avaliado.

Tabela 9. Efeitos de diferentes proporções de concentrado, na produção de ácidos graxos voláteis (mM/ml), nas proporções molares (%mM) de ácido acético, ácido propiônico, ácido butírico e na relação do ácido acético:propiônico no líquido ruminal de bovinos Nelore

Tratamento	Tempo							Media
	0	1	2	3	4	6	8	
AGV totais (mM/ml)								
80:20	66,1	79,2	75,6 ^a	76,3	80,3	70,2	53,7	71,7 ^a
60:40	69,0	83,5	87,2 ^{ab}	87,8	85,7	75,3	62,3	79,7 ^a
40:60	75,6	92,1	106,0 ^b	96,2	95,1	89,2	78,9	91,4 ^b
Média	70,4	84,9	89,6	86,8	87,0	78,2	65,0	-
Ácido acético (%mM)								
80:20	76,1	68,3	69,6 ^a	68,0	64,8	70,3	75,5	70,4 ^a
60:40	79,4	68,4	65,0 ^{ab}	65,9	67,0	70,5	75,7	70,2 ^a
40:60	75,5	62,8	62,3 ^b	63,5	64,3	67,5	72,4	66,9 ^b
Média	77,0	66,5	65,6	65,8	65,4	69,5	74,5	-
Ácido propiônico (%mM)								
80:20	15,3	20,7	19,9 ^a	21,7	22,9	18,3	16,0	19,3 ^a
60:40	13,1	21,3	22,8 ^{ab}	21,7	20,9	18,3	16,2	19,2 ^a
40:60	14,4	24,9	24,4 ^b	23,3	21,8	20,7	17,9	21,0 ^b
Média	14,3	22,3	22,4	22,2	21,9	19,1	16,7	-
Ácido butírico (%mM)								
80:20	8,6	10,9	10,5	10,3	12,5	11,3	8,4	10,4 ^a
60:40	7,5	10,2	13,5	12,3	12,4	11,2	8,2	10,8 ^{ab}
40:60	10,3	12,4	13,5	13,4	17,8	11,8	9,9	12,8 ^b
Média	8,8	11,2	12,5	12,0	14,2	11,4	8,8	-
Acético:propiônico								
80:20	5,1 ^a	3,3	3,5	3,1	2,9	3,9	4,8	3,8 ^a
60:40	6,3 ^a	3,2	2,9	3,1	3,3	3,9	4,7	3,9 ^a
40:60	5,3 ^b	2,6	2,6	2,8	3,0	3,3	4,1	3,4 ^b
Média	5,6	3,1	3,0	3,0	3,0	3,7	4,5	-

^{a,b} médias na mesma coluna seguidas por letras distintas são significativamente diferentes (P<0,05)

De maneira semelhante às concentrações totais de AGV's, as proporções individuais de cada ácido graxo, exceto para o ácido butírico, ao longo dos diferentes períodos pós alimentação. As proporção molar de ácido acético foi menor para o tratamento 60% em relação ao tratamento 20% (62,3 x 69,6%, $P < 0,05$), enquanto o tratamento 40% apresentou proporções intermediárias (65,0%). A média geral ao longo dos tempos de coleta indicou menores proporções de ácido acético para o tratamento 60% em relação aos com 20 e 40% de concentrado (66,9 x 70,2 e 70,4%, $P < 0,05$).

A redução da proporção de ácido acético em relação ao aumento ao tratamento com maior proporção de concentrado, esta diretamente relacionado com o aumento de proporção de ácido propiónico, onde o tratamento 60% apresentou maiores proporções que o tratamento com 20% de concentrado (24,4 x 19,9%, $P < 0,05$). Na média geral as maiores proporções foram observados para o tratamento 60 em relação a 20 e 40% (19,3, 19,2 x 21,0%, $P < 0,05$).

Quanto a proporção molar de ácido butírico só foi possível observar efeitos significativos para média geral dos tempos de coleta de líquido ruminal, onde o fornecimento de 60% de concentrado promoveu aumento em relação ao tratamento 20% (12,8 X 10,4, $P < 0,05$), e os valores para os animais recebendo 40% de concentrado foram intermediários. Grigsby et al. (1997) observaram aumento nos níveis de ácido butírico, com o incremento da dose de amido em substituição à fibra da casca de soja, em suplementos fornecidos para bovinos alimentados com feno de baixo valor nutritivo. Elizalde et al. (1999) observou incrementos lineares nas concentrações de ácido butírico com aumento no fornecimento de milho moído para animais consumindo alfafa como volumoso.

Heldt et al. (1999a) e Heldt et al. (1999b) observaram maiores proporções de ácido propiónico e ácido butírico e diminuição de ácido acético com a suplementação de bovinos com diferentes fontes de carboidratos. Os autores mencionam sobre uma relação inversa entre a produção de acetato e butirato, que seria razoável em função de ambos os ácidos graxos serem derivados da

acetilCOA. Satter & Esdale (1968) referem-se que o aumento de lactato no rúmen e seu metabolismo por outras bactérias ruminais, estaria associado em parte ao aumento do propionato e do butirato.

Em algumas condições as dietas com concentrados podem aumentar a população de algumas espécies de protozoários, que podem estar associados a ao aumento da produção de butirato (Veira, 1986, Church, 1990).

A relação acetato propionato apresentou diferenças significativas apenas para o tempo 0, onde o tratamento 60% apresentou a menor relação ($P < 0,05$) que os animais recebendo 20 e 40% de concentrado. Apesar da ausência de diferenças estatísticas entre os tratamentos no demais tempos de colheita de líquido ruminal, os animais recebendo 60% de concentrado apresentaram uma diferença numérica com menores valores para a relação acetato:propionato. Estas diferenças numéricas, por fim refletiram em menores valores médios de todos os tempos para o tratamento 60% quando comparado com 20 e 40% (3,4 X 3,8 e 3,9, $P < 0,05$). Isto se deve basicamente pelo aumento na proporção de ácido propiônico e diminuição do ácido acético em função da fermentação de carboidratos não estruturais.

A alimentação com concentrado rico em grãos reduz a proporção molar de ácido acético e aumenta a proporção molar de ácido propiônico no fluido ruminal de animais (Church 1990, Van Soest, 1994), reduzindo a relação acetato:propionato (Church, 1990).

As concentrações de nitrogênio amoniacal ($N-NH_3$) no líquido ruminal ao longo do tempo após alimentação são apresentados na Tabela 8. A análise de variância indicou efeito altamente significativo da interação entre tratamento e tempo após alimentação ($P = 0,0001$). No entanto as diferenças entre tratamentos foram detectadas apenas com 2 horas após a alimentação, onde as concentrações de $N-NH_3$ foram maiores para os tratamentos 20 e 40% em relação ao 60% de concentrado (18,2, 19,7 x 12,9 mg/L, $P < 0,05$). A média geral manteve as mesmas tendências, onde os tratamentos 20 e 40%

apresentaram concentrações de N-NH_3 superiores ao 60% (11,3 e 11,3 x 9,0 mg/L, $P < 0,05$).

Tabela 8. Efeitos de diferentes proporções de concentrado na concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH_3 mg/L) no líquido ruminal de bovinos Nelore

Tratamento	Tempo							Media
	0	1	2	3	4	6	8	
	mg/L							
80:20	6,3	17,4	18,2 ^a	17,0	14,2	4,2	2,1	11,3 ^a
60:40	6,3	14,3	19,7 ^a	17,3	14,7	4,0	2,5	11,3 ^a
40:60	5,7	12,1	12,9 ^b	12,7	11,8	5,3	2,6	9,0 ^b
Media	6,1	14,5	16,9	15,7	13,6	4,5	2,4	-

^{a,b} medias na mesma coluna seguidas por letras distintas são significativamente diferentes ($P < 0,05$)

O pico de produção de amônia ocorreu após 2 horas do fornecimento dos alimentos, mantendo-se relativamente elevadas até 4 h após a alimentação dos animais. Segundo Church (1990) o pico em dietas com uréia se dá em torno de 1-2 h, e dietas com grande quantidade de proteína vegetal o pico se dá entre 3 a 5 h. As concentrações de amônia ao longo do tempo manteve-se acima da concentração mínima (2 a 5 mg/L) propostos por Satter & Roffler (1979) para ótima atividade microbiana.

Aparentemente, os tratamentos com 20 e 40% de concentrado apresentaram maiores concentrações de amônia, em função da menor eficiência de utilização da amônia pelas bactérias ruminais. A concentração de nitrogênio amoniacal no rúmen, depende da degradabilidade da proteína da fonte protéica utilizada, e do equilíbrio entre sua produção e utilização pelos microrganismos.

Para otimização da síntese de proteína microbiana é necessária a sincronização entre fermentação dos carboidratos com a degradação das proteína (Firkins, 1996), desta forma a concentração de N-NH_3 no rúmen

depende basicamente da degradabilidade da proteína, disponibilidade de carboidratos (Satter & Roffler, 1979, Nocek & Russell, 1988; Church, 1990, Russel et al., 1992; Firkins, 1996) e do equilíbrio entre sua produção e utilização pelos microrganismos.

Muito provavelmente a menor eficiência no uso do nitrogênio amoniacal ocorreu devido a possível deficiência de energia (carboidratos) na dieta. Os microrganismos dependem da energia oriunda da fermentação dos carboidratos para a biosíntese de proteína microbiana, caso contrário os peptídeos e aminoácidos passam a ser utilizados como fontes de energia, ocorrendo acúmulo de amônia no meio (Russell et al., 1992).

Um efeito marcante do pH na fermentação ruminal seria sobre as perdas de nitrogênio amoniacal, que são mais elevadas quando há condição de acidez ruminal, ocasionadas pela redução na taxa de degradação da fibra (Hoover 1986). Isto no entanto não é o caso em relação as observações feitas acima para os tratamentos 20 e 40%, pois o pH esteve sempre acima de 6,5 nestes tratamentos.

3.4 Conclusões

O aumento na proporção de nitrogênio bacteriano nos resíduos de 24 e 48 h pode ser explicado pela perda de substrato (proteína), que diminuiu a diluição do ^{15}N microbiano, desta forma aumentando a % Nitrogênio bacteriano no resíduo. A contaminação do resíduo de incubação ruminal aumentou, de forma geral, com o tempo de exposição ruminal, porém a intensidade com que ocorreu variou em função da estrutura física e composição química dos ingredientes avaliados. A ausência de efeitos de tratamentos para determinação da contaminação microbiana pode ser explicada pelas pequenas alterações em relação ao ambiente ruminal, sendo que as mais significativas ocorreram nas dietas com 60% de concentrado, com menores valores de pH, porém dentro da amplitude aceitável para a ótima atividade ruminal. Este menor pH ocorreu em

decorrência da maior produção de ácidos graxos voláteis. Nesta variável destaca-se a alteração nas proporções individuais, onde houve diminuição relativa de ácido acético, e aumento de ácido propiónico e butírico no tratamento com 60% de concentrado. Os maiores valores de amônia encontrados para os tratamentos com 20 e 40% de concentrado indicam uma baixa eficiência de uso do nitrogênio pelos microrganismos ruminais, que provavelmente ocorreu devido a baixa disponibilidade de carboidratos.

4 EFEITO DA DIFERENTES PROPORÇÕES DE CONCENTRADO NA CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DOS ALIMENTOS CORRIGIDOS OU NÃO PARA CONTAMINAÇÃO MICROBIANA.

Resumo

Foram utilizados seis bovinos Nelore canulados no rúmen dispostos em quadrado latino duplo 3x3 com repetição, com o objetivo de avaliar os efeitos de diferentes proporções de concentrado (20, 40 e 60%) na dieta sobre a degradação de diferentes fontes alimentares com ou sem correção para contaminação microbiana. Os alimentos testados foram farelo de soja, farelo de algodão, milho, sorgo, casca de soja e farelo de glúten de milho. As incubações ruminais dos saquinhos para as avaliações das degradabilidade da MS e PB foram feitas às 0, 3, 6, 12, 24, 48h, e concomitantemente, foram realizadas infusões ruminais de ^{15}N para determinação da contaminação microbiana através da diluição isotópica nos tempos de incubação ruminal. A casca de soja apresentou valores de degradabilidade efetiva (DE) da PB corrigida para contaminação microbiana maiores ($P < 0,10$) para todas as taxas de passagem que as estimativas feitas sem correção. O milho teve efeito maior ($P < 0,05$) DE para o tratamento com 60% de concentrado para MS (2,0, 5,0 e 8,0%/h), e para PB ($k_p = 8,0$ %/h). As DE's da PB do farelo proteinoso de milho com k_p de 2, 5 e 8%/h apresentaram efeito significativos ($P < 0,10$) para correção da contaminação microbiana do resíduo. O farelo de soja apresentou efeito de tratamento ($P < 0,10$) para a DE da MS com k_p de 5,0 e 8,0%/h e da PB com k_p de 8,0%/h, sendo menor os valores ($P < 0,10$) para o tratamento com 60% de concentrado. A correção do resíduo do farelo de algodão para contaminação

microbiano apresentou efeito significativo ($P<0,10$) na DE da MS para todas as taxas de passagem e na DE da PB apenas para k_p de 2%/h. Os maiores valores ($P<0,10$) para digestibilidade intestinal da PNDR foram observados para casca de soja (81,7%), milho (87,1%) e sorgo (82,4%), enquanto que os menores foram os do farelo proteinoso de milho (57,6%) e do farelo de soja (53,4%, $P<0,10$), e o farelo de algodão (70,9%) valor intermediário. A digestibilidade total da proteína dos alimentos diferiram entre si ($P<0,10$), sendo que apenas o milho e o farelo proteinoso de milho apresentaram digestibilidade semelhantes ($P>0,10$).

Effects of different concentrate ratios on rumen degradation kinetics of feedstuffs corrected or not for microbial contamination

Summary

Six rumen cannulated Nelore steer were used in replicated latin square design (3 x 3), with the objective of analyze the effects of different ratios of concentrate (20, 40, 60%) on *in situ* ruminal degradation kinetics corrected or not for the microbial contamination or. The tested feed were soy bean hulls, corn, sorghum grain, soy bean meal, cottonseed meal and corn gluten feed. The soy bean hulls had higher rumen effective degradability when corrected for microbial contamination ($P<0,10$) for all estimated passages rates. The corn had higher rumen dry matter effective degradability (ED, $P<0,10$) with animals on 60% concentrated treatment, and the crude protein (CP) were higher ($P<0,010$) only with passage rates of 5%/h. The CP effective degradability of the corn gluten feed showed a significant difference when corrected for microbial nitrogen contamination ($P<0,10$). The dry matter ED of soy bean meal of animal on 60% concentrate diet showed lower values with passage rates of 5 and 8%/h. The microbial contamination correction of the cottonseed meal residues had a significant effect ($P<0,10$) of dry matter ED with all the passage rates, and for

the CP were significant only with estimates of 2%/h. The *in vitro* intestinal digestibilities rumen undegradable protein (RUP) were higher ($P<0,10$) to soy bean hulls (81,7%), corn (87,1%) and sorghum (82,4%) than corn gluten meal (57,6). The total digestibility estimate (rumen and intestine) were different ($P<10$) and only corn and corn gluten meal ha similar values.

4.1 Introdução

A digestão em ruminantes é um sistema complexo, envolvendo a atividade simbiótica de microrganismos com o hospedeiro. A eficiência dessa simbiose é altamente susceptível a alterações do meio. Os sistemas de avaliação e formulação de dietas têm aprimorado os modelos usando de informações sobre cinética da degradação das diferentes frações dos alimentos, e suas implicações nos padrões de fermentação, síntese de proteína microbiana e sobre a disponibilidade e qualidade dos compostos a serem absorvidos.

Os trabalhos realizados nos últimos anos têm demonstrado que a taxa e a quantidade de nutrientes degradados no rúmen podem ter grande impacto nos produtos finais da fermentação ruminal, e consequentemente no desempenho animal. Com isto, nos últimos anos, nutricionistas vêm buscando balancear e sincronizar a degradação das frações nitrogenadas e de carboidratos. Se a taxa de degradação de proteína exceder a de carboidratos, grande quantidade de nitrogênio pode ser perdida na forma de amônia. Por outro lado, se a degradação de carboidratos for maior que a de proteína, a síntese microbiana vai ser menor (Russell et al., 1992; Van Kessel e Russell, 1996). A extensão com que os nutrientes são degradados é determinada estreitamente pela competição entre taxa de degradação e de passagem, sendo que o conhecimento de ambas é necessário para estimar a quantidade de energia e proteína disponíveis no rúmen (Russell et al., 1992).

Sistemas de formulação de ração requerem informações, não só das exigências do animal, mas também das frações realmente disponíveis dos nutrientes de cada alimento. As metodologias adotadas pelos principais modelos (AFRC, 1995; INRA, 1989; NRC 1984, 2000, 2001) para determinação da cinética de degradação da proteína no rúmen têm sido os métodos *in situ* com sacolas de nylon e os *in vitro*.

O método *in situ*, apesar das grandes variações entre laboratórios (Broderick & Cochran, 2000) é o mais utilizado. O modelo matemático exponencial proposto por Ørskov & McDonald (1979) é comumente usado para descrever a cinética de degradação ruminal dos alimentos. As constantes matemáticas identificadas no modelo podem ser interpretadas como porção solúvel (a) e potencialmente degradável (b), e a taxa de degradação desta fração (c). Para estimar a degradabilidade efetiva pelo modelo usa-se a taxa de passagem do alimento, podendo usar um valor determinado experimentalmente ou um pré-estabelecido.

O NRC (2001) para gado leiteiro adotou o método *in situ* para identificar e estimar as três frações nitrogenadas, definidas como A, B e C, e a taxa de degradação (k_d) da fração B. Onde A representa o NNP, a proteína rapidamente solubilizada e a proteína presente no alimento em partículas menores que a porosidade dos sacos de nylon/poliéster usados nos ensaios. A fração B corresponde à proteína potencialmente degradável, cuja extensão de degradação depende da taxa de degradação (K_d) e da taxa de passagem (K_p). A fração C é definida como sendo a fração de proteína indisponível para degradação ruminal.

Valores de degradação obtidos pela metodologia *in situ* apresentam grandes variações entre laboratórios. É importante uma padronização da metodologia com relação às principais fontes de erros, como tamanho de partícula, tamanho do saquinho e dos poros, e material usado na confecção dos sacos (Vanzant et al. 1998; Broderick & Cochran, 2000).

Segundo revisão feita por Vanzant et al. (1998) e mais recentemente por Broderick e Cochran (2000), uma outra importante fonte de erro da técnica *in situ* é a contaminação microbiana do resíduo, podendo levar a subestimativas da degradabilidade da MS e principalmente da proteína bruta.

Os objetivos do presente trabalho foram avaliar, os efeitos das diferentes proporções de concentrado na cinética de degradação de diversos alimentos usando a metodologia *in situ*, com ou sem correção para contaminação microbiana dos resíduos, e estimar a digestibilidade intestinal *in vitro* da PB não degradada no rúmen.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Animais e dieta experimental

O trabalho foi realizado na Estação Experimental Central do Instituto de Zootecnia, localizado no município de Nova Odessa, SP. Foram utilizados seis bovinos Nelore providos de fistula ruminal com peso inicial de aproximadamente 380kg, alojados em gaiolas de metabolismo, em um delineamento do tipo Quadrado Latino 3 x 3, com duas repetições por tratamento em cada período. No primeiro período experimental os 6 animais foram distribuídos por sorteio para os diferentes tratamentos, sendo 2 animais para cada tratamento, e nos períodos subsequentes os animais mudavam de tratamento.

Os tratamentos testados foram: **80:20-** 80% de volumoso e 20% de concentrado, **60:40-** 60% de volumoso e 40% de concentrado ou **40:60-** 40% de volumoso e 60% de concentrado. O volumoso utilizado foi a silagem de milho, e no concentrado utilizou-se milho triturado, farelo de soja, farelo de algodão, casca de soja, sorgo em grão moído e farelo proteinoso de milho. Os alimentos bem como as proporções de concentrado utilizadas foram escolhidas pois são tipicamente utilizadas em confinamentos no Brasil para bovinos Nelore.

Na Tabela 1 são apresentadas as composições químicas de cada ingrediente utilizados na formulação das diferentes dietas (Tabela 2), balanceadas em função dos tratamentos.

Tabela 1. Composição química dos ingredientes

Alimento	MS	PB	EE	FDN	FDA	PBFDA (%PB)	Lig	MM
Milho	87,5	10,4	4,3	25,6	5,1	6,8	1,1	1,1
Casca de soja	89,7	13,6	3,1	69,0	51,7	3,7	2,2	4,6
Sorgo	84,4	10,1	2,5	32,6	7,3	5,6	4,5	1,6
F. p. Milho	90,4	25,7	3,0	44,6	10,9	10,3	1,2	5,0
F. soja	90,3	54,5	0,7	16,6	11,6	4,3	0,8	6,5
F. algodão	92,2	37,0	1,1	51,5	33,7	9,3	14,8	5,1
Silagem de milho	29,1	8,3	1,6	61,2	32,9	-	2,7	5,3

MS- Matéria seca; PB-Proteína bruta, EE- Extrato etéreo. FDN- Fibra em detergente neutro, FDA- Fibra em detergente ácido, PBFDA-Proteína bruta ligada ao FDA (% da PB) Lig.- lignina, MM- matéria mineral, EB- Energia bruta.

Tabela 2. Proporções dos ingredientes e composição química dos concentrados

Ingredientes (%MS)	80:20	60:40	40:60
Silagem de milho	79,6	58,5	39,4
Farelo de Soja	3,5	3,6	5,4
Farelo de grão de milho	4,2	9,4	13,5
f. algodão	2,2	3,6	4,1
Sorgo em grãos	2,8	8,0	13,5
F. proteinoso de milho	2,1	4,7	6,1
Casca de soja	2,8	9,8	16,2
Uréia	1,3	1,0	0,5
Mistura Mineral*	1,5	1,4	1,4
Composição química das dietas			
MS (%MO)	40,7	52,8	63,7
PB (%MS)	15,6	17,8	16,8
EE (%MS)	2,2	2,2	2,3
FDN (%MS)	50,7	47,4	44,8
FDA (%MS)	30,5	27,6	25,8
MM (%MS)	6,2	6,0	5,4
Consumo da ração			
KgMS/dia	7,9	9,1	9,0
g/PV^{0,75}	84,6	97,6	96,5

*28,09% S. Cálcio, 46,8% Calcário, 18,73% NaCl, 0,34% S. Mn., 5,15% F. Bical., 0,08% S. Cu, 0,004% S. Co, 0,004% Selenito.

As dietas foram formuladas com base no “Cornell Net Carbohydrate and Protein System” (CNCPS 4.2; Fox et al., 2000), com a otimização da função ruminal. A quantidade de alimento fornecido inicialmente foi de 100 g de MS / kg PV^{0,75}, sendo realizados ajustes quando necessário, de modo que não ocorressem sobras. A ração foi fornecida em duas refeições diárias as 8:00 e 15:00 horas.

4.2.2 Degradabilidade ruminal

A incubação ruminal dos saquinhos (Orskov & McDonald, 1979) para determinação da degradabilidade ruminal da MS e PB começou no 10º dia após o início da adaptação dos animais às dietas.

Os saquinhos (12 x 21 cm) com porosidade de 50 μ foram preenchidos com aproximadamente 12 gramas de amostras das diferentes fontes alimentares, tendo-se uma relação de tamanho da amostra por área do saquinho de 23,8 mg/cm², próximo ao intervalo de 10 a 20 mg cm² proposto por Nocek (1988). Os saquinhos continham 2 bolas de gude para manter os sacos submersos no rúmen, e uma argola de metal para serem fixados ao mosquetão que estava amarrado a corda de nylon de 50 cm de comprimento. Os saquinhos eram posicionados e submersos no rúmen em triplicata por 0, 3, 6, 12, 24, 48 h, sendo que o farelo proteinoso de milho e a casca de soja tiveram um período extra referentes a 60 h de incubação ruminal. As incubações foram feitas imediatamente após fornecimento da ração aos animais. As incubações e retirada dos saquinhos foram feitas seguindo os esquema do quadro 1:

Após a retirada dos sacos, estes foram lavados em lavadora automática por cerca de 20 minutos com 4 enxágües no modo para tecidos delicados, para que a água fluísse incolor. Após lavagem os mesmos foram secos em estufa com ventilação de ar forçada a 60 °C por 72 horas, sendo em seguida pesados.

Dia	Atividade:
1 a 7	Adaptação as dietas experimentais
8 a 13	Dosagem de 360 mg ¹⁵ N.
10	Incubação dos saquinhos 48h e 60h
11	Incubação dos saquinhos 24h
12	Retirada dos saquinhos 48 e 24h, incubação e retirada dos saquinhos de 12h, e retirada dos saquinhos de 60h.
13	Incubação e retirada dos saquinhos 3h e 6h.

Quadro 1- Esquematização das atividades de dosagem de ¹⁵N e incubação dos saquinhos de nylon no rúmen

Os cálculos foram feitos utilizando-se a seguinte fórmula:

$$DgMS\% = \frac{100 \times (1 - (PSPI - PSV))}{(PSAI - PSV)}$$

onde: DgMS% é a degradabilidade da matéria seca em porcentagem, PSPI é o peso do saco pós-incubação ruminal, PSAI é o peso do saco antes da incubação ruminal, e PSV é o peso do saco vazio.

A degradabilidade da PB foi calculada através da mesma fórmula, usando valores de PB no lugar dos valores de MS. Os dados de degradabilidade (MS e PB) foram ajustados ao modelo matemático exponencial proposto por Orskov e McDonald (1979):

$$P = a + b(1 - e^{-ct})$$

Onde, "P" é a quantidade de nutriente degradada no tempo "t", "a" é o intercepto da curva no tempo zero, "b" a fração potencialmente degradável no rúmen, e "c" é a taxa de degradação (kd) por hora da fração "b". A letra "e" é o log natural de -ct.

A degradabilidade efetiva (DE) foi calculada segundo a equação:

$$DE = \frac{a + (b \times c)}{(c + k)}$$

onde, "k" representa a taxa de passagem do alimento pelo rúmen (% por hora), de acordo com Orskov et al. (1980), sendo que para este trabalho foram consideradas taxas de 2,0, 5,0 e 8,0%/h.

Os parâmetros de degradabilidade foram determinados pelo procedimento não linear do programa computacional SAS (Statistical Analysis System, 1997).

4.2.3 Infusão de ^{15}N no rúmen e determinação da contaminação microbiana dos resíduos

Após sete dias de adaptação dos animais às dietas, foram feitas infusões diárias no rúmen de dose pulso com 360mg de ^{15}N na forma de $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (35,6 atm% $^{15}\text{N}/\text{N}$ total), imediatamente após o fornecimento da ração da manhã, sendo a infusão mantida por seis dias (Broderick & Merchen, 1992).

A incubação dos saquinhos para estudo da degradabilidade iniciou-se três dias após a primeira infusão, quando as bactérias apresentam o máximo do seu enriquecimento (BECKERS et al. 1995). No quinto dia de aplicação de ^{15}N no rúmen foram coletados 500 g de conteúdo ruminal para separação das bactérias (Cecava et al., 1990).

A amostra de conteúdo ruminal era imediatamente misturada a solução salina (0,9%) , e homogeneizado em liquidificador por 20 segundos, sendo em seguida congelada até ao final do experimento para centrifugação. Após descongelamento o conteúdo ruminal era centrifugado a 500 g por 20 minutos, e o sobrenadante novamente centrifugado a 27000g durante 30 min. O precipitado (pellet de bactérias) foi coletado, congelado e liofilização para determinação do enriquecimento com ^{15}N .

4.2.4 Determinação do ^{15}N e N e da contaminação microbiana do resíduo

As determinações foram realizadas no Laboratório de Isótopos Estáveis do CENA /USP, Piracicaba, SP, em espectrômetro de massa contendo analisador automático para nitrogênio, modelo ANCA-SL, da Europa Scientific LTDA (BARRIE & PROSSER, 1996). O enriquecimento com ^{15}N para cálculo

da contaminação microbiana foi calculado assumindo a abundância natural desse elemento de cada alimento, determinado antes da incubação ruminal.

A contaminação microbiana do resíduo foram calculados da seguinte forma (Beckers et al., 1995):

$$\%N_{bact} = \frac{(^{15}N \text{ \%atm no resíduo} - ^{15}N \text{ \%atm no alimento}) \times 100}{(^{15}N \text{ \%atm no pool bacteriano} - ^{15}N \text{ \%atm no alimento})}$$

$$\%MS_{bact} = \frac{\%N_{bact} \times \%N \text{ resíduo}}{\%N \text{ no pool bacteriano}}$$

onde, %Nbact é a % de nitrogênio bacteriano no resíduo em relação ao nitrogênio total, %MSbact é a % de matéria seca microbiana no resíduo, ^{15}N %atm é a % de átomos de ^{15}N no resíduo, no alimento ou no *pool* bacteriano.

4.2.5 Digestibilidade intestinal in vitro da proteína bruta.

A digestibilidade intestinal da proteína bruta foi realizada segundo técnica descrita por Casamiglia & Stern (1995). Resíduos de incubação ruminal de 12 h, referente à taxa de passagem de 8 %/h, foram amostrados para conter 15 mg de N e colocados em tubos de vidro pyrex de 50 ml. Foram adicionados à amostra no tubo, 10 ml de solução de HCL (0,1N), contendo 1g de pepsina, com pH ajustado em torno de 1,9. Após homogeneização, foi feita incubação por 1 h em banho-maria a 38°C. Em seguida foram adicionados 0,5 ml de solução de NaOH 1 N e 13,5 ml de pancreatina (pH=7,6, 3g/L de pancreatina, 50 mg de timol, 68g/L KH_2PO_4 e 16 g NaOH/L), e após homogeneização, incubação em banho por 24 h a 38°C, sendo os tubos agitados a cada 8 h. Os tubos foram retirados do banho, as amostras foram filtradas e lavadas com 100 ml de água destilada. Após secagem das amostras em estufa de circulação forçada (50°C/24 h) foi realizada análise de nitrogênio residual (A.O.A.C., 1990). As análises foram realizadas no laboratório de Bromatologia do Instituto de Zootecnia.

4.2.6 Análise Bromatológica

As amostras dos alimentos foram determinados os seguintes componentes: matéria seca a 105°C (MS), matéria mineral (MM), extrato etéreo (EE), proteína bruta (PB) (A.O.A.C., 1990), fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácido (FDA; Van Soest, et al, 1991). Os teores de N dos resíduos da incubação ruminal e das bactérias foram determinados durante a análise de abundância isotópica do ^{15}N (Barrie & Prosser, 1996).

4.2.7 Análise estatística

O experimento de degradação “in situ” foi desenvolvido em delineamento de Quadrado Latino 3x3 com repetição (períodos x animais), em esquema de parcelas subdivididas, sendo avaliado nas parcelas períodos, animais e os níveis de concentrado 20%, 40% e 60% e nas subparcelas a correção microbiana (corrigido e não corrigido) e a interação concentrado x tratamento (corrigido e não corrigido). As análises estatísticas foram efetuadas pelo Proc Mixed do programa estatístico SAS (Statistical Analysis System, 1999). Considerou-se 10 % como nível de significância para a probabilidade do teste F para a análise de variância. A comparação entre médias de níveis de concentrados e de tratamentos (corrigidos e não corrigidos) foi realizada através do teste de Kramer-Tukey a 10 % de probabilidade.

4.3 Resultados e discussão

As constantes de degradabilidade *a*, *b* e *c* segundo a equação de Orskov e McDonald (1979), e as degradabilidade efetivas para as taxas de passagem (*kp*) de 2, 5 e 8%/h, bem como a comparação dos valores corrigidos ou não para contaminação microbiana da MS e PB dos diferentes alimentos, estão

apresentados nas tabelas 3, 4, 5, 6, 7, 8. Para nenhum dos alimentos avaliados houve interação entre tratamento e correção microbiana (corrigido ou não)

Tabela 3. Componentes da curva exponencial de degradação (a, b), taxa de degradação da fração b (kd) e degradabilidade efetiva (DE) para taxas de passagem (kp) de 2, 5 e 8%/h, com dados corrigidos ou não para contaminação microbiana – casca de soja

Parâmetro	Tratamentos			Contaminação ¹		P.	
	80:20	60:40	40:60	Corr	Ncorr	Trat. ²	Corr. ³
a (%)							
MS	20,2 ^a	20,9 ^a	21,9 ^b	21,9	21,3	0,0018	0,0819
PB	47,2	45,7	45,2	47,0	45,2	-	-
b (%)							
MS	72,7	78,0	75,2	75,1	75,5	-	-
PB	47,9 ^a	47,6 ^{ab}	44,5 ^b	46,6	46,7	0,0629	-
Taxa de degradação da fração b, kd (%/h)							
MS	5,0 ^a	4,0 ^b	3,0 ^b	4,0	4,0	0,0337	-
PB	6,0	6,0	9,0	9,0	5,0	-	-
Degradabilidade efetiva, kp de 2%/h							
MS	69,1	69,9	68,7	69,6	68,2	-	-
PB	81,3	80,5	79,1	82,4	78,2	-	0,0092
Degradabilidade efetiva, kp de 5%/h							
MS	53,3	52,5	51,9	53,0	52,1	-	-
PB	71,5	70,7	70,6	73,5	68,4	-	0,0035
Degradabilidade efetiva, kp de 8%/h							
MS	45,4	44,3	44,0	45,0	44,1	-	-
PB	66,2	65,3	65,7	68,3	63,2	-	0,0041

^{a,b,c}Médias na mesma linha seguidas por letras diferentes são significativas (P<0,10);

¹Parâmetros corrigidos (Corr) ou não (NCorr) para contaminação microbiana;

²Probabilidade de efeito de tratamento, ³Probabilidade de efeito para correção.

A casca de soja (tabela 3) apresentou efeito significativo para tratamento (P=0,004) para a constante “a” da equação de degradabilidade da MS, onde os valores foram superiores para animais recebendo dietas com 60% de concentrado em relação a 20 e 40 % (21,9 x 20,2 e 20,9, P<0,10). Para a constante “b”, foi verificada diferença significativa para tratamento para PB entre os tratamentos 60% e 20% de concentrado (P<0,09), sendo que esses dois tratamentos não diferiram do tratamento com 40% de concentrado (P>0,10). Para taxa de degradação da fração “b” (Kd, %/h) foi observada diferença

significativa de efeito de tratamento para MS ($P < 0,10$), mas não para PB ($P > 0,10$). As estimativas da degradabilidade efetiva para diferentes taxas de passagem (2, 5 ou 8%/h) não foram significativas entre os tratamentos, tanto para a MS como para PB.

Os dados indicam que a casca de soja apresenta alta degradação da MS e da proteína bruta, estando os dados de acordo com a revisão recente de Ipharraguerre & Clark (2003), onde a extensão da degradação da MS da casca variou de 50,6 em 24h a 100 % com 72h de exposição ruminal, com taxas de degradação variando de 2,5 a 5,0 %/h. Os autores mencionam sobre a elevada degradação da porção fibrosa da casca de soja, que é devido ao baixo teor de lignina e compostos fenólicos, bem como a maior espessura e tamanho da parede celular da casca de soja, que permitem a rápida e elevada fermentação e degradação da porção fibrosa.

Os valores encontrados para os parâmetros da curva de degradação da MS e PB da casca de soja foram bastante diferentes dos relatados por Woods et al. (2002). O valor médio para MS da constante “a” foi de 6,7%, para a “b” de 92,0 %, com taxa de degradação de 4,0%/h, enquanto a proteína as estimativas médias das constantes “a”, “b” e *kd* foram de 18,0, 75,0 e 3,8%/h, respectivamente. A DE estimada pelos autores com 5% *kp* foi de 45,8 e de 49,3% para MS e PB, respectivamente. Esses valores são bem menores que os determinados no presente trabalho para a mesma taxa de passagem, onde foi possível observar DE de 53,0 e 73,5% para MS e PB corrigidas para contaminação microbiana, respectivamente.

As diferenças com relação ao trabalho de Woods et al. (2002) pode ter ocorrido principalmente em função das estimativas feitas para o componente “a” da equação que representa a fração solúvel, pois os autores descrevem que foram feitas correções para as perdas de partículas durante o processo de lavagem, determinando desta forma a “fração verdadeiramente solúvel em água”.

Batajoo & Shaver (1998) encontraram valores semelhantes ao do presente trabalho para degradação da MS da casca de soja determinado pelo método *in situ*, onde os valores de “a”, “b”, *kd* e DE com 7% *kp* foram de 21,8, 75,9, 4,0 e 48,8%, respectivamente. Entretanto, os valores para os parâmetros de degradação da PB, foram diferentes dos encontrados neste trabalho, sendo que a DE foi de apenas 58,2% para *kp* de 7,0%/h.

Apesar de não terem sido observadas diferenças significativas ($P > 0,10$) entre os parâmetros de degradabilidade com correção ou não para contaminação microbiana, foi possível constatar efeitos significativos nas estimativas para degradabilidade efetiva da PB ($P < 0,10$) para todas as taxas de passagem. A contaminação microbiana do resíduo subestimou a DE estimada para as *kp* de 2, 5 e 8%/h em 5,1, 6,9 e 7,5%, respectivamente

Na Tabela 4 é possível observar que no estudo da degradação da MS do milho, foram observados efeitos significativos de tratamento ($P < 0,10$) para todos os parâmetros da curva (*a*, *b*, *kd*) e para DE. A fração “a” foi 1,1 unidade, ou 3,5 % menor ($P = 0,0070$) para o tratamento com 60% de concentrado, enquanto a fração “b” foi maior para o tratamento o tratamento 20% ($P = 0,02$) em 1,8 e 1,5 unidades (2,7 e 2,3 %) em relação aos tratamentos 40 e 60%, respectivamente. O tratamento com 60% de concentrado apresentou *kd* maior em relação aos outros tratamentos (10,0 x 7,0 e 8,0 %/h; $P < 0,10$). A DE da MS, em todas as taxas de passagem usadas para cálculo, foi maior ($P < 0,10$) para o tratamento com 60% de concentrado.

Com relação aos parâmetros da curva de degradação da PB do milho, ocorreu efeito significativo de tratamento para a constante “a” ($P = 0,0040$), onde o tratamento com maior nível de concentrado (60%) foi menor ($P < 0,10$) em relação ao tratamento com 20% de concentrado (43,6 x 45,9 %, respectivamente). A velocidade de desaparecimento da fração “b” da proteína bruta foi significativamente superior ($P < 0,10$) para o tratamento com 60% de concentrado, resultando em DE com *kp* de 8,0%/h ($P = 0,0004$) de 69,9%, ou

cerca de 3 e 5% a mais do os valores encontrados para os tratamentos com 20 e 40% de concentrado. Para as DE estimadas com kp de 2,0 e 5,0%/h.

Os valores determinados no estudo de degradação da MS e PB do milho foram maiores que os encontrados por Batajoo & Shaver (1998), que observaram degradabilidade efetiva com kp de 7%/h de 51,1 e 40,0 para MS e PB, respectivamente. Os maiores valores que encontramos para os parâmetros da curva de degradação do milho em relação aos da literatura (Nocek 1987; Herrera-Saldana et al., 1990; Batajoo & Shaver, 1998; Moron et al., 1999), podem estar associados ao fato do milho ter sido finamente moído (aproximadamente 1,5 mm).

Tabela 4. Componentes da curva exponencial de degradação (a , b), taxa de degradação da fração b (kd) e degradabilidade efetiva (DE) com taxa de passagem (kp) de 2, 5 e 8%/h, corrigidos ou não para contaminação microbiana – milho

Parâmetro	Tratamentos			Contaminação ¹		P.	
	80:20	60:40	40:60	Corr	Ncorr	Trat. ²	Corr. ³
<i>a</i> (%)							
MS	31,1 ^a	31,1 ^a	30,0 ^b	30,9	30,6	0,0037	-
PB	45,9 ^a	44,7 ^{ab}	43,6 ^b	45,0	44,5	0,0025	-
<i>b</i> (%)							
MS	66,8 ^a	65,0 ^b	65,3 ^b	65,5	65,9	0,0122	-
PB	60,2	61,5	54,7	57,0	60,6	-	-
<i>Taxa de degradação da fração b, kd (%/h)</i>							
MS	7,0 ^a	8,0 ^b	10,0 ^c	8,0	8,0	0,0002	-
PB	5,0 ^a	5,0 ^a	8,0 ^b	6,0	5,0	0,0001	-
<i>Degradabilidade efetiva, kp de 2%/h</i>							
MS	82,4 ^a	82,4 ^a	83,3 ^b	82,8	82,6	0,0422	-
PB	86,2	86,2	86,6	86,3	86,5	-	-
<i>Degradabilidade efetiva, kp de 5%/h</i>							
MS	69,2 ^a	70,3 ^a	72,0 ^b	70,7	70,3	0,0150	-
PB	73,4 ^a	73,2 ^a	76,2 ^b	74,6	73,9	0,0005	-
<i>Degradabilidade efetiva, kp de 8%/h</i>							
MS	61,4 ^a	62,8 ^a	64,7 ^b	63,2	62,8	0,0004	-
PB	66,9 ^a	66,5 ^a	69,9 ^b	68,2	67,3	0,0004	-

^{a,b,c}Médias na mesma linha seguidas por letras diferentes são significativas ($P < 0,10$);

¹Parâmetros corrigidos (Corr) ou não (NCorr) para contaminação microbiana;

²Probabilidade de efeito de tratamento, ³Probabilidade de efeito para correção.

No caso do milho, as estimativas dos parâmetros da curva de degradabilidade, bem como as DE calculadas com correção para contaminação microbiana do resíduo, não apresentaram diferenças estatísticas significativas em relação aos valores estimados sem fazer a correção para contaminação. Isto provavelmente se deve ao fato da contaminação de nitrogênio bacteriano nos resíduos do milho ter sido significativamente maior apenas nos tempos de 24 e 48 h (8,4 e 15,5 %Nbact, $P < 0,05$, Capítulo 1), não sendo suficiente para alterar parâmetros de degradabilidade.

Alexandrov (1998) relataram valores de a , b , kd , e de DE com kp de 6 e 3%/h, de 38,0, 54,8, 7,3, 66,8 e 76,0 % para MS e 28,0 70, 3,7, 54,9 e 67,4% para PB, respectivamente. Ao comparem os valores dos parâmetros de degradabilidade corrigidos ou não para contaminação microbiana do resíduo, houve diferença significativa para a degradabilidade efetiva da PB, sendo as diferenças da ordem de 7,6 e 6,4 % para kp de 6,0 e 3,0 %. As contaminações encontradas para os tempos de 0 h a 48 h de incubação ruminal apresentaram um comportamento linear, variando de 4,0 a 40,0 % de nitrogênio bacteriano/nitrogênio total, enquanto que as contaminações determinadas no milho no presente trabalho foram menores principalmente para os tempos finais (24 e 48 h), comportamento esse não suficiente para alterar as constantes da curva exponencial de degradação e a degradabilidade efetiva.

Os resultados obtidos com o sorgo (Tabela 5) mostram a ausência de efeito de tratamento ou de correção para contaminação microbiana para as constantes da curva de degradação, para kd e para as estimativas de DE. O sorgo, semelhante ao milho, apresentou a maior % nitrogênio bacteriano com 24 e 48 h (6,8 e 6,1 %Nbact). A %MSbact máxima observada foi com 48 h, porém de apenas 2,7 % MSbact, provavelmente muito baixo para que interferisse nas estimativas dos parâmetros de degradação estudados.

Moron et al. (1999) compararam diferentes formas de processamento do sorgo sobre os parâmetros de degradabilidade ruminal da MS, sendo que o grão moído apresentou valores para " a ", " b " e DE ($kp = 5\%$) de 18,8, 80,0 e

41,6%, respectivamente. Zeoula et al. (1998) usando saquinhos com 23,5 mg de amostra por cm² obtiveram valores para MS de 15,4, 83,7, 2,4, 59,9 e 31,9% para “a”, “b”, kd (%/h), DE com 2 e 8 % de kp, respectivamente. Os resultados são menores que os observados neste trabalho

Valadares et al. (1991) relataram que a degradabilidade da PB do sorgo foi 26 % inferior à do milho, enquanto que a degradabilidade da MS dos dois alimentos foram bastante similares. Resultados semelhantes foram no presente trabalho, com DE da PB do sorgo inferior à do milho em 20,5, 28,3 e 32,5% para os tratamentos com 20, 40 e 60% de concentrado, respectivamente.

Tabela 5. Componentes da curva exponencial de degradação (a, b), taxa de degradação da fração b (kd) e degradabilidade efetiva (DE) com taxa de passagem (kp) de 2, 5 e 8%/h, corrigidos ou não para contaminação microbiana – sorgo

Parâmetro	Tratamentos			Contaminação ¹		P.	
	80:20	60:40	40:60	Corr	NCorr	Trat. ²	Corr. ³
a (%)							
MS	35,9	36,1	36,0	35,7	36,2	-	-
PB	23,3	24,1	23,8	24,1	23,3	-	-
b (%)							
MS	59,9	60,9	61,8	60,1	60,8	-	-
PB	69,2	72,9	69,2	70,1	70,8	-	-
Taxa de degradação da fração b, kd (%/h)							
MS	5,0	6,0	5,0	6,0	5,0	-	-
PB	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	-	-
Degradabilidade efetiva, kp de 2%/h							
MS	79,1	79,7	79,6	79,8	79,1	-	-
PB	67,6	70,4	70,2	70,1	68,7	-	-
Degradabilidade efetiva, kp de 5%/h							
MS	66,5	67,2	66,4	67,2	66,2	-	-
PB	52,3	54,2	55,0	54,7	53,0	-	-
Degradabilidade efetiva, kp de 8%/h							
MS	59,6	60,3	59,3	60,2	59,3	-	-
PB	45,0	46,4	47,4	47,1	45,4	-	-

^{a,b,c}Médias na mesma linha seguidas por letras diferentes são significativas (P<0,10);

¹Parâmetros corrigidos (Corr) ou não (NCorr) para contaminação; ²Probabilidade de efeito de tratamento, ³Probabilidade de efeito para correção.

Efeitos significativos para tratamento ($P=0,0600$) foram observados para a constante b da equação de degradabilidade da MS do farelo proteinoso de milho (Tabela 6), sendo a média do tratamento com 40% de concentrado maior ($P<0,10$) do que as médias dos outros dois tratamentos (20 e 60%). A DE da MS apresentou efeitos significativos para tratamento apenas com a taxa de passagem de 2%/h ($P= 0,0600$), onde as dieta com 60% de concentrado apresentou o menores valor.

Tabela 6. Componentes da curva exponencial de degradação (a , b), taxa de degradação da fração b (kd) e degradabilidade efetiva (DE) com taxa de passagem (kp) de 2, 5 e 8%/h, corrigidos ou não para contaminação microbiana – farelo proteinoso de milho

Parâmetro	Tratamentos			Contaminação ¹		P.	
	80:20	60:40	40:60	Corr	Ncorr	Trat. ²	Corr. ³
a (%)							
MS	47,8	48,3	48,5	48,3	48,1	-	-
PB	66,0 ^a	66,1 ^a	65,5 ^b	66,0	65,8	0,0076	-
b (%)							
MS	48,3 ^{ab}	50,3 ^a	42,2 ^b	46,7	47,2	0,0368	-
PB	30,2 ^a	29,2 ^b	30,2 ^a	30,1	29,6	0,0003	0,0517
Taxa de degradação da fração b, kd (%/h)							
MS	4,0	5,0	5,0	5,0	4,0	-	-
PB	12,0 ^a	14,0 ^{ab}	15 ^b	14,0	13,0	0,0261	-
Degradabilidade efetiva, kp de 2%/h							
MS	79,9 ^a	79,3 ^{ab}	77,8 ^b	79,3	78,7	0,0432	-
PB	91,9	91,6	91,9	92,2	91,4	-	0,0048
Degradabilidade efetiva, kp de 5%/h							
MS	69,3	69,3	68,8	69,6	68,7	-	-
PB	87,3	87,5	87,8	88,0	87,1	-	0,0239
Degradabilidade efetiva, kp de 8%/h							
MS	64,1	64,3	64,1	64,6	63,7	-	-
PB	84,1	84,6	84,8	85,0	84,1	-	0,0365

^{a,b,c}Médias na mesma linha seguidas por letras diferentes são significativa ($P<0,10$).

¹Parâmetros corrigidos (Corr) ou não (NCorr) para contaminação. ²Probabilidade de efeito de tratamento, ³Probabilidade de efeito para correção.

Para degradabilidade da PB foram constatados efeitos de tratamentos ($P=0,10$) para os parâmetros " a ", " b " e " kd ". Para a constante " a ", a média foi

menor ($P < 0,10$) para o tratamento com 60% de concentrado (65,5%), em relação aos outros dois tratamentos (66,0 e 66,1%, respectivamente para 20 e 40% de concentrado). Para o parâmetro " b " o menor valor ($P < 0,10$) foi anotado para o tratamento com 40% de concentrado (29,2 %). As diferenças estatísticas para tratamentos com relação às constantes da curva exponencial, não foram suficientes para causar diferenças estatísticas para as estimativas de DE da PB para as diferentes kp usadas.

Os parâmetros de degradação encontrados por Possenti (1998) e Woods et al. (2002), tanto para a MS como para a PB do farelo proteinoso de milho são bastante semelhantes aos obtidos nesse trabalho apresentados na tabela 6. Woods et al. (2002) ainda mencionam que não foram detectados efeitos significativos para proporção de concentrado na dieta e para nível de ingestão de MS.

O farelo proteinoso de milho mostrou-se alimento de lenta degradabilidade da MS, que segundo Firkins et al. (1991) se deve pela degradação lenta do FDN, sendo benéfico para o ambiente ruminal acarretando assim em menor sobrecarga láctica. A fração protéica apresentou degradabilidade bastante elevada, pois grande parte está na fração solúvel (Possenti, 1998), na forma de nitrogênio não protéico e de peptídeos livres.

Ao avaliar a DE da PB com kp de 2, 5 e 8 %/h, constatou-se diferenças estatísticas ($P < 0,10$) entre os valores corrigidos e não corrigidos para contaminação microbiana do resíduo da ordem de uma unidade percentual. Apesar de significativa, a diferença é de pouca magnitude do ponto de vista prático.

Nas determinações feitas para o farelo de soja (tabela 7), a constante " b " da degradação da MS e as " a " e " b " da proteína bruta mostraram efeito de tratamento ($P < 0,01$). A constante b da equação de degradação da MS foi maior para o tratamento com 60% de concentrado em relação aos tratamentos com 20 e 40% (57,5 x 55,2 e 55,7; $P < 0,10$). O valor da constante a da equação para PB foi cerca de 7 e 11 % menor ($P < 0,10$) para o tratamento com 60% quando

comparado com os tratamentos com 20 e 40% de concentrado, respectivamente. Para o componente “b” ocorreu o contrário, com o tratamento 60 % de concentrado apresentado valor maior do que os observados para os tratamentos com 20 e 40 % (7 e 8 %, respectivamente). Não foram observadas diferenças estatísticas em nenhum dos parâmetros avaliados para correção da contaminação microbiana.

Tabela 7. Componentes da curva exponencial de degradação (a, b), taxa de degradação da fração b (kd) e degradabilidade efetiva (DE) com taxa de passagem (kp) de 2, 5 e 8%/h, corrigidos ou não para contaminação microbiana – farelo de soja

Parâmetro	Tratamentos			Contaminação ¹		P.	
	80:20	60:40	40:60	Corr	Ncorr	Trat. ²	Corr. ³
a (%)							
MS	45,3	45,2	43,9	45,1	44,5	-	-
PB	36,7 ^a	38,2 ^a	34,2 ^b	36,5	36,3	0,0011	-
b (%)							
MS	55,2 ^a	55,7 ^a	57,5 ^b	55,8	56,4	0,0040	-
PB	64,5 ^a	63,9 ^a	69,5 ^b	66,2	65,7	0,0001	-
Taxa de degradação da fração b, kd (/h)							
MS	7,0	7,0	6,0	7,0	7,0	-	-
PB	8,0	15,0	7,0	8,0	12,0	-	-
Degradabilidade efetiva, kp de 2%/h							
MS	88,2	88,0	86,6	87,5	87,5	-	-
PB	87,7	88,2	87,0	87,8	87,5	-	-
Degradabilidade efetiva, kp de 5%/h							
MS	77,5 ^a	77,0 ^{ab}	75,0 ^b	76,5	76,5	0,0800	-
PB	75,7	76,8	73,4	75,3	75,3	-	-
Degradabilidade efetiva, kp de 8%/h							
MS	71,1 ^a	70,6 ^a	68,4 ^b	70,1	70,0	0,0500	-
PB	68,3 ^{ab}	70,0 ^a	65,5 ^b	67,8	68,1	0,0846	-

^{a,b,c}Médias na mesma linha seguidas por letras diferentes são significativas (P<0,10).

¹Parâmetros corrigidos (Corr) ou não (NCorr) para contaminação. ²Probabilidade de efeito de tratamento, ³Probabilidade de efeito para correção.

Para kp de 2%, não foi verificado efeito de tratamento na DE da MS e da PB. No caso de kp de 5%, ocorreu efeito significativo de tratamento na DE da MS, enquanto que para kp de 8%, o efeito de tratamento foi significativo tanto para DE da MS como da PB. Os valores de DE foram maiores para a maior

proporção de concentrado. Weakley et al. (1983), encontraram menor desaparecimento da MS e do N do farelo de soja no rúmen de vacas recebendo dietas com 25 % de feno de alfafa do que de vacas recebendo, 40, 60 ou 80% de feno.

Para os parâmetros da curva de degradação ruminal do farelo de algodão (Tabela 8) apenas a *kd* da proteína apresentou efeito significativo de tratamento (60:40 > 80:20=40:60, $P<0,10$). Entretanto, isto não refletiu em alterações significativas nas estimativas da degradabilidade efetiva da PB. A correção do resíduo para contaminação microbiano teve efeito significativo ($P<0,10$) na *kd* da proteína, nas DE da MS para todas as taxas de passagem e na DE da PB da taxa de passagem de 2%/h.

Tabela 9. Componentes da curva exponencial de degradação (a, b), taxa de degradação da fração b (*kd*) e degradabilidade efetiva (DE) com taxa de passagem (*kp*) de 2, 5 e 8%/h corrigidos ou não para contaminação microbiana – farelo de algodão

Parâmetro	Tratamentos			Contaminação ¹		P.	
	80:20	60:40	40:60	Corr	NCorr	Trat. ²	Corr. ³
a (%)							
MS	26,2	27,6	26,4	27,6	25,7	-	0,0562
PB	30,7	31,2	31,5	31,2	31,0	-	-
b (%)							
MS	39,0	37,7	36,1	37,9	37,3	-	-
PB	54,9	51,8	54,0	54,4	52,8	-	-
Taxa de degradação da fração b, <i>kd</i> (%/h)							
MS	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	-	-
PB	13,0 ^a	17,0 ^b	12,0 ^a	14,0	13,0	0,0300	-
Degradabilidade efetiva, <i>kp</i> de 2%/h							
MS	52,5	53,0	51,1	53,4	51,0	-	0,0722
PB	77,8	75,9	76,7	78,1	75,5	-	0,0897
Degradabilidade efetiva, <i>kp</i> de 5%/h							
MS	44,2	45,1	43,4	45,4	43,0	-	0,0487
PB	69,6	69,2	68,1	70,3	67,6	-	-
Degradabilidade efetiva, <i>kp</i> de 8%/h							
MS	39,9	41,0	39,4	41,3	39,0	-	0,0401
PB	63,9	64,5	62,4	64,9	62,3	-	-

^{a,b,c}Médias na mesma linha seguidas por letras diferentes são significativas ($P<0,10$).

¹Parâmetros corrigidos (Corr) ou não (NCorr) para contaminação. ²Probabilidade de efeito de tratamento, ³Probabilidade de efeito para correção.

As DE da MS do farelo de algodão foram bastante baixas em relação aos outros alimentos protéicos, provavelmente pelo alto teor de lignina observado nesse alimento (14,8 %). Por outro lado, a degradabilidade da PB foi elevada. Valadares Filho et al. (1991) observaram em vacas gestantes e lactentes DE's para *kp* de 2,0, 5,0 e 8,0 % de 72,5, 47,2 e 38,5, respectivamente.

O farelo de algodão demonstra ser uma importante fonte de proteína degradável no rúmen, tendo a DE da PB equivalente ao farelo de soja, observação semelhante ao do trabalho de Valadares Filho et al. (1991).

No presente trabalho, com exceção do sorgo e do farelo de algodão, foi possível observar efeito de tratamento para alguns dos parâmetros da curva de degradação. Porém, para maioria dos alimentos, não foi observado efeito do nível de concentrado para DE, tanto da MS como da PB. Woods et al. (2002) forneceram dietas com diferentes relações de volumoso:concentrado (25:75, 50:50 e 75:25), com dois níveis de ingestão de MS (11 e 17 g/kgPV/dia), e não observaram efeitos significativos nem para dieta nem para nível de ingestão para as estimativas de *a*, *b*, *kd* e de degradabilidade efetiva, tanto para a MS como para a PB.

Para os mesmos alimentos, os valores para a constante "a" (considerada a fração solúvel) encontrados na literatura apresentam grande variação. Essa grande variação é atribuída a vários fatores, como tamanho de partículas, método de processamento, porosidade do saco e material do saquinho, além do método utilizado na lavagem (Vanzant et al. 1998; Broderick e Cochram, 2000)

Herrera-Saldana et al. (1990) relatam desaparecimento da MS maior para o trigo, seguido pela aveia, cevada e milho. Observaram que a DE da MS dos respectivos alimentos , para taxa de passagem de 6%/h, foram de 87,7; 86,7; 78,1 e 54,4 % e a do amido de 94,8; 98,4 ; 90,2 e 61,9%. Os autores destacam que o tamanho das partículas dos alimentos incubados (1 mm), pode explicar os maiores valores de DE encontrados por eles em relação aos observados na literatura. Segundo Vanzant et al. (1998) as pequenas partículas podem

atravessar os poros do saco de náilon e são consideradas como perda, mas alguns autores assumem também que estas são totalmente digestíveis.

Os resultados referentes à digestibilidade intestinal *in vitro* e às estimativas da digestibilidade total de cada alimento estão apresentados na tabela 9. A análise de variância para as duas variáveis revelou efeito altamente significativo para alimento ($P=0,0001$), não sendo identificado efeito para tratamento ou para a interação alimento e tratamento.

Os maiores valores ($P<0,10$) para digestibilidade intestinal da PNDR foram observados para casca de soja, milho e sorgo, enquanto que os menores foram os do farelo proteinoso de milho e do farelo de soja ($P<0,10$). O farelo de algodão apresentou valor intermediário, porém diferente estatisticamente ($P<0,10$) dos outros alimentos. Já ao calcular a digestibilidade total da proteína, ou seja, a soma da degradação no rúmen e da digestibilidade intestinal, os alimentos diferiram entre si ($P<0,10$), sendo que apenas o milho e o farelo proteinoso de milho apresentaram digestibilidade semelhantes ($P>0,10$), pois teoricamente a PNDR seria a mesma.

Tabela 9. Digestibilidade Intestinal *in vitro* (% PNDR) e digestibilidade total (% PB, rúmen e intestinal *in vitro*) da PB dos diferentes alimentos

Alimento	Digestibilidade Intestinal (% PNDR) ¹	Digestibilidade Total (% PB) ¹
Casca de soja	81,7 ^a	94,7 ^a
Milho	87,1 ^a	96,4 ^c
Sorgo	82,4 ^a	91,5 ^e
F. de algodão	70,9 ^c	92,4 ^b
F. Proteinoso de milho	57,6 ^b	95,9 ^c
Farelo de Soja	53,4 ^b	87,2 ^d

^{a,b,c} Médias na mesma coluna seguidas por letras distintas são significativamente diferente ($P<0,10$).

¹Efeito de alimento $P.=0,0001$.

Casamiglia & Stern (1995) relatam coeficiente de determinação de 0,91 ($P=0,0001$) ao comparar a técnica *in vitro* e *in situ* para determinar a digestibilidade intestinal da PNDR em 34 amostras de diferentes alimentos concentrados. Broderick & Cochran (2000) revisaram diversos trabalhos e concluíram que a metodologia da digestibilidade intestinal *in vitro* com pepsina-

pancreatina se mostrou adequada para estimar a digestão pós-ruminal da proteína.

Alguns sistemas utilizam valores de PBFDA para determinar a digestão intestinal da proteína (ARC, 1984; Sniffen et al., 1992). Ao analisarmos os resultados da Tabela 10, a diferença entre a digestibilidade total e 100 % são bastante próximos dos valores de PB ligada ao FDA (PBFDA, tabela 1), ou seja a porção protéica indisponível para o animal. Apesar de não ter sido feita uma análise de correlação, estes achados aparentemente confirmam as proposições de Sniffen et al. (1992) e do ARC (1984). Por outro lado Britton et al. (1986) não encontraram correlação elevada entre a digestibilidade total da PB e o teor PBFDA.

4.4 Conclusões

Os parâmetros das curvas de degradação dos alimentos foram afetados pelas diferentes proporções de volumoso e concentrado na dieta, com exceção do sorgo. No entanto, tais alterações só afetaram as estimativas da degradabilidade efetiva do milho (MS e PB), do farelo proteinoso de milho (MS, $kp=2\%/h$), e do farelo de soja (MS e PB, $kp= 8\%/h$).

Diferenças significativas foram encontradas entre estimativas da DE da PB feitas com e sem correção da contaminação microbiana do resíduo da casca de soja, do farelo proteinoso de milho e do farelo de algodão ($kp = 2\%$). Apesar de efeitos estatísticos significativos para alguns alimentos, as diferenças numéricas entre a DE corrigida ou não para contaminação microbiana do resíduo foram muito pequenas neste trabalho. Com isto em função do alto custo da técnica e o pequeno benefício que houve com as correções para contaminação microbiana, tal prática não é recomendada para estudo da cinética de degradação de alimentos concentrados.

5 EFEITO DA DIFERENTES PROPORÇÕES DE CONCENTRADO NA DEGRADAÇÃO E PERFIL DOS AMINOÁCIDOS

Resumo

Foram utilizados seis bovinos Nelore canulados no rúmen dispostos em quadrado latino duplo 3x3 com repetição, com objetivo de avaliar os efeitos de diferentes proporções de concentrado (20, 40 e 60%) na dieta sobre a degradação e alteração no perfil de aminoácidos de diferentes fontes alimentares, corrigindo-se para contaminação microbiana. Os alimentos testados foram farelo de soja, farelo de algodão, milho, sorgo, casca de soja e farelo de glúten de milho. As incubações ruminais de amostras dos alimentos em saquinhos de nylon foram feitas por 12 h. Não houve alteração na composição química das bactérias, quer seja para o teor de PB ou para o perfil de aminoácidos. Houve efeito apenas entre o alimentos ($P < 0,05$) para a degradação de aminoácidos, onde as menores degradações foram observadas para o sorgo e as maiores para o farelo proteinoso de milho. A degradabilidade de cada aminoácido no alimento foi bastante variável, destacando a Iso, Leu e Val, que foram os de menor degradação em relação a média dos aminoácidos totais para quase todos os alimentos, com exceção da casca de soja. Os aminoácidos individuais apresentam diferentes degradações, sendo variável entre os alimentos. Estas diferenças promoveram alterações significativas ($P < 0,05$) no perfil de aminoácidos dos alimentos incubados em relação ao original, devendo ser considerada pelos sistemas de avaliação de dietas.

Effects of different concentrate ratios of nelore steers diets on degradation rate and profile of amino acids.

Summary

Six rumen cannulated Nelore steer were used in replicated latin square design (3 x 3), with the objective of analyze the effects of different ratios of concentrate (20, 40, 60%) on amino acids degradation and profile changes after 12h of rumen exposure. The feed evaluated were soy bean hulls, corn, sorghum grain, soy bean meal, cottonseed meal and corn gluten feed. It was not detected variations on bacterial CP and amino acid composition among diets. There was a significant effect of feed ($P<0,05$) for amino acids degradation, with the lower values for sorghum and the higher for corn gluten feed. The individual amino acid degradability were variable with different rates of degradability, and that resulted on profile changes ($P<0,05$) after rumen exposure, these must be considered on feed evaluation systems.

5.1 Introdução

A formulação de dietas para ruminantes para suprir a quantidade de aminoácidos e o adequado balanço entre eles ainda é um desafio para a nutrição moderna. Para suprir a proteína ideal para ruminantes ao nível do duodeno é necessário conhecer a composição da proteína microbiana produzida no rúmen e a da proteína de alimentos que escapam à degradação ruminal. A proteína de origem microbiana é de alta qualidade, porém a quantidade e o balanço de aminoácidos essenciais que chega ao duodeno muitas vezes pode ser inadequada, sendo incapaz de satisfazer as exigências de novilhos com elevadas taxas de crescimento. Geralmente o desempenho é menor que o esperado a não ser que seja fornecido aminoácido de origem “não

microbiana” (O’Connor et al. 1993; NRC, 1996; Beermann et al., 1998; Kunkle e Hopkins, 1999).

Clark et al. (1992) relatam que a composição química de bactérias isoladas do rúmen de vacas podem diferir de maneira significativa em função da dieta. No entanto, segundo Varvikko et al. (1986) e Von Keyserlingk et al. (1996) a composição de aminoácidos da proteína microbiana é constante, e independente da dieta oferecida ao animal, e que qualquer alteração na composição de aminoácidos da digesta duodenal irá ocorrer devido ao perfil de aminoácidos do alimento que escapa a degradação ruminal.

A estimativa do perfil de aminoácidos disponível para absorção intestinal em bovinos, feitas pelo Cornell Net Carbohydrate and Protein System (CNCPS), depende de estimativas da composição dos aminoácidos essenciais (metionina, lisina, histidina, fenilalanina, triptofano, treonina, leucina isoleucina, valina e arginina) disponíveis na proteína microbiana e na proteína dietética resistente à degradação no rúmen (O’Connor et al., 1993). Os modelos CNCPS (2000) e NRC (2001) assumem que o perfil de aminoácidos da proteína não degradada no rúmen (PNDR) é semelhante ao da proteína original.

No entanto, contrariamente a esta suposição a degradação dos alimentos ocorridas no rúmen pode alterar o perfil de aminoácidos, quer no aspecto qualitativo quer no quantitativo, em relação à composição dietética (Oldham, 1993; Cozzi et al., 1995; Beermann et al., 1998).

Vários trabalhos relatam a necessidade do uso de marcadores microbianos para a correta determinação do perfil de aminoácidos das frações da proteína não degradável no rúmen (Varvikko *et al.*, 1986; Crooker et al., 1986; Cozzi *et al.*, 1995; Von Keyserlingk *et al.*, 1996).

Neste contexto os objetivos do presente trabalho foi de avaliar se o efeito de diferentes proporções de concentrado na degradação ruminal dos aminoácidos individuais em vários alimentos, e comparar o perfil dos aminoácidos essenciais dos alimentos após incubação com o do alimento original, corrigindo-os da contaminação microbiana.

5.2 Material e Métodos

5.2.1 Animais e dieta experimental

O trabalho foi realizado na Estação Experimental Central do Instituto de Zootecnia, localizado no município de Nova Odessa, SP. Foram utilizados seis bovinos da raça Nelore, providos de fistula ruminal, com peso inicial de aproximadamente 380kg, alojados em gaiolas de metabolismo, em um delineamento Quadrado Latino 3 x 3 com duas repetições por tratamento em cada período. No primeiro período experimental os 6 animais foram distribuídos por sorteio para os diferentes tratamentos, sendo 2 animais para cada tratamento, e nos períodos subsequentes os animais mudavam de tratamento.

Os tratamentos testados foram: **80:20**- 80% de volumoso e 20% de concentrado, **60:40**- 60% de volumoso e 40% de concentrado ou **40:60**- 40% de volumoso e 60% de concentrado. O volumoso utilizado foi a silagem de milho, e no concentrado utilizou-se milho triturado, farelo de soja, farelo de algodão, casca de soja, sorgo em grão moído e farelo proteínoso de milho. Os alimentos bem como as proporções de concentrado utilizadas foram escolhidas pois são tipicamente utilizadas em confinamentos no Brasil para bovinos Nelore.

As dietas foram formuladas com base nas exigências do “Cornell Net Carbohydrate and Protein System” (CNCPS 4.2; Fox et al., 2000), preconizando a otimização da função ruminal e balanço de nitrogênio. A quantidade de alimento fornecido (ad libitum) inicialmente foi de 100 g de MS / kg PVJ^{0,75}, sendo realizados ajustes quando necessário, de modo que não ocorressem sobras.

Na tabela 1 estão os perfis de aminoácidos dos diferentes fontes alimentares estudadas.

Tabela 1. Perfil de aminoácidos (mgAA/gAA), relação de aminoácidos e proteína bruta (%AA/PB) e teor de proteína bruta (%PB/MS) de diferentes fontes alimentares

Aminoácidos %	F. algodão	F. de soja	F. Proteinoso de milho	Casca de soja	Milho	Sorgo
LIS	5,8	8,7	5,1	10,8	4,4	3,9
MET	0,9	0,8	3,9	0,4	0,9	0,9
TRE	3,1	3,6	5,2	3,4	3,3	3,5
LEU	5,3	6,3	13,7	5,8	10,5	11,7
ILE	2,7	3,8	9,8	3,5	2,8	3,6
TRP	2,2	3,1	7,0	1,8	2,6	2,5
ARG	23,3	14,8	10,5	10,8	9,6	7,7
VAL	4,1	4,2	1,4	4,5	5,8	6,1
PHE	3,7	3,4	5,1	2,7	3,2	3,6
HIS	4,2	3,7	1,2	4,2	4,7	3,4
AAEE ¹	55,3	52,6	62,7	47,8	47,7	46,9
SER	4,8	6,6	5,5	5,2	5,1	3,0
GLUT	15,4	9,7	13,6	14,1	15,9	8,8
PRO	2,9	5,5	4,4	9,7	6,4	1,8
GLI	6,0	13,1	6,0	5,7	4,8	2,8
ALA	5,2	5,7	5,3	9,2	11,5	5,0
TIR	1,5	2,6	2,0	1,8	1,9	6,1
CIS	1,1	0,7	1,07	1,4	1,1	8,9
ASP	7,8	8,4	9,6	5,2	6,3	0,9
AAE ²	44,7	52,2	47,4	52,3	53,1	37,3
%AA /PB ³	81,0	83,6	70,3	78,5	71,9	96,0
%PB/MS ⁴	37,0	54,5	25,7	13,6	10,4	10,1

¹Aminoácidos essenciais; ²Aminoácidos não essenciais; ³Percentagem de aminoácidos totais em relação a proteína bruta; ⁴Percentagem de proteína bruta na matéria seca.

5.2.2 Degradabilidade dos aminoácidos.

Os alimentos testados foram farelo de soja, farelo de algodão, farelo proteinoso de milho, casca de soja, milho moído e grão de sorgo moído, sendo

que a escolha destes alimentos foi devido ao fato de serem freqüentemente utilizados em dietas de bovinos de corte no país.

A incubação ruminal em triplicata dos saquinhos de nylon para determinação da degradabilidade ruminal e determinação do perfil dos aminoácidos foi feita por 12 h (Piepenbrink e Schingoethe, 1998), sendo que as incubações foram feitas imediatamente após fornecimento da ração aos animais. Cerca de 12 gramas de cada alimento foram colocados em saquinhos de nylon (12 x 21 cm) devidamente identificados, 23,8 mg/cm², próximo ao intervalo de 10 a 20 mg cm² proposto por Nocek (1988). Os saquinhos continham 2 bolas de gude para manter os sacos submersos no rúmen, e uma argola de metal para serem fixados ao mosquetão que estava amarrado a corda de nylon de 50 cm de comprimento..

Após a retirada dos sacos, estes foram colocados em lavadora automática por cerca de 20 minutos, ou 4 enxágües no modo para tecidos delicados, para que a água fluísse incolor. Após lavagem os mesmos foram secos em estufa com ventilação de ar quente a 60 °C por 72 horas, e pesados em seguida.

A degradabilidade dos aminoácidos na matéria seca foi calculada pela diferença entre quantidade do aminoácido antes e após a incubação. Os cálculos foram feitos utilizando-se a seguinte formula:

$$DgAA\% = \frac{100 \times (1 - (AAPI))}{(AAAI)},$$

onde:

DgAA%= degradabilidade do aminoácido em porcentagem;

AAPI= gramas de aminoácidos no saco pós-incubação ruminal;

AAAI= gramas de aminoácidos no saco antes da incubação ruminal.

5.2.3 Determinação de aminoácidos dos alimentos

As determinações de aminoácidos essenciais (AAE): lisina, metionina, treonina, valina, leucina, isoleucina, arginina, triptofano, histidina fenilalanina e

não essenciais (AANE): ac. aspartico, glutamina, glicina cistina, prolina, tirosina, serina e alanina das amostras dos alimentos incubadas por 12 h no rúmen e das bactérias isoladas foram feitas após hidrólise ácida e analisada em HPLC (cromatografia líquida de alto desempenho) no laboratório de Análises de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas (FEA-UNICAMP), segundo metodologia descrita por Spackman et al. (1958). As determinações de triptofano foram feitas pelo método colorimétrico (Bernardo & Sotelo, 1980).

Os aminoácidos foram expressos em % de AA em relação aos aminoácidos totais (%AA/AAT). O cálculo da relação entre proteína verdadeira (aminoácidos totais) e proteína bruta foi feito dividindo-se a quantidade de nitrogênio em cada aminoácido (AA-N) pelo N total de cada amostra (CP/6,25; Tedeschi et al., 2001). A quantidade de AA-N foi calculada usando os seguintes conteúdos de N (%) baseando-se em Lehninger et al. (1993): Metionina (Met), 9,4; Cistina (Cis), 11,6; Lisina (Lis), 19,2; Treonina (Tre), 11,8; Triptofano (Trp), 13,7; Arginina (Arg), 32,2; Isoleucina (Ile), 10,7; Leucina (Leu), 10,7; Valina (Val), 12,0; Histidina (His), 27,1; Fenilalanina (Phe), 8,5; Glicina (Gli), 18,7; Serina (Ser), 13,3; Prolina (Pro), 12,2; Alanina (Ala), 15,7; Ac. Aspártico (Asp), 10,5 e Glutamina (Glu), 9,5 e Tirosina (Tir), 7,7.

5.2.4 Determinação da contaminação microbiana:

A contaminação microbiana dos resíduos de incubação ruminal foi determinada através do enriquecimento dos microrganismos com ^{15}N , com infusões diárias de sulfato de amônio enriquecido (360 mg de ^{15}N /dia, 35,6 átomos%). A separação das bactérias do conteúdo ruminal foi realizada segundo metodologia descrita por Cecava et al. (1990), para determinação do enriquecimento com ^{15}N e do perfil de aminoácidos das mesmas. As amostras de bactérias dos animais no mesmo tratamento, dentro de cada período, foram compostas para permitir quantidade adequada.

A contaminação microbiana do resíduo foram calculados da seguinte forma (Beckers et al., 1995):

$$\%N_{bact} = \frac{(^{15}N \%atm \text{ no resíduo} - ^{15}N \%atm \text{ no alimento}) \times 100}{(^{15}N \%atm \text{ no pool bacteriano} - ^{15}N \%atm \text{ no alimento})}$$

$$\%MS_{bact} = \frac{\%N_{bact} \times \%N \text{ resíduo}}{\%N \text{ no pool bacteriano}}$$

onde:

$\%N_{bact}$ é a % de nitrogênio bacteriano no resíduo em relação ao nitrogênio total, $\%MS_{bact}$ é a % de matéria seca microbiana no resíduo, $^{15}N \%atm$ é a % de átomos de ^{15}N no resíduo, no alimento ou no *pool* bacteriano.

A correção do perfil de aminoácidos do resíduo de incubação ruminal foi determinada da seguinte forma:

$$\%AA_{cor.} = \%AA_{resíduo} - (\%AA_{bact} \times \%MsmicrRes)/100,$$

onde:

$\%AA_{cor}$ é a % de aminoácido no resíduo corrigido para contaminação microbiana; $\%AA_{resíduo}$ é a % de aminoácido no resíduo da incubação ruminal (MS); $\%AA_{bact}$ é a % de aminoácidos (MS) das bactérias isoladas do rúmen; e $\%MsmicrRes$ é a % de matéria seca microbiana aderida ao resíduo.

5.2.5 Análise estatística

A análise estatística da degradação para cada aminoácido foi efetuada pelo SAS (Statistical Analysis System, 1999) utilizando-se o PROC MIXED com o método REML através do seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ijklm} = \mu + \tau_i + \alpha_j + (\tau\alpha)_{ij} + P_k + A_l + \varepsilon_{ijklm}$$

onde, μ é a média geral, τ_i é o efeito fixo do i-ésimo tratamento, α_j é o efeito fixo do j-ésimo alimento, $(\tau\alpha)_{ij}$ é o efeito fixo da interação entre o i-ésimo tratamento com o j-ésimo alimento, P_k é o efeito aleatório do k-ésimo período, A_l é o efeito aleatório do l-ésimo animal, e ε_{ijklm} é o erro aleatório não controlável.

Para verificar se o perfil de aminoácidos do resíduo diferiu do perfil de aminoácidos do alimento original, verificou-se se a diferença entre o teor de aminoácidos foi diferente de zero.

5.3 Resultados e discussões

Na tabela 2 são apresentados o perfil de aminoácidos de bactérias isoladas do rúmen de bovinos Nelore alimentados com dietas com diferentes proporções volumoso:concentrado. Na análise de variância não foi evidenciada diferença no perfil de aminoácidos das bactérias no rúmen entre os diferentes tratamentos ($P>0,05$). Outros autores relataram observações semelhantes, onde o perfil de aminoácidos das bactérias é constante independente do tipo de dieta oferecida ao animal (Varvikko et al., 1986; Von Keyserlingk et al. 1996).

Tabela 2. Perfil de aminoácidos (mg AA/gAA), proporção de aminoácidos em relação a proteína bruta (%AA/PB), porcentagem de nitrogênio (%N) total e proteína bruta (%PB) na matéria seca de bactérias isoladas do rúmen de animais diferentes fontes alimentares

	Tratamentos (% Concentrado)			média	EPM ¹
	20	40	60		
LIS	7.5	7.9	8.4	7.9	0,38
MET	1.0	1.2	1.3	1.2	0,09
TRE	4.1	4.4	4.1	4.2	0,12
VAL	5.7	5.9	6.0	5.9	0,11
LEU	6.7	7.3	7.3	7.1	0,19
ILE	5.4	5.4	5.3	5.4	0,05
TRP	1.3	1.4	1.2	1.3	0,05
ARG	10.1	9.7	10.2	10.0	0,26
PHE	3.7	3.8	3.8	3.8	0,06
HIS	3.0	3.4	3.4	3.3	0,14
AAEE	48.5	50.4	51.0	50.0	0,75
%AA/ PB	63.6	61.0	65.3	63.3	0,99
%N	6,8	6,6	6,6	6,6	0,16
%PB	42.6	41.1	41.0	41.5	2,31

¹Erro padrão da média.

Clark et al. (1992) mencionam que em trabalhos realizados em Illinois foram verificadas reduções nos coeficientes de variação para composição química das diferentes frações bacterianas, usando os mesmos protocolos para isolamento e análise laboratorial. Porém, os autores relatam que a composição química das bactérias isoladas do rúmen de vacas podem diferir de maneira significativa em função da dieta. Esse fato não foi observado no presente trabalho, provavelmente porque as dietas apresentavam os mesmos ingredientes na sua formulação, mas diferentes apenas diferentes proporções de concentrado.

O modelo de Cornell admite que a composição química das bactérias podem ser influenciadas por alterações na taxa, fase e o meio de cultura do crescimento, porém assume-se que a proteína bruta é de 62,5%, carboidratos 21,1%, gordura 12,0% e cinzas 4,4% (Russel et al., 1992). O teor de proteína utilizado pelo CNCPS é cerca de 33% maior que o teor de proteína encontrados no presente trabalho.

Valadares Filho et al. (1990) encontraram valores que variaram de 34,3, 38,0 e 40,7% PB na MS de bactérias isoladas do rúmen de bovinos Nelore, Holandeses e Bubalinos, respectivamente, recebendo dietas purificadas. No levantamento feito por Clark et al. (1992) em mais de 441 amostras de bactérias provenientes de 61 dietas em 35 experimentos distintos, a %PB/MS das bactérias foi de cerca de 48%, sendo que a amplitude de variação foi de 30,0 a 68,0%. O valor médio de PB (na MS) das bactérias aqui observado foi de 41,5 %PB/MS, próximo dos valores médios encontrados por Clark et al. (1992). De forma semelhante, observou-se que o valor médio de aminoácidos em relação à PB encontrado no presente trabalho (66,3% AA/PB) é semelhante ao encontrado na revisão citada acima (66,5 % AA/PB).

As bactérias amilolíticas apresentam taxas de crescimento e consequentemente exigência de manutenção superiores as celulolíticas (150 x 0,05 g carboidratos/g de bactéria, respectivamente; Russel et al., 1992). Com base neste conceito, pode-se supor que ao fornecer níveis crescentes de

concentrado na dieta criou-se um ambiente propício a maior proliferação das bactérias amilolíticas. Desta forma os dados da Tabela 2 ainda suportam a hipótese de que a composição de aminoácidos de bactérias que degradam amido não difere daquelas que degradam a fibra.

Na figura 1 é apresentado o perfil de aminoácidos de bactérias de várias fontes da literatura consultada.. Nos trabalhos avaliados não foram encontrados valores para Trp. Comparando-se o perfil de aminoácidos deste trabalho com os encontrados na literatura (figura 1), é possível observar algumas variações. Porém os valores mostraram-se coerentes com as variações encontradas nas revisões de Clark et al. (1992) (valores mínimos e máximo) e de Boisen et al. (1999).

Figura 1- Perfil de aminoácidos das bactérias ruminais de trabalhos da literatura

A contaminação microbiana (%Nbact/Nresiduo) média encontrada nos resíduos após 12 h de incubação determinadas com o marcador ^{15}N foram de:

4,2% para o milho, 1,2% no farelo de soja, 3,2% no sorgo, 3,9% farelo de algodão, 7,2 % na casca de soja, 6,9% e farelo proteinoso de milho.

A análise de variância da degradação dos aminoácidos dos alimentos após 12 h horas de exposição ruminal, na Tabela 3, não demonstraram efeitos de tratamento ou interação entre alimento e tratamento ($P>0,05$). No entanto diferenças significativas foram observadas entre os alimentos ($P<0,05$), o que era esperado devidos diferenças químicas e estruturais entre os alimentos.

Tabela 3. Degradação dos aminoácidos de diferentes alimentos após 12 h de incubação ruminal em bovinos Nelore

	Casca de Soja	Milho	Sorgo	Farelo de Algodão	Farelo de Soja	F. proteinoso de milho	EPM¹
LIS	73.4 ^c	78.6 ^{bc}	85.1 ^{ab}	80.5 ^{bc}	76.4 ^{bc}	91.8 ^a	2,6
MET	75.8 ^c	62.8 ^d	61.3 ^d	86.6 ^{ab}	77.6 ^{cb}	96.1 ^a	3,4
TRE	80.1 ^b	77.5 ^b	72.0 ^c	83.1 ^b	77.1 ^b	90.7 ^a	2,5
LEU	83.4 ^b	70.8 ^c	58.9 ^d	82.3 ^{bc}	78.0 ^c	92.2 ^a	2,2
ILE	81.5 ^b	77.3 ^b	62.4 ^c	80.9 ^b	76.3 ^b	93.1 ^a	2,4
VAL	87.2 ^{ab}	80.8 ^{bc}	72.3 ^d	80.8 ^{bc}	73.1 ^{cd}	93.5 ^a	3,2
TRP	68.2 ^b	91.3 ^a	72.5 ^{ab}	66.6 ^b	75.2 ^{ab}	82.9 ^{ab}	6,1
ARG	85.9 ^{bc}	85.7 ^{bc}	77.3 ^d	86.6 ^b	80.7 ^{cd}	95.0 ^a	1,8
PHE	80.3 ^{bc}	72.4 ^c	59.0 ^d	82.8 ^b	76.8 ^c	91.3 ^a	2,2
HIST	74.4 ^{bc}	76.2 ^{bc}	69.0 ^c	81.9 ^b	78.3 ^b	93.1 ^a	2,6
SER	70.9 ^c	74.7 ^c	65.4 ^d	82,0 ^b	75.7 ^{bc}	92.3 ^a	2,5
GLU	80.1 ^b	72.9 ^c	58.4 ^d	84.1 ^b	79.8 ^b	93.7 ^a	2,0
PRO	76.4 ^b	77.6 ^b	49.3 ^c	78.3 ^b	73.9 ^b	93.4 ^a	3,0
GLI	67.6 ^d	77.8 ^{bc}	70.9 ^d	82,0 ^b	74.6 ^{cd}	91.5 ^a	2,3
ALA	70.4 ^c	73.2 ^c	59.9 ^d	82.6 ^b	74.4 ^c	93.9 ^a	2,4
TIR	79.0 ^c	73.0 ^d	57.8 ^e	85.7 ^b	75.1 ^{cd}	92.0 ^a	2,3
Cis	84.6 ^{bc}	79.1 ^{cd}	70.5 ^d	92.6 ^{ab}	77.8 ^{cd}	96.8 ^a	2,3
ASP	88.2 ^{ab}	82.3 ^b	72.5 ^c	84.1 ^b	78.5 ^c	92.4 ^a	2,5
AAEE	79.0 ^b	77.3 ^b	67.3 ^d	80.2 ^b	76.6 ^b	92,0 ^a	2,2
AA totais	75.3 ^c	76.8 ^c	65.2 ^d	82.4 ^b	76.4 ^c	92.6 ^a	1,9

¹Erro padrão da Média

^{a,b,c}Médias na mesma linha seguidas por letras diferentes são significativas ($P<0,10$).

A degradação dos aminoácidos (individuais, essenciais e totais), de forma geral foram maiores para o farelo proteinoso de milho e menores nas amostras de grão de sorgo moído ($P<0,05$).

O farelo proteínoso de milho apresenta grande parte da sua proteína na forma solúvel (aproximadamente 48% PB), principalmente na forma de aminoácidos e peptídeos livres, configurando ao alimento uma elevada solubilidade nas primeiras horas de incubação ruminal. Gonzales et al. (2001) fez observações semelhantes em relação a alta solubilidade do farelo proteínoso de milho, e segundo Van Straalen et al. (1997), o perfil de aminoácidos deste alimento é mais afetado pela “lavagem” pré incubação do que pela incubação ruminal.

A menor degradabilidade dos aminoácidos da proteína do sorgo pode estar relacionado à presença do composto anti-nutricional tanino, que além de indisponibilizar a proteína para degradação ruminal, pode afetar o crescimento bacteriano (Moreira et al. 1987). Entretanto, a concentração deste composto no grão de sorgo não foi determinada.

A degradação dos aminoácidos essenciais do farelo de algodão variou de 66,6 a 86,8% para Trp e Met, respectivamente, sendo que a média dos aminoácidos totais foi de 82,4 %. Esses dados apresentaram-se bastante elevados em relação aos relatados na literatura, onde Fernandes (2001) observou uma variação de 50,7 a 63,5 % para Val e Lis, Valadares et al. (1992) de 15,7 a 23,58 % para Tre e Met, enquanto O'Mara et al. (1997) relataram um desaparecimento médio dos aminoácidos totais no rúmen de 59,7% . As variações encontradas em relação à média dos aminoácidos totais (Tabela 4) neste trabalho para o farelo de algodão variaram de 10,1 (Cis) a -15,8% (Trp), sendo bem próximas às observadas no trabalho de Fernandes (2001) de -9,3 a 13,6%. Entretanto naquele trabalho a Lis foi o aminoácido mais degradado do farelo de algodão, enquanto no presente trabalho a degradação média deste aminoácido foi semelhante à média dos aminoácidos (-1,79%, $P>0,05$).

Gonzales et al. (2000), ao trabalhar com carneiros e após corrigir para contaminação microbiana os resíduos de incubação do farelo de soja com o marcador ^{15}N , encontrou degradabilidades efetivas (%kd) para os aminoácidos bastante semelhantes às observadas neste trabalho. As médias para

degradação efetiva para aminoácidos totais, lisina e metionina encontradas pelos autores foram de 74,7, 76,4 e 76,2 %, enquanto que em nosso trabalho foram de 76,4, 76,4 e 77,6 %, respectivamente. Ljøkjel et al. (2000) encontrou valores para degradação dos aminoácidos do farelo de soja também semelhantes às nossas observações.

Tabela 4. Variação percentual (%) da degradação de cada aminoácido em relação a degradação média dos aminoácidos totais

	Casca de soja	Milho	Sorgo	F. Algodão	F. soja	F. proteinoso de milho	EPM ¹
LIS	-1,0	1,8	19,2*	-1,8	-0,2	-0,8	2,10
MET	4,8*	-14,1*	-3,9	4,1	1,4	3,6	2,22
TRE	4,9*	0,6	6,8*	0,7	0,7	-1,9	1,30
LEU	8,3*	-6,1*	-6,5*	-0,1	-1,4	-0,4	1,50
ILE	6,5*	0,4	-2,8*	-1,5	-0,2	0,5	1,31
VAL	11,9	3,9*	7,1*	-1,8	-3,5	0,9	1,99
TRP	-7,0*	14,4	6,5	-15,8*	-1,2	-9,7	6,38
ARG	10,3*	8,8*	12,1*	4,2	4,3	2,4	1,34
PHE	5,7	-4,5*	-6,1	0,4	0,3	-1,3	1,33
HIS	-0,3	-0,7	3,9*	-0,06	1,9	0,6	1,54
AAEE	4,1*	0,5	2,1	-2,2*	-0,2	2,1*	0,86
SER	-3,9*	-2,2*	-0,1	-0,5	-0,9	-0,3	1,19
GLU	4,5*	-4,0*	-6,8*	1,7	3,2	1,2	2,08
PRO	1,9	0,7	-15,9*	-4,2	-2,7	0,8	3,15
GLI	-7,2*	0,9	5,7*	-0,5	-1,9	-1,1	1,28
ALA	-2,7	-3,7	-5,3	0,2	-2,1	1,3	2,20
TIR	3,9*	-3,9*	-7,4	3,2*	-1,3	0,3	1,15
CIS	8,6*	2,2*	5,3*	10,1*	1,4	4,2*	1,85
ASP	4,4	5,5	7,3	1,6	2,0	-0,2	3,96

¹Erro padrão da média

* P<0,05 para $\delta \neq 0$ (δ = Degradação do AA – Degradação do AA total)

A degradação individual dos aminoácidos em cada alimento apresentou grande variabilidade, com características bastante peculiares a cada fonte utilizada, semelhantes às conclusões feitas por outros autores (Cozzi *et al.*, 1995; Prestløkken, 1999; Miranda, 2002). Cozzi *et al.* (1995) avaliaram as alterações ocorridas no rúmen no farelo de soja, na protenose e farinha de peixe (arenque) e farinha de carne, concluindo que o padrão de desaparecimento dos aminoácidos é diferente entre os alimentos, e que a

exposição ruminal modificou as proporções dos aminoácidos essenciais em relação ao original. Da mesma forma, Miranda (2002), avaliou a degradação de aminoácidos em diversas leguminosas, observando que o desaparecimento dos aminoácidos isoladamente no rúmen ocorre em diferentes extensões para cada alimento.

A degradação da Lisina e Metionina é de especial interesse pois são os principais aminoácidos limitantes em certos estádios fisiológicos (Rulquim et al. 1993). Segundo Tamiga (1979) a metionina é um dos aminoácidos de maior resistência à degradação no estômago dos ruminantes. No entanto os resultados deste trabalho, assim como os de Crooker et al. (1987), indicam que a degradação da metionina é dependente do alimento.

Ao compararmos o desaparecimento da metionina com a média de degradação dos aminoácidos totais (Tabela 4), a degradação foi da metionina no farelo proteinoso e no farelo de algodão foram numericamente maiores em relação a degradação média dos aminoácidos totais (3,6 e 4,1%, respectivamente), porém sem diferenças estatísticas, ao contrario da casca de soja que a diferença foi significativa (4,8%, $P < 0,05$). O milho e sorgo apresentaram degradações estatisticamente menores ($P < 0,05$), -14,1 e -3,9%, respectivamente. As degradações para o farelo de soja ($P > 0,05$), praticamente não sofreu alteração, sendo que a degradação foi em média apenas 1,4% superior a média total.

A Lis apresentou degradação bastante elevada, em relação à degradação dos aminoácidos totais apenas para o sorgo, em média 19% superior ($P < 0,05$). Para os outros alimentos, as alterações foram ausentes ($P > 0,05$) em relação aos aminoácidos totais, sendo de 0, 2, -1, -2 e -1%, respectivamente para farelo de soja, milho, farelo proteinoso de milho, farelo de algodão e casca de soja.

Erasmus et al. (1994) observaram que o desaparecimento da lisina no grão sorgo foi bastante acentuada, enquanto que no farelo de algodão permaneceu inalterada, resultado este coerente ao achado no presente

trabalho. Por outro lado, naquele trabalho a Lis do milho apresentou redução significativa após 16 h de incubação ruminal, e neste após 12 h esteve inalterada. Contrário à maioria de nossas observações, O'Mara et al. (1997) relatam que dentre os aminoácidos essenciais, a lisina é um dos aminoácidos de maior degradação, também observado por Ferreira (2001) que obteve degradação ruminal média de 99,9 % para milho com alto teor de Lis.

Erasmus et al. (1994) ao trabalharem com 12 fontes alimentares, relataram que os aminoácidos de cadeia ramificada, em especial para a Iso e Leu, eram mais resistentes à degradação ruminal. Outros autores relatam achados semelhantes, onde aparentemente os aminoácidos de cadeia ramificada (Val, Iso e Leu) eram mais resistentes à degradação microbiana (Varvikko et al., 1986; Harstad & Prestløkken, 2000; Miranda, 2002).

Os aminoácidos de cadeia ramificada de modo geral (Val, Leu e Iso), em relação à média total de degradação de todos os aminoácidos apresentaram degradação semelhantes ou inferiores, especialmente para Leu e Iso. A exceção foi a casca de soja, onde as degradações para Val, Leu e Iso, foram cerca de 12, 8 e 7% superiores à média total. A degradação da Leu em relação aos aminoácidos totais no sorgo, f. proteinoso de milho, f. de soja, milho, f. de algodão, foi de -6,5 ($P<0,05$), 0,4, -1,4, -6 ($P<0,05$), e -0,1%, respectivamente, enquanto que a da Iso foi de, -2,8 ($P<0,05$), 0,5, -,2, 0,4 e -1,5%. A degradação da Val mostrou-se variável, sendo aumentada no milho e sorgo (3,9 e 7,1% ($P<0,05$), respectivamente), foi menor numericamente no f. de soja (-3,5%, $P<0,05$), e praticamente inalterada ($P>0,05$) à degradação média dos aminoácidos totais para o f. proteinoso de milho e f. de algodão (0,9 e -1,8%, respectivamente).

A viscosidade das proteínas hidrofóbicas tende a diminuir a degradação da proteína (Prestløkken, 1999), que segundo Case et al. (1995), permitiria a degradação seletiva de alguns aminoácidos. Prestløkken (1999) relatam que de forma geral, os aminoácidos hidrofóbicos (Met, Leu, Iso, Phe, Val, Ala, Tir) apresentaram menores degradações que os hidrofílicos (His, Lis, Arg, Cis, Glu

e Ser). No entanto, no presente trabalho isto não foi regra para todos os alimentos, sendo bastante próxima à média a degradação entre os aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos, exceto para o milho, onde este último grupo apresentou a degradação média cerca de 6,8% superior.

As diferenças na extensão de degradações dos aminoácidos individuais dos alimentos bem como as variações em relação à degradação de cada um dos aminoácidos, muito provavelmente, estão relacionadas ao arranjo estrutural destes na proteína de cada ingrediente, bem como a sua associação com as frações de maior ou menor degradabilidade ruminal. Von Keyserlingk et al. (1996), por exemplo, observaram que o rápido desaparecimento dos aminoácidos de cadeia ramificada da silagem de gramíneas foi pelo fato destes aminoácidos estarem associados a fração solúvel da proteína. Gonzales et al. (2001) relatam diferenças entre os perfis de aminoácidos dos resíduos de lavagem e dos resíduos de incubação ruminal de diversos alimentos, indicando variações entre os perfis de aminoácidos da fração solúvel e os da fração não degradada no rúmen dos alimentos.

As variações na degradação de cada aminoácido nos alimentos em relação à degradação média dos aminoácidos totais promoveram alterações significativas no perfil dos aminoácidos essenciais em relação aos alimentos originais (Tabela 5). Na análise de variância (Tabela 5) para comparação entre o perfil dos aminoácidos entre alimento original e incubado foi observado efeito significativo apenas para alimento ($P < 0,05$), sendo que não foi observado efeito ($P > 0,05$) de tratamento, ou da interação com alimento. Na Tabela 6 estão apresentadas em unidades percentuais as alterações em relação ao alimento original.

Em todos os alimentos houve alteração no perfil de aminoácidos em relação ao alimento original, devido às diferenças na extensão de degradação de cada aminoácido no alimento em particular. Estes resultados contrariam as suposições do NRC (2001) e o CNCPS (Fox et al. 2003), que consideraram que o perfil de aminoácidos da proteína não degradável no rúmen é semelhante

ao perfil do alimento original, e assumem que a curva de degradação de cada aminoácido individual é semelhante.

As alterações no perfil de aminoácidos da casca de soja mais significativas estão relacionadas aos aumentos significativos ($P < 0,05$) para Lis e His, enquanto que para Leu, Ile, Arg, Phe ocorreram diminuições nas suas concentrações em relação ao perfil inicial do alimento.

O milho teve alterações significativas ($P < 0,05$) para maioria dos aminoácidos, sendo que apenas Lis, Tre e Ile não foram alterados. Os aminoácidos Met, Leu, Phe e His apresentaram aumentos na ordem de 53,6, 23,3, 18,5 e 30,5 % respectivamente, enquanto que Trp, Arg, Val, apresentaram redução de -78,4, -27,6 e -14,5 %. Comportamento semelhante para alterações no perfil de aminoácidos do milho foi relatado por Gonzales et al. (2001), onde Met, Phe, Leu e Iso aumentaram, ocorrendo decréscimo moderado para Arg, Val e Lis. Os autores relatam que a diminuição para Lis foi da ordem de 84,6%, enquanto que neste trabalho foi observada uma redução de apenas 16,4%. Erasmus et al (1994) também observaram alterações significativas entre o perfil de aminoácidos essenciais do milho, com redução da Tre, Val, His, Arg e Lis e aumento nas concentrações relativas da Ile, Leu, Met e Phe.

O sorgo mostrou alterações no perfil dos aminoácidos essenciais, sendo que apenas a Met e a Ile não foram alterados. O aminoácido de maior alteração em relação ao perfil do alimento original, foi a lisina, que mostrou uma redução de 58,9%, em virtude principalmente da elevada degradação observada para este aminoácido no sorgo. Alterações semelhantes no perfil de aminoácidos do sorgo, de forma geral, também foram relatadas por Erasmus et al. (1994), onde a Lis foi o aminoácido que teve maior alteração (40%), e a Met permaneceu inalterada.

Tabela 5 : Perfil de aminoácidos de diferentes fontes alimentares após 12 h de incubação ruminal em bovinos Nelore

	Casca de soja		Milho		Sorgo		Farelo de Algodão		Farelo de Soja		F. Proteinoso de milho	
	Incubado ¹	δ	Incubado	δ	Incubado	δ	Incubado	δ	Incubado	δ	Incubado	EPM ²
LIS	13,7	3,0*	3,6	-0,7	1,6	-2,3*	6,1	1,0*	6,6	0,8	9,1	0,3
MET	0,3	-0,1	1,4	0,5*	1,0	0,1	0,6	-3,2*	0,9	0,1	0,8	-0,1
TRE	2,9	-0,5	3,1	-0,2	2,7	-0,8*	5,2	0,1	3,0	-0,1	3,5	-0,1
LEU	4,1	-1,7*	12,9	2,4*	13,3	1,6*	9,8	-3,8*	5,2	-0,1	6,7	0,4
ILE	2,8	-0,7*	2,7	-0,1	3,8	0,2	2,9	-6,9*	3,1	0,3	3,8	0,1
TRP	1,0	-0,8	0,6	-2,0*	1,3	-1,1*	2,1	-4,9*	1,8	-0,4	1,5	-1,7*
ARG	5,5	-5,3*	7,0	-2,6*	5,8	-2,0*	5,2	-5,3*	20,1	-3,2*	11,6	-3,2*
VAL	4,1	-0,3	4,8	-1,0*	4,5	-1,5*	4,8	3,4*	4,4	0,4	5,0	0,7*
PHE	2,0	-0,7*	3,8	0,6*	4,2	0,6*	3,5	-1,7*	3,6	-0,1	3,4	-0,1
HIS	7,1	2,9*	6,2	1,5*	4,1	0,7*	6,1	5,0*	5,6	1,4*	5,1	1,2*
AAEE	42,5	-5,3*	45,6	-2,2*	42,3	-4,6*	46,2	-16,5*	56,3	1,0	53,2	0,6

¹Perfil de aminoácido do alimento incubado (mgAA/gAA);

²Erro Padrão da Média;

*P<0,05 para $\delta \neq 0$ (δ = Incubado-original)

Tabela 6: Alteração do perfil de aminoácidos em relação ao alimento original (%)¹

	Casca de Soja	Milho	Sorgo	F. Algodão	F. Soja	F. proteinoso de milho
LIS	27,60	-16,41	-58,97	13,88	3,81	19,18
MET	-22,71	53,66	8,99	4,37	-4,28	-83,31
TRE	-13,64	-5,20	-23,15	-3,75	-1,31	1,00
LEU	-29,40	23,33	13,76	-1,54	5,85	-28,08
ILE	-21,17	-3,18	6,75	11,50	1,31	-70,17
TRI	-42,02	-78,37	-46,10	-19,25	-53,20	-70,57
ARG	-49,12	-27,26	-25,70	-13,78	-21,75	-50,90
VAL	-7,36	-17,49	-24,71	8,51	17,07	248,95
PHE	-24,69	18,54	15,18	-2,58	-1,54	-32,33
HIS	69,13	30,85	20,06	34,24	31,13	430,20
AAEE	-11,06	-4,54	-9,89	1,76	1,10	-26,25

¹ [(Incubado-Original)/Original]x100.

Apenas o Trp, Arg, Val e His do farelo de soja apresentaram alterações em relação ao perfil de aminoácidos do alimento original ($P < 0,05$). O Trp e a Arg tiveram redução de 53,2 e 21,8% em relação à concentração inicial, enquanto a Val e His aumentaram em cerca de 17,1 e 31,1 %, respectivamente. Os aminoácidos de maior importância, Met e Lis não apresentaram alterações significativas no seu perfil. O'Mara et al. (1997) descreveram alterações em quase todos os aminoácidos essenciais, menos para Met. Cozzi et al. (1995) notaram alterações para Arg (-31,0%), His (-20,0%), Phe (-8,8%) e Lis (-24,3%). Ganev et al. (1979) encontraram poucas alterações em relação ao perfil do alimento original para os resíduos de farelo de soja, farelo de girassol, farelo de nozes e farinha de peixe, após 9h de incubação ruminal.

O alimento que apresentou as menores alterações no seu perfil foi o farelo de algodão, onde apenas a Arg (-13,8 %) e His (34,2 %) apresentaram alterações significativas em relação ao alimento original. Apesar de não significativas, as alterações em relação ao perfil do alimento original para Lis, Ile e Trp foram de 13,88, 11,5 e -19,3 % .

As maiores alterações no perfil de aminoácidos em relação ao alimento original foram observadas para o farelo proteinoso de milho para todos os aminoácidos, exceto Tre. Ambos, Lis e Met apresentaram alterações

significativas, sendo cerca de 19,2 e -83,3 %, respectivamente. As maiores alterações foram observadas para Val e Hist na ordem de 249 e 430%. Os aminoácidos que apresentaram grande redução no perfil em relação aos alimentos originais (Met, Leu, Ile, Trp, Arg, Phe), provavelmente são os que estariam mais associados à fração solúvel e de alta degradabilidade ruminal do farelo proteínoso do milho, como comentado anteriormente, enquanto os que aumentaram estariam associados à fração mais resistente a degradação ruminal.

Os trabalhos nos quais foram observadas maiores alterações no perfil de aminoácidos entre os resíduos de incubação e o alimento original, usaram predominantemente marcadores microbianos para determinação da contaminação microbiana, que segundo Varvikko (1986) pode afetar de forma diferente as determinações do perfil de aminoácidos da proteína não degradada no rúmen. Os erros são de menor intensidade em alimentos ricos em proteínas, porém as maiores variações ocorrem em alimentos fibrosos ou ricos em amido.

Na literatura existem relatos onde o perfil de aminoácidos não sofreu alteração após incubação ruminal em relação ao perfil original (Ganev et al., 1979; Varvikko et al. 1983; Boila & Ingals, 1995; Maiga et al. 1996). Boila e Ingals (1995) relataram que os aminoácidos do farelo de canola apresentaram taxas de degradação semelhantes, não alterando o perfil da proteína não degradada no rúmen. Tedeschi et al. (2001) compararam o perfil de aminoácidos de diversas forragens com o de seus resíduos da separação *in vitro* da proteína solúvel e insolúvel pela técnica tampão de borato-fosfato, concluindo que não houve diferença entre as concentrações de aminoácidos dos alimentos originais e de seus resíduos, sendo assumido que a degradação de cada aminoácido da proteína no rúmen tem taxas de degradação similar.

Varvikko (1986) concluiu que o perfil de aminoácidos da proteína não degradada no rúmen pode ser significativamente alterado, tanto quantitativamente como qualitativamente, sendo coerentes com as observações feitas no presente trabalho. No entanto, estas alterações podem ser de maior

ou menor intensidade em função do alimento, como por exemplo o f. de algodão e f. de soja que apresentaram menores alterações no seu perfil, principalmente em relação a Met e Lis. Outros autores trabalhando com uma gama de alimentos, e com diferentes tempos de incubação também chegaram a conclusões semelhantes (Erasmus et al.; 1994, Cozzi et al., 1995 ; Von Keyserlingk et al., 1996; O'Mara et al., 1997; Gonzales et al. 2000; Gonzales et al. 2001; Fernandes 2001, Miranda, 2002). As alterações no perfil de aminoácidos ocorrem devido as diferentes taxas de degradações observadas em cada aminoácido em particular (Von Keyserlingk et al. ,1996), como também pode ser observado no presente trabalho.

5.4 Conclusões

Os aminoácidos individuais apresentam diferentes degradações, sendo variável entre os alimentos. Estas diferenças promoveram alterações significativas no perfil de aminoácidos dos alimentos incubados em relação ao original, devendo ser considerada pelos sistemas de avaliação de dietas, como constados em outros trabalhos. Apesar de algumas tendências com relação aos aminoácidos de cadeia ramificadas estarem concordantes, a literatura ainda além de escassa, apresenta grande variação nos resultados, o que dificulta a criação de banco de dados. Experimentos com objetivos semelhantes ao do trabalho ainda devem ser conduzidos, para estruturação de informações de forma consolidar o banco de dados.

CONCLUSÕES GERAIS

A contaminação do resíduo de incubação ruminal aumentou, de forma geral, com o tempo de exposição ruminal, porém a intensidade com que ocorreu variou em função da estrutura física e composição química dos ingredientes avaliados, e não em função do tratamento. Em relação a fermentação ruminal, apenas nas dietas com 60% de concentrado apresentou alterações significativas, com menores valores de pH, maior produção de ácidos graxos voláteis, onde houve diminuição relativa de ácido acético, e aumento de ácido propiónico e butírico. Os maiores valores de amônia encontrados para os tratamentos com 20 e 40% de concentrado indicam uma baixa eficiência de uso do nitrogênio pelos microrganismos ruminais, que provavelmente ocorreu devido a baixa disponibilidade de carboidratos.

Os parâmetros das curvas de degradação dos alimentos foram afetados pelas diferentes proporções de volumoso e concentrado na dieta, com exceção do sorgo. No entanto, tais alterações só afetaram as estimativas da degradabilidade efetiva do milho (MS e PB), do farelo proteinoso de milho (MS, $k_p=2\%/h$), e do farelo de soja (MS e PB, $k_p= 8\%/h$).

Apesar de efeitos estatísticos significativos para alguns alimentos, as diferenças numéricas entre a DE corrigida ou não para contaminação microbiana do resíduo foram muito pequenas neste trabalho. Com isto em função do alto custo da técnica e o pequeno benefício que houve com as correções para contaminação microbiana, tal prática não é recomendada para estudo da cinética de degradação de alimentos concentrados.

Os aminoácidos individuais apresentam diferentes degradações, sendo variável entre os alimentos. Estas diferenças promoveram alterações significativas no perfil de aminoácidos dos alimentos incubados em relação ao original, devendo ser considerada pelos sistemas de avaliação de dietas, como constados em outros trabalhos. Apesar de algumas tendências com relação aos aminoácidos de cadeia ramificadas estarem concordantes, a literatura ainda além de escassa, apresenta grande variação nos resultados, o que dificulta a criação de banco de dados. Experimentos com objetivos semelhantes ao do trabalho ainda devem ser conduzidos, para estruturação de informações de forma consolidar o banco de dados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRICULTURE AND FOOD FESERCH CENTER. **Energy and protein requirements of ruminants**. Wallingford, UK: Cab International. 1993. 159p.
- ASSOCIATION OF OFICIAL ANALIYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analyses**. 15.ed., Atlanta, 1990, v.1. p.72-74.
- AGRICULTURE RESEARCH CENTER. The Nutrient Requirements of Ruminant Livestock. Suppl, 1. Commonwealth Agriculture Bureau, 1984. 351p.
- ALEXANDROV, A. N. Effect of ruminal exposure and subsequent microbial contamination on dry matter protein degradability of various feedstuffs. **Animal Feed Science and Technology**, v.71, p.99-107, 1998.
- BACH, A.; HUNTINGTON, G. B.; CALSAMIGLIA, S; STERN, M. D.. Nitrogen metabolism of early lactation cows fed diets with two different levels of rotein and different amino acid profiles. **Journal of Dairy Science**, v.83, p.2585-2595, 2000.
- BARRIE, A.; PROSSER, S. J. Automated analysis of light-element stable isotopes by isotope ratio mass spectrometry. In: BOUTTON, T. W.; YAMSAHI, S. (Ed.). Marcel Dekker, New York, 1996, p.1-46: Mass Spectrometry of soils.
- BATAJOO, K. K.; SHAVER, R. D. In situ dry matter, crude protein and starch degradabilities of selectes grains and by-products feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v.71, p.165-176, 1998.
- BECKERS, Y. THÉWIS, A.; MAUDOUX, B.; FRANÇOIS, E.. Studies on the in situ nitrogen degradability corrected for bacterial contamination of concentrate feeds in steers. **Journal of Animal Science**, v.73, p.220-227, 1995.
- BEERMANN, D. H.; ROBINSON, T. F.; KNAUS, W. F.; FOX, D. G. Ideal levels of absorbed amino acids boost performance. **Feedstuffs**, v.70, n.3, p.16-19, 54, 1998.
- BERNARDO, L.; SOTELO, A. Effect of Different alkalies, temperature, and hydrolisis times on tryptophan determination of pure proteins and of foods. **Analytical Biochemistry**, v.109, p.192-197, 1980.

- BOILA, R. J.; INGALLS, J. R. Prediction of rumen undegradable amino acids that are digested post-rationally. **Canadian Journal of Animal Science**, v.75, p.583-592, 1995.
- BOISEN, S.; HVELPLUND, T.; WEISBERG, M. R. Ideal amino acid profiles as a basis for feed protein evaluation. **Livestock Production Science**, v.64, p.239-251, 2000.
- BRITTON, R. A., T. J. KLOPFENSTEIN, R. CLEALE, F. GOEDEKEN, AND V. WILKERSON. Methods of estimating heat damage in protein sources. In: DISTILLERS FEED CONFERENCE. Cincinnati, OH: **Proceedings**, Cincinnati, 1986, p.41-67.
- BRODERICK, G.A.; MERCHEN, N.R. Markers for quantifying Microbial protein synthesis in the rumen. **Journal of Dairy Science**, v.75, p.2618-2632, 1992.
- BRODERICK, G. A.; COCHRAN, R. C. In vitro and *in situ* methods for estimating digestibility with reference to protein degradability. In: THEODOUROU, M. K.; FRANCE, J. (Ed.). Feeding systems and feed evaluation models. Wallingford: CABI International, 2000. p.54-85.
- CASAMIGLIA, S.; STERN, M. D. A three-step in vitro procedure for estimating intestinal digestion of protein in ruminants. **Journal of Animal Science**, v.73, p.1459-1465, 1995.
- CECAVA, M. J.; MERCHEN, N. R.; GAY, L. C.; BERGER, L. L. Composition of ruminal bacteria harvested from steers as influenced by dietary energy level, feeding frequency, and isolation techniques. **Journal of Animal Science**, v.73, p.2480-2488, 1990.
- CHEN, K. H.; HUBER, J. T.; THEURER, C. B.; SWINGLE, R. S.; SIMAS, J. M.; CHAN, S. C.; WU, Z.; SULLIVAN, J. L. Effect of steam flaking of corn and sorghum grains on performance of lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v.77, p.1038 - 1043, 1994
- CHURCH, D. C. The ruminant animal: digestive physiology and nutrition. Englewood Cliffs: Waveland Press, 1990. 563p.
- CLARK, J. H.; KLUSMEYER, T. H.; CAMERON, M. R. Symposium: Nitrogen metabolism and amino acid nutrition in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.75, p.2304-2323, 1992
- COZZI, G.; ANDRIGHETTO, I.; BERZAGHI, P. In situ ruminal disappearance of essential amino acids in protein feedstuffs. **Journal of Dairy Science**, v.78, p.161-171, 1995.
- CROOKER, B. A.; CLARK, J. H.; SHANKS, R. D.; FAHEY Junior, J. C. Effects of ruminal exposure on the amino acid profile of feeds. **Canadian Journal of Animal Science**, v.67, p.1143-1148, 1986.

- ERASMUS, L. J.; BOTHA, P. M.; CRUYWAGEN, C. W.; MEISSNER, H. H. Amino acid profile and intestinal digestibility in dairy cows of rumen-undegradable protein from various feedstuffs. **Journal of Dairy Science**, v.77, p.541-551, 1994.
- DETMANN, E.; PAULINO, M. F.; ZERVOUDAKIS, J. T.; VALADARES FILHO, S. C.; LANA, R. P.; QUEIROZ, D. S. de. Suplementação de novilhos mestiços durante a época das águas: parâmetros ingestivos e digestivos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, p.1340-1349, 2001.
- DIXON, R. M.; CHANCHAI, S. Colonization and source of N substrates used by microorganisms digesting forages incubated in synthetic fibre bags in the rumen. **Animal Feed Science and Technology**, v.83, p.261-272, 2000.
- ELIZALDE, J. C.; CREMIN Junior, J. D.; FAULKNER, D. B.; MERCHEN, N. R. Performance and digestion by steers grazing tall fescue and supplemented with energy and protein. **Journal of Animal Science**, v.76, p.1691-1701, 1998.
- FERNANDES, P. C. C. Modelagem da digestão da proteína e aminoácidos de alguns alimentos concentrados em ruminantes. Belo Horizonte, 2000. 95 p. Dissertação (Doutorado) Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.
- FIRKINS, J. L.; BERGER, L. L.; MERCHEN, N. R.; FAHEY JUNIOR., G. C.; MULVANEY, R. L. Ruminant nitrogen metabolism in steers as affected by dietary feed intake and dietary urea concentration. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p.2302, 1987.
- FIRKINS, J. L.; EASTRIDGE, M. L.; PALMIQUIST, D. L. Replacement of corn silage with corn gluten feed and sodium bicarbonate for lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.1944-1952, 1991.
- FIRKINS, J. L. Maximizing microbial protein synthesis in the rumen. **Journal of Nutrition**, v.126 (suppl), p.1347s-1354s, 1996.
- FERREIRA, R. N. Degradação ruminal e digestibilidade intestinal e total da proteína do milho e dos germens de milho. Jaboticabal, 2001. 120p. Dissertação (Doutorado). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Julio "Mesquita Filho".
- FOX, D. G.; TEDESCHI, L. O.. Predicting dietary amino acid adequacy for ruminants. In D'MELLO, J. P. F. (Ed). *Amino Acids in Animal Nutrition*. Cambridge: CABI Publishing., 2003, p.389-410.
- FOX, D. G.; TEDESCHI, L. O.; TYLUTKI, T. P.; RUSSELL, J. B.; VAN AMBURGH, M. E.; CHASE, L. E.; PELL, A. N.; OVERTON, T. R. The Cornell Net Carbohydrate and Protein System model for evaluating herd nutrition and nutrient excretion. **Animal Feed Science and Technology**. 2003. (no prelo).

- FOX, D. G.; TYLUTKI, T. P.; VAN AMBURGH, M. E.; CHASE, L. E.; PELL, A. N.; OVERTON, T. R.; TEDESCHI, L. O.; RASMUSSEN, C. N.; DURBAL, V. M. **The Net Carbohydrate and protein system for evaluating herd nutrition and nutrient excretion.** The Cornell University Nutrient Management Planning System. Ithaca, NY: Cornell University, 2000. 236p.
- GANEV, G.; ORSKOV, E. R.; SMART, R. M. The effect of roughage or concentrate feeding and rumen retention time on total degradation of protein in the rumen. **Journal of Agriculture Science.** v. 93, p. 651-656, 1979.
- GARTHWAITE, B. D.; SCHWAB, C. G.; SLOAN, B. K. Amino acids nutrition of the early lactation cow. CORNELL NUTRITION IN: CONFERENCE FOR FEED MANUFACTURES. Ithaca, N.Y., 1998. **Proceedings:** Ithaca, Cornell University, 1998. p.38-50.
- GONZALES, J.; CENTENO, C.; LAMRANI, F.; RODRIGUEZ, C. A. In situ rumen degradation of aminoacids from different feeds corrected for microbial contamination. **Animal Research,** v.50, p.253-264, 2001.
- GONZALES, J.; RODRIGUES, C. A.; ANDRÉS, S. G.; ALVIR, M. R. Rumen degradability and microbial contaminantion of fish and meat meal measured by in situ technique. **Animal Feed Science and Thecnology,** v.73, p.71-84, 1998.
- GONZALES, J.; RODRIGUES, C. A.; CENTENO, C.; LAMNARI, F. Rumen effective degradability of amino acids from soybean meal corrected for microbial contamination. **Reproduction Nutrition Development,** n.40, p.579-586, 2000.
- GRIGSBY, K. N.; KERLEY, M. S.; PATERSON, J. A.; WEIGEL, J. C. Combinations of starch and digestible fiber in supplements for steers consuming a low-quality bromegrass hay diet. **Journal of Animal Science,** v.71, p.1057-1064, 1993.
- HARSTAD, O.M.; PRESTLØKKEN, E. Effective rumen degradability and intestinal indigestibility of individual amino acids in solvent-extracted soybean meal (SBM) and xylose-treated SBM (SoyPass®) determined in situ. **Animal Feed Science and Technology,** v.83, p.31-47, 2000.
- HELDT, J. S.; COCHRAN, R. C.; STOKKA, G. L.; FARMER, C. G.; MATHIS, C. P.; TITGEMEYER, E. C.; NAGARAJA, T. G. Effects of different supplemental sugars and starchs fed in combination with degradable intake protein on low quality forage use by beef steers. **Journal of Animal Science,** v.77, p.2793-2802, 1999a.
- HELDT, J. S.; COCHRAN, R. C.; MATHIS, C. P.; WOODS, B. C.; OLSON, K. C.; TITGEMEYER, E. C.; NAGARAJA, T. G.; VANZANT, E. S.; JOHNSON, D. E. Effects of level and source of carbohydrate and level of degradable intake protein on intake and digestion of low-quality tallgrass-prairie hay by beef steers. **Journal of Animal Science,** v.77, p.2846-2854, 1999b.

- HERRERA-SALDANA, R.E.; HUBER, J.T.; POORE, M.H. Dry matter, crude protein and starch degradability of five cereal grains. **Journal of Dairy Science**, v.73, n.9, p. 2386-2394, 1990.
- HOOVER, W. M., STOKES, S. R. Balancing Carbohydrates and proteins for optimum rumen microbial yield. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.360-372, 1991.
- INSTITUT NATIONAL DE LA REECHERCHE AGRONOMIQUE. Ruminant Nutrition. Montrouge, France: John Libbey Eurotext, 1989. 389p.
- IPHAARRAGUERRE, I. R.; CLARK, J. H. Soyhulls as na alternative feed for lactatinting dairy cows: A review. **Journal of Dairy Science**, n.86, p.1052-1073, 2003.
- KRISNAMOORTHY, U; SNIFFEN, C. J.; STERN, M. D.; VAN SOEST, P. J. Evaluation of mathematical model of rumen digestion and an in vitro simulation of rumen proteolysis to estimate the rumen-undegraded nitrogen content of feedstuffs. **British Journal of Nutrition**, v.50, p.555-568, 1989.
- KUNKLE, W. E.; HOPKINS, D. I. Is methionine the first limiting amino acid for growing cattle fed forages? In: ANNUAL FLORIDA NUTRITION SYMPOSIUM, Gainesville, 1999. **Proceedings**. Gainesville: University of Florida, 1999. p.19-29.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Principles of biochemistry. 2. ed. New York:Worth Publisher, 1993. cap. 5, p. 71-89.
- LING, J. R.; BUTTERY, P. J. The simultaneous use of ribonucleic acid, ³⁵S, 2-6-diaminopimelic acid, and 2-aminoethylphosphonic acid as markers for microbial nitrogen entering the duodenum of sheep. **British Journal of Nutrition**, v.39, p.165, 1978.
- LJØKJEL, K.; HARSTAD, ° M.; SKREDE, A. Effect of heat treatment of soybean meal and fish meal on amino acid digestibility in mink and dairy cows. **Animal Feed Science and Thecnology**, v.84, p.83-95, 2000.
- LÖEST, C. A.; TITGEMEYER, C. E.; LAMBERT, B. D.; TRATER, A. M. Branched-chain aminoacids for growing cattle limited-fed soybean hull-based diets. **Journal of Animal Science**. v.79, p.2747-2753. 2001.
- LUDDEN, P. A.; CECAVA, M. J. Supplmental protein sources for steers fed corn-based diets: I. Ruminant characteristics and intestinal amino acids flows. **Journal of Animal Science**, v.73, p.1466-1475, 1995.
- LUDDEN, P. A.; JONES, J. M.; CECAVA, M. J.; HENDRIX, K. S. Supplemental protein sources for steers fed corn-based diets: II. Growth and estimated metaboçizable amino acids supply. **Journal of Animal Science**, v.73, p.1476-1486, 1995.

- LYCOS, T. VARGA, G.A. Effects of processing method on degradation characteristics of protein and carbohydrate sources in situ. **Journal of Dairy Science**, v.78, p.1789-1801, 1995.
- MAIGA, H.A.; SCHINGOETHE, D.J.; HENSON, J. E. Ruminal degradadion, aminoacids and intestinal digestibility of the residual components of five supplements. **Journal of Dairy Science**, v.79, p.1647-1653, 1996.
- MASSON, H. A.; DEHOLM, A. M.; LING, J. R. In vivo metabolism of 2,2'-Diaminopimelic acid from gram-positive and gram-negative bacterial cells by ruminal microorganisma and ruminats and its use as a marker of bacterial biomass. **Applied Enviromental Microbiology**, n.57, p.1714-1720, 1991.
- MATHERS, J. C.; AITCHINSON, E. M. Direct estimation of the extent of contamination of food residues by microbial matter after incubation with synthetic fibre bags in the rumen. **Journal of Agriculture Science**, v.96, p.691-693, 1981.
- MERCHEN, N.R.; TITGEMEYER, E.C. Manipulation of amino acids to the growing ruminant. **Journal of Animal Science**, v.70, p.3238-3247, 1992.
- MERRY, R. J.; MCALLAN, A. B. Comparison of the chemical-composition of mixed bacteria harvested from the liquid and solid fractions of rumen digesta. **British Journal of Nutrition**, v. 50, n. 3, p.701, 1983
- MIRANDA, L. F. Degradação, digestão intestinal, perfil de aminoácidos, e aminoácidos nas frações protéicas de forragens tropicais: comparação de métodos in situ e TCA. Belo Horizonte, 2006. 96 p. Dissertação (Doutorado). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.
- MOREIRA, V. R; SCHENCKEL, E.; LEBOUTE, E. M. Idendificação de taninos em leguminosas e forrageiras. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 24. Brasília, 1987. **Anais**. Brasília:SBZ, 1987. p.201.
- MORON, I. R.; TEIXEIRA, J. C.; OLIVEIRA, A. I. G.; PEREZ, J. R. O.; OLICEIRA, J. S. Cinética da digestão ruminal da matéria seca dos grãos de milho e sorgo submetidos a diferentes formas de processamento. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 23, n.1, p.174-178, 1999.
- MUPETA, B.; WEISBJERG, M.R.; HVELPLUND, T.; MADSEN, J. Digestibility of amino acids in protein rich tropical feeds for ruminats estimated with the mobile bag technique. **Animal Feed Science Technology**, v.69, p.271-280, 1997.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (N.R.C.). **Nutrient Requeriments of Beef Cattle**. 6. Ed. Washington, D.C.:National Academy Press, 1984. 84p.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (N.R.C.). **Ruminant Nitrogen Usage**. Washington, D.C.:National Academy Press. 1985. 138p.

- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (N.R.C.). **Nutrient Requeriments of Beef Cattle**. 8 ed. Washington, D.C.: National Academy Press, 2000. 242p.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (N.R.C.). **Nutrient Requeriments of Dairy Cattle**. 8 ed. Washington, D.C.: National Academy Press, 2001. 381p.
- NOCEK, J. E.; Evaluation of specific variables affecting in situ estimates of ruminal dry matter and protein digestion. **Journal of Animal Science**, v. 60, p.1347, 1985.
- NOCEK, J. E.; Characterization of in situ dry matter and nitrogen digestion of various corn grain forms. **Journal of Dairy Science**, v.70. p.2291, 1987.
- NOCEK, J. E. *In situ* and other methods to estimate ruminal protein and energy digestibility: a review. **Journal of Dairy Science**, v.71, p.2051-2069, 1988.
- NOCEK, J. E.; RUSSELL, J. B. Protein and energy as an integrated system. Relationship of ruminal protein and carbohydrate availability to microbial synthesis and milk production. **Journal of Dairy Science**, v.71, p.2070-2107, 1988.
- O'CONNOR, J. D.; SNIFFEN, C. J.; FOX, D. G.; CHALUPA, W. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: IV. Predicting amino acids adequacy. **Journal Animal Science**, v.71, p.1298-1311, 1993.
- OLDHAM, J. D. Recent progress towards matching feed quality to the amino acids needs of ruminants. **Animal feed Science and Technology**, v.45, p.19-34, 1993.
- O'MARA, F. P.; MURPHY, J. L.; RATH, M. The aminoacid composition of protein feedstuffs before and after incubation and after subsequent passage through the intestines of dairy cows. **Journal Animal Science**, v.75, p.1941-1949, 1997.
- ØRSKOV, E. R.; MCDONALD, I. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. **Journal of Agriculture Science**, v.92, p.499-503, 1979.
- ØRSKOV, E. R.; HOVELL, F. D.; MOULD, F. Uso de la tecnica de la bolsa de nylon para la avaluacion de los alimentos. **Produccion Animal Tropical**, n.5, p.213, 1980.
- PALMIQUIST, D. L., WEISBJERG, M. R. HVELPLUND, T. Ruminal inestinal and total digestibilities of nutrients in cows fed diets high in fat undegradabel protein. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.1353-1364, 1993.
- PEREZ, J. F.; RODRIGUEZ, C. A.; GONZALES, J.; BALCELLS, J. GUADA, J. A. Contribution of dietary purine bases to duodenal digesta in sheep. In situ studies of purine degradability corrected for microbial contamination. **Animal feed Science and Technology**, v.62, p.251-262, 1996.

- PIEPENBRINK, M. S.; SCHINGOETHE, D. J. Ruminal degradation and amino acid composition, and estimated intestinal digestibilities of four protein supplements. **Journal of Dairy Science**, v.81, p.454-461, 1998.
- POPPI, D.P.; McLENNAN, S.R. Protein and energy utilization by ruminants at pasture. **Journal of Animal Science**, v.73, p.278-290, 1995.
- POSSENTI, R. A. Valor nutritivo da fibra do grão de milho através da degradabilidade in situ e digestibilidade (aparente) com ruminantes. Pirassununga, 1998. 93 p. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.
- PRESTLØKKEN, E. Ruminal degradability and intestinal digestibility of protein and amino acids in barley and oats expander-treated at various intensities. **Animal Feed Science And Technology**, v.82, p.157-175, 1999.
- RANGNGANG, M.B.; NELSON, M.L., PARISH, S.M. Ruminal undegradability of blood meal and effects of blood meal on ruminal and postruminal digestion in steers consuming vegetative orchardgrass hay. **Journal of Animal Science**, v.75, p.2788-2795, 1997.
- RICHARDSON, C. R.; HATFIELD, E. E. The limiting amino acid in growing cattle. **Journal of Animal Science**, v.46, p.740-751, 1978.
- RULQUIN, H.; PISULEWSKI, R.; VERIÉ, R.; et al. Milk production and composition as function of postruminal lysine and metionine supply: A nutrient-response approach. **Livestock Production Science**, v.37, p.69-90. 1993.
- RULQUIN, H.; VÉRITÉ, R. Amino acids nutrition of dairy cows: productive effects and animal requirements. In. GARNSWORTHY, P. C., COLE, D. J. A. (Ed). Recent developments in animal nutrition. Nottingham:Nottingham University Press, 1996. p.71-94.
- RUSSEL, J. B.; O'CONNOR, J. D.; FOX, D. G.; VAN SOEST, P. J.; SNIFFEN, C. J. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminal fermentation. **Journal of Animal Science**, v.70, p.3551-3561, 1992.
- SADIK, M. S.; HUBER, J. T.; KING, K.; WANDERLEY, R.; DEYOUNG, D.; AL-DEHNEH, A.; DUDAS, C. Comparison of nitrogen-15 and diaminopimelic acid for estimating bacterial protein synthesis of lactating cows fed of varying protein degradability. **Journal of Dairy Science**, v.73, p.694-702, 1990.
- SAS Institute Inc. SAS User's guides: statistics. 6 ed. SAS Institute, Cary, NC: Cary, 1999. 213p.
- SATTER, L. D.; ESDALE, W. J. In vitro lactate metabolism by ruminal ingesta. **Applied Microbiology**, v.60, p.680-688, 1968.

- SATTER, L. D.; SLYTER, L. L. Effect of ammonia concentration on ruminal microbial protein production in vitro. **British Journal of Nutrition**. v.32, p.199-208, 1974.
- SATTER, L. D., ROFFLER, R. E. Nitrogen requirement and utilization in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 58, p.1212-1237, 1979.
- SCHWAB, G. Amino acid nutrition of the dairy cow: Current status. In. *Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers*. Cornell University, Ithaca, N.Y.: Ithaca, 1996. **Proceedings**, 1996. p.184-198.
- SCHWAB, C. G.; SOCHA, M. T.; WHITEHOUSE, N. L.. Opportunities for rumen protected lysine and methionine in lactating dairy cow nutrition. RHONE-POULENC ANIMAL NUTRITION SYMPOSIUM, Guelph, Ontario, 1993. **Proceedings**. Guelph, Ontario: Rhone-Poulenc, 1993, p.3-28.
- SNIFFEN, C. G.; O'CONOOR, J. D.; VAN SOEST, P. J.; FOX, D. G.; RUSSEL, J. B. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets. II. Carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**. v.70, p.3562, 1992.
- SLOAN, B; K.; GATHWAITE, B. D.; SCHWAB, C. G. Practical formulation of dairy cow diets for digestible amino acids to improve nitrogen efficiency and the bottom line. In: CORNELL NUTRITION CONFERENCE FOR FEED MANUFACTURES. Cornell, 1998. **Proceedings**. Ithaca, N.Y: Cornell University, 1998. p.51-61.
- SLYTER, L. L.; SATTER, L. D.; DINIUS, D. A. Effect of ruminal concentration on nitrogen utilization by steers. **Journal of Animal Science**, v.48, n.4, p.906-912, 1979.
- SORIANO, F. D.; POLAN, C. E.; MILLER, C. N. Milk production and composition, rumen fermentation parameters and grazing behavior of dairy cows supplemented with different forms and amounts of corn grain. **Journal of Dairy Science**, v.83, p.1520 – 1529, 2000.
- SPACKMAN, D. H.; STEIN, W. H.; MOORE, S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. **Analytical Chemistry**, v.30, n.3, p.1190-1206, 1958.
- STOKES, S. R.; HOOVER, W. H.; MILLER, T. K. ; Blauweikel, R. Ruminal digestion and microbial utilization of diets varying intake of carbohydrate and protein. **Journal of Dairy Science**, v.74, n.3. p. 871-881, 1991.
- TAMMIGA, S. Protein degradation in the forestomachs of ruminants. **Journal of Animal Science**, v.49, p.375-384, 1979.
- TEDESCHI, L. O. FOX, D. G.; RUSSELL, J. B. Accounting for ruminal deficiencies of nitrogen and branched-chain amino acids in the structure of the Cornell net carbohydrate and protein system. In: CORNELL NUTRITION CONFERENCE FOR FEED MANUFACTURERS, Rochester, 2000. **Proceedings** Rochester: University of Cornell, 2000a, p.224-238.

- TEDESCHI, L. O. FOX, D. G.; RUSSELL, J. B. Accounting for the effects of a ruminal nitrogen deficiency within the structure of the Cornell net carbohydrate and protein system. **Journal of Animal Science**. v.78, p.1648-1658. 2000b.
- TEDESCHI, L. O.; PELL, A. N.; FOX, D. G.; LLAMES, C. R. The aminoacids profiles of whole plant and of four plant residues form temperate tropical forages. **Journal of Animal Science**. v.79, p.525-532, 2001.
- TEDESCHI, L. O.; FOX, D. G.; PELL, A. N.; LANNA, D. P. D.; BOIN. C. Development and evaluation of a tropical feed library for the cornell net carbohydrate and protein system model. **Scientia Agricola**, n.59, p.1-18, 2002.
- TRIVELIN, P.C.O. Isótopos: nem todos são radioativos! Notícias da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. n.15, p.10, 1990.
- TRIVELIN, P.C.O. Metodologia de técnica isotópicas. Apostila. www.cena.usp.br/apostila/trivelin. (10 de maio de 2002).
- VALADARES FILHO, S. C.; SILVA, J. F. C.; SANT'ANNA, R.; LEÃO, M.; VALADARES, R. F. D.; CASTRO, A. Composição de bactérias ruminais e absorção de aminoácidos microbianos no intestino delgado de novilhos holandeses, nelores e búfalos mestiços. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v.19. p. 431-440, 1990.
- VALADARES FILHO, S. C.; SILVA, J. F. C.; LEÃO, M.; EUCLYDES, R. F.; VALADARES, R. F. D.; CASTRO, A. Degradabilidade "in situ" da proteína bruta e matéria seca de alguns alimentos em vacas gestantes e lactantes. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v.20. p.111-122, 1991.
- VAN KESSEL, J. S.; RUSSEL, J. B. The effect of amino acid nitrogen on the energetics of ruminal bacteria and its impact on energy spilling. **Journal of Dairy Science**, v.79, p.1237-1243, 1996.
- VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of ruminant**. Ithaca: Cornell University Press, 1994. 476p.
- VAN STRAALLEN, W. M.; ODINGA, J. J.; MOSTERT, W. Digestion of feed aminoacids in the rumen and small intestine of dairy cows measured with nylon bag techniques. **British Journal of Nutrition**, v.77, p.83-97, 1997.
- VANZANT; E. S.; COCHRAN, C.; TITGEMEYER, C. Standartization of in situ techniques for ruminant feedstuff evaluation. **Journal of Animal Science**, v.76, p.2717-2729, 1998.
- VARVIKKO, T.J. Microbially corrected amino acids composition of rumen-undegraded feed and amino acid degradability in the rumen of feeds enclosed in nylon bags. **British Journal of Nutrition**, v.56, p.131-140, 1986.

- VARVIKKO, T.J.; LINDBERG, J.S.; SYRJÄLÄ-QVIST, L. The effect of formaldehyde treatment of soya bean, and rapeseed meal on the amino acid profiles and acid-pepsin solubility of rumen undegraded protein. **Journal of Agriculture Science**, v.101, p.603, 1983.
- VEIRA, D. M. The role of ciliate protozoa in nutrition of the ruminant. **Journal of Animal Science**, v.63, p.1547-1560, 1986.
- VOLDEN, H. Effects of level of feeding and ruminally undegraded protein on ruminal bacterial protein synthesis, escape of dietary protein, intestinal amino acids profile, and performance of dairy cows. **Journal of Animal Science**, v.77, p.1905-1918, 1999.
- VOLDEN, H.; VELLE, E.; HARSTAD, O. M.; AULIE, A., SJAASTAD, O. V. Apparent ruminal degradation and rumen escape of lysine, methionine, and threonine administered intra ruminally in mixtures to high-yielding cows. **Journal of Animal Science**, v.76, p.1232-1240, 1998.
- VON KEYSERLINGK, M.G.A.; SHELFORD, J.A.; PUCHALA, R.; SWIFT, M.L.; FISHER, L.J. In situ disappearance of amino acids from grass silages in the rumen and intestine of cattle. **Journal of Animal Science**, v.81, p.140-149, 1996.
- WANDERLEY, R. C.; HUBER, J. T.; WU, Z. PESSARAKLI, M.; FONTES JUNIOR, C. Influence of microbial colonization of feed particles on determination of nitrogen degradability by in situ incubation. **Journal of Animal Science**, v.71, p.3073-3077, 1993.
- WEAKLEY, D.C.; STERN, M.D.; SATTER, L.D. Factors affecting disappearance of feedstuffs from bags in the rumen. **Journal of Animal Science**, v.56, p.493-50, 1983.
- WILKERSON, V. A.; KLOPFENSTEIN, T. J.; BRITON, R. A.; STOCK, R. A.; MILLER, P. S. Metabolizable protein and amino acids requirements of growing cattle. **Journal of Animal Science**, v.71, p.2777-2784, 1993.
- WOODS, V. B.; O'MARA, F. P.; MOLONEY, A. P. The in situ ruminal degradability of concentrate feedstuffs in steers as affected by level of feed consumption and ratio of grass silage to concentrate. **Animal Feed Science and Technology**, v.100, p.15-30, 2002.
- ZEOULA, L. M.; ALCALDE, C. R.; FREGADO, F. L.; RAYMUNDO, P. T.; BRANCO, A. F.; DAMASCENO, J. C. Degradação ruminal de grãos de cereais e da raspa de mandioca amassados (compact disc). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, Botucatu, 1998. **Anais**. Botucatu:SBZ. 1998.
- ZINN, R. A.; OWENS, F. N. A rapid procedure for purine measurement and its use for estimating net ruminal protein synthesis. **Canadian Journal of Animal Science**, v.66, p.157-166, 1986.