

**ÉDELIS MARTINAZZO DALLAGNOL**

**TÉCNICA DE OXIDAÇÃO DE AMINOÁCIDO INDICADOR PARA  
DETERMINAÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE DE LISINA EM  
ALIMENTOS PARA SUÍNOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia para obtenção do título de "Magister Scientiae".

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2004**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

D144t  
2004

Dallagnol, Édelis Martinazzo, 1977-

Técnica de oxidação de aminoácido indicador para  
determinação da biodisponibilidade de lisina em alimentos  
para suínos / Édelis Martinazzo Dallagnol. – Viçosa :

UFV, 2004.

ix, 50f. : il. ; 29cm.

Orientador: Aloízio Soares Ferreira

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de

Viçosa.

Inclui bibliografia

1. Suíno - Nutrição. 2. Suíno - Nutrição - Técnica de  
oxidação de aminoácido indicador. 3. Lisina na nutrição  
de suínos. 4. Proteína na nutrição de suínos. I. Universi-  
dade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 20.ed. 636.40852

**ÉDELIS MARTINAZZO DALLAGNOL**

**TÉCNICA DE OXIDAÇÃO DE AMINOÁCIDO INDICADOR PARA  
DETERMINAÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE DE LISINA EM  
ALIMENTOS PARA SUÍNOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do programa de pós-graduação em Zootecnia para obtenção do título de "Magister Scientiae".

APROVADA: 30 de julho de 2004.

---

Dr. Júlio Maria Ribeiro Pupa

---

Prof. George Henrique Kling de Moraes

---

Prof. Juarez Lopes Donzele  
(Conselheiro)

---

Prof. Ricardo Frederico Euclides  
(Conselheiro)

---

Prof. Aloízio Soares Ferreira  
(Orientador)

**Dedico este trabalho de tese aos meus pais e ao meu irmão, que incansavelmente me apoiaram nesta longa e distante jornada.**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas bênçãos de poder realizar este mestrado na Universidade Federal de Viçosa e esta tese na Universidade de Alberta, Canadá, em ambos os casos recebendo assistência financeira (CAPES e Prof. Ron Ball).

A meus pais e a meu irmão, pelo amparo emocional e financeiro e pelo incentivo à formação.

Ao Professor Ronald O. Ball, pela oportunidade de pesquisa e pelo apoio financeiro.

Ao Professor José Chuba Fedalto, pelos contatos internacionais que viabilizaram a realização desta tese na Universidade de Alberta.

Ao Professore Aloísio Soares Ferreira, pela excelência em orientação e pelo empenho em tornar possível a vinculação da pesquisa no exterior ao mestrado na Universidade Federal de Viçosa.

Ao Professor Ricardo Frederico Euclides, pelo auxílio estatístico, pelas sugestões de elaboração e pelo empenho em tornar possível a vinculação da pesquisa no exterior ao mestrado na Universidade Federal de Viçosa.

Aos Professores Juarez Lopes Donzele, Eduardo Lanna, e George Henrique Kling de Moraes e ao Dr. Júlio Maria Pupa, pelas sugestões de elaboração.

Ao Professor José Altivo de Castro, pelo incentivo a cursar Mestrado especificamente na Universidade Federal de Viçosa.

Aos meus Professores de Graduação, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, que continuaram me apoiando durante o curso deste Mestrado.

Ao programa de Pós-Graduação em Zootecnia da UFV, por possibilitar a realização de tão inovador e produtivo programa de intercâmbio científico e por todo o apoio

concedido durante a realização destes dois anos de curso diferenciado.

À CAPES, pela bolsa concedida, que tornou possível a realização do curso.

A todas as demais pessoas que contribuíram para o sucesso deste empreendimento.

## **BIOGRAFIA**

Édelis Martinazzo Dallagnol, filha de Agenor Dallagnol e Vilse Saete Martinazzo Dallagnol, nasceu a 14 de julho de 1977, em Francisco Beltrão, sudoeste do Paraná. Criada em região agrícola e pecuária, tendo avós agricultores, cedo familiarizou-se com grãos e animais.

Obteve graduação em Medicina Veterinária pela Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Campus de São José dos Pinhais, Paraná, em dezembro de 2001. Como destaques neste período exerceu monitoria em Nutrição Animal de março de 2000 a julho de 2001 e cursou seu Estágio Pré-Profissional Supervisionado de três meses no Canadá, nas áreas de gerenciamento de granjas, controle de qualidade do ar em grandes confinamentos e nutrição de suínos, na cidade de Olds, Alberta.

Édelis Martinazzo Dallagnol também é primeira autora dos livros “Responsabilidade Civil do Médico Veterinário” e “Técnicas e Avaliação de Aminoácidos em Alimentos para Suínos”, lançados em 2004, e é co-autora do livro “Exterior e Julgamento de Animais Domésticos”, atualmente no prelo.

Em setembro de 2002, iniciou Mestrado em Zootecnia, na área de Nutrição de Monogástricos, na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais, submetendo-se a defesa de tese no dia 30 de julho de 2004.

## ÍNDICE

|  |     |
|--|-----|
| 1. RESUMO  | vii |
| 2. ABSTRACT  | ix  |
| 3. INTRODUÇÃO GERAL E REVISÃO DE LITERATURA  | 01  |
| Técnicas de avaliação de biodisponibilidade de aminoácidos   | 01  |
| Processamento por calor e biodisponibilidade de aminoácidos  | 08  |
| 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS  | 12  |
| 5. TÉCNICA DE OXIDAÇÃO DE AMINOÁCIDO INDICADOR PARA SE DETERMINAR A BIODISPONIBILIDADE DE AMINOÁCIDOS EM ALIMENTOS PARA SUÍNOS | 16  |
| Introdução   | 16  |
| Metodologia  | 18  |
| Resultados   | 23  |
| Discussão  | 26  |
| Conclusão  | 29  |
| Agradecimentos   | 29  |
| Referências bibliográficas   | 30  |
| 4. BIODISPONIBILIDADE DE LISINA EM ALIMENTOS PARA SUÍNOS VIA TÉCNICA DE OXIDAÇÃO DE AMINOÁCIDO INDICADOR                       | 33  |
| Introdução   | 33  |
| Metodologia  | 34  |
| Resultados   | 39  |
| Discussão  | 44  |
| Conclusão  | 46  |
| Referências bibliográficas   | 46  |
| Agradecimentos   | 46  |
| 5. CONCLUSÕES GERAIS   | 50  |

## RESUMO

DALLAGNOL, Édelis Martinazzo. M. S. Universidade Federal de Viçosa, julho de 2004. **Técnica de oxidação de aminoácido indicador para determinação da biodisponibilidade de lisina em alimentos para suínos.** Orientador: Aloízio Soares Ferreira. Conselheiros: Juarez Lopes Donzele e Ricardo Frederico Euclides.

Visando-se estudar a técnica de oxidação de aminoácido indicador para a determinação da biodisponibilidade de aminoácidos em alimentos para suínos e determinar-se a biodisponibilidade de lisina pela técnica de oxidação de aminoácido indicador de canola, de farelo de soja, de cevada e de farelo de algodão, foram realizados dois experimentos, um para se determinar a biodisponibilidade de lisina em ervilha, ervilha tostada e ervilha tostada com a adição de lisina sintética e outro em que foi determinada a biodisponibilidade em canola, cevada, farelo de algodão e farelo de soja. Em ambos os experimentos foi determinada a reta de biodisponibilidade de lisina com dietas contendo 50, 60, 70 e 80% das exigências de lisina. Em cada experimento foram utilizados quatro suínos machos castrados com peso inicial de 20 kg. Foi empregado o radioisótopo de fenilalanina como indicador do excesso de aminoácidos entre oxidação e síntese protéica. No experimento 1, verificou-se que os *plateaux* de oxidação encontrados por *Linear Response Plateau* para ervilhas, ervilhas tostadas e ervilhas tostadas com lisina foram, respectivamente, 19,79%, 17,28%, e 20,66%; no experimento 2, verificou-se que os *plateaux* de oxidação encontrados por *Linear Response Plateau* para canola, cevada, farelo de algodão e farelo de soja foram, respectivamente, 20,98%, 19,87%, 20,71% e 18,48%. Concluiu-se que a técnica de oxidação de aminoácido indicador (fenilalanina  $^{14}\text{C}$ ), com a metodologia utilizada no primeiro experimento, não é eficiente para se determinar a biodisponibilidade de lisina em alimentos para suínos, que as funções quadráticas não podem ser empregadas para se estabelecer o padrão 100% lisina com as dietas com lisina sintética para comparação com as dietas com alimentos teste, que os valores de biodisponibilidade obtidos pela técnica de oxidação de aminoácido indicador para ervilha, ervilha tostada e ervilha tostada com adição de lisina sintética foram, respectivamente, 72,7%, 80,9% e 69,9%, que apesar da técnica não ter sido, com este desenho experimental, a mais correta, no segundo experimento, os valores de biodisponibilidade de lisina determinados

pela técnica de oxidação de aminoácido indicador de canola, de cevada, de farelo de algodão e de soja foram, respectivamente, 65,4%, 69,9%, 66,4% e 74,8%.

## ABSTRACT

DALLAGNOL, Édélis Martinazzo. M. S. Universidade Federal de Viçosa, July 2004.  
**Indicator amino acid technique for lysine bioavailability determination in feedstuffs for swines.** Advisor: Aloízio Soares Ferreira. Committee members: Juarez Lopes Donzele e Ricardo Frederico Euclides.

Intending to study the indicator amino acid oxidation technique for the determination of the bioavailability of the amino acids in feedstuffs for swines and for determining the bioavailability of lysine by the indicator amino acid oxidation technique of canola, barley, cottonseed meal and soybean meal, two experiments were done, one for determining the bioavailability of lysine in peas, heated peas and heated peas plus sintetic lysine and another in which was determinated the bioavailability of canola, soybean meal, barley and cottonseed meal. Both experiments had determined the lysine bioavailability line with diets contend 50, 60, 70 and 80% of the lysine requirements. In each experiment four castrated male swines weighting initially an average of 20 Kg were used. Phenylalanine radioisotope was used as indicator of the excess of the amino acids between oxidation and protein synthesis. In the first experiment, the *plateaux* found by *Linear Response Plateau* for peas, heated peas and heated peas plus sintetic lysine were, respectively, 19,79%, 17,28%, e 20,66%; in the second experiment, the *plateaux* found by *Linear Response Plateau* for canola, barley, cottonseed meal, and soybean meal were, respectively, 20,98%, 19,87%, 20,71% e 18,48%. It was been concluded that the indicator amino acid ( $^{14}\text{C}$ -phenylalanine) oxidation technique, with the methodology utilized in the first experiment, is not efficient for determining the bioavailability of lysine in feedstuffs for swines, that quadratic functions can not be useds for stablishing the 100% pattern for lysine availability with the sintetic lysine diets for comparison with the test feed diets, that the values for bioavailability obtained by the technique of indicator amino acid oxidation of peas, heated peas and heated peas plus sintetic lysine were, respectively, 72,7%, 80,9% e 69,9%, that despite the technique has not been, with this experimental design, the most correct, in the second experiment, the values of lysine bioavailability determinated by the technique of indicator amino acid oxidation for canola, soybean meal, barley and cottonseed meal were 65,4%, 69,9%, 66,4% e 74,8%.

## INTRODUÇÃO GERAL E REVISÃO DE LITERATURA

### 1. TÉCNICAS DE AVALIAÇÃO DE BIODISPONIBILIDADE DE AMINOÁCIDOS

A composição aminoacídica da proteína ideal para suínos em crescimento representa o balanço em que os aminoácidos são necessários para a manutenção e para o crescimento (Tuitoeck et al., 1997; Fuller et al., 1989; Sève e Lahaye, 2003). Proteína ideal pode ser definida como sendo a quantidade mínima de aminoácidos essenciais e não essenciais compatível com a máxima utilização da proteína como um todo (Wang e Fuller, 1989).

A acurácia das dietas elaboradas para satisfazerem as exigências específicas de aminoácidos para suínos pode ser determinada pelo conhecimento da disponibilidade de aminoácidos nos alimentos e esta pode variar tanto entre alimentos quanto dentro do próprio alimento, bem como pode-se alterar em função do processamento ao qual o alimento foi submetido (Tuitoeck et al., 1997; Black e Batterham, 1987).

A qualidade da proteína dietética tem sido determinada pelo seu conteúdo de aminoácidos e pela digestibilidade e disponibilidade destes aminoácidos (Wang e Fuller, 1989).

Lisina tem sido apresentada como o primeiro aminoácido limitante em rações para suínos (Myer et al., 1996) e, em dietas formuladas tomando-se por base os ingredientes milho e soja, ela tem sido considerada como o aminoácido que determina a quantidade de proteína bruta da dieta. Todavia, a lisina deve estar presente em determinada posição na cadeia péptica, para estar disponível para os animais e, por isso, nem toda a lisina da ração é digestível. Ela pode não ser liberada do alimento pelos processos digestivos fisiológicos. Cevada e canola, por exemplo, apresentam apenas 61 e 71% de lisina digestível (digestibilidade ileal), respectivamente (Fan e Sauer, 1994).

Além disto, nem toda a lisina digestível pode estar disponível para síntese protéica do animal (van Barneveld et al., 1994a; Ball et al., 1996). Uma certa quantidade de lisina pode ser digerida e absorvida, mas dependendo de outros fatores ela não pode ser usada pelo suíno para formação de proteína corporal (Batterham, 1992; Ball et al. 2002). Esta lisina pode ter sido absorvida ligada, por exemplo, a carboidratos

devido a prévia reação de Maillard, o que inviabiliza sua utilização pelo animal. Ela é digerida, absorvida, mas não utilizada, sendo excretada via urina.

Disponibilidade pode ser definida como a proporção de um aminoácido em um alimento que está em uma forma adequada para sua digestão e utilização pelo animal (Leibholz, 2002). A utilização de um aminoácido pode variar devido à interação com outros ingredientes da ração ou devido ao estado fisiológico do animal (Leibholz, 2002). Além disto, excessos de aminoácidos podem fazer decair a performance do animal; geralmente, a principal resposta a quantidades excessivas de aminoácidos é a redução da ingestão alimentar (Langer e Fuller, 1996).

Assim, verifica-se a necessidade de serem desenvolvidas técnicas para a determinação da lisina metabolicamente disponível em alimentos para suínos (Black e Batterham, 1987; Ball et al., 2002). Se a informação sobre disponibilidade metabólica de diversos ingredientes estivesse disponível, as rações poderiam ser formuladas com maior acurácia e poderiam ter um custo menor, e ainda poderiam proporcionar melhor desempenho aos animais, com menores teores de nitrogênio excretados por eles (Ball et al., 2002). Concomitantemente com a menor quantidade de nitrogênio excretado, ocorrerá também a redução de dióxido de carbono eliminado pelos suínos e com isso poderá haver redução de problemas associados à poluição ambiental.

Apesar dos conhecimentos teóricos e científicos existirem há mais de um século, somente a partir de 1970 que o homem intensificou as suas pesquisas na tentativa de se estabelecer o melhor padrão protéico para os suínos, em especial com relação ao padrão de aminoácidos. A partir daí, as exigências em termos de aminoácidos (em especial lisina e metionina) foram expressas como aminoácidos digestíveis e, embora a digestibilidade de proteína em muitos alimentos houvesse sido determinada, as exigências em termos de proteína para suínos continuaram sendo expressas na forma de proteína bruta. Somente em 1981, quando o "The Nutrient Requirements of Pigs" (Agricultural Research Council, Estados Unidos) foi publicado, as exigências protéicas foram expressas como proteína digestível e um padrão ideal de aminoácidos foi divulgado (Fuller, 2003).

Desde então, muito se tem pesquisado no intuito de se desenvolverem técnicas para se determinar a biodisponibilidade de aminoácidos.

Num primeiro momento, trabalhou-se com digestibilidade fecal, ou seja, aminoácidos ingeridos menos aminoácidos excretados nas fezes. Esta técnica foi logo

descartada pois não era possível quantificar a interferência dos microorganismos do intestino grosso no processo. Então, consideráveis esforços passaram a ser dispendidos em estudos da digestibilidade ileal dos aminoácidos para suínos, pois com esta técnica tornou-se possível determinar a porção de aminoácidos absorvidos até o final do intestino delgado sem se computar a influência da microbiota do intestino grosso (van Barneveld et al., 1994a e b).

Todavia, o intestino delgado tem sua própria microbiota, que pode intervir na digestibilidade dos aminoácidos (Fuller, 2003). Além disto, a técnica da digestibilidade ileal assume que se um aminoácido não foi coletado na porção terminal do íleo, então ele está disponível para utilização pelo suíno. Isso pode não ser verdadeiro devido a fatores como o processamento inadequado por calor (Batterham, 1992) ou o intestino delgado sintetizar aminoácidos, entre os quais a lisina (Torrallardona et al., 2003b).

Torrallardona et al. (2003a, 2003b) comprovaram que o intestino delgado é o principal sítio de absorção de aminoácidos, demonstraram que a microbiota intestinal do suíno sintetiza, a partir de fontes de nitrogênio protéico e não protéico, aminoácidos essenciais, que são absorvidos pelo animal, e determinaram a absorção de lisina bacteriana como de 1g/dia, o que num suíno de 20 kg representa cerca de 10% dos requerimentos diários.

A resposta de animais a um alimento teste pode ser influenciada por substâncias no alimento teste que não estão presentes no alimento padrão, como inibidores de enzimas digestivas, polissacarídeos não amiláceos, hemaglutininas e um amplo leque de constituintes da planta que pode afetar o apetite, a digestão ou o metabolismo (Fuller, 2003; Kim et al., 1983a). Por mais que estas características sejam inerentes aos alimentos e qualquer redução na digestibilidade de aminoácidos que elas causem possa ser reconhecida como uma real parte da caracterização destes alimentos, seus efeitos podem não ser proporcionais à sua inclusão na dieta. Assim, estimativas feitas em dietas em que estes alimentos são fonte única de proteína podem não predizer adequadamente o efeito da inclusão destes alimentos numa dieta mista (Fuller, 2003). Além disso a adição de um aminoácido sintético em grandes quantidades pode causar um desequilíbrio de aminoácidos e conseqüentemente o desequilíbrio de aminoácidos pode mascarar a biodisponibilidade daquele aminoácido que se está avaliando (Fuller, 2003).

Convém ainda destacar que tanto com a técnica da biodisponibilidade fecal quanto com a técnica da biodisponibilidade ileal a avaliação é feita para cada

aminoácido separadamente, o que torna a avaliação completa de todos os aminoácidos morosa, trabalhosa e onerosa (van Barneveld, 1993; van Barneveld et al., 1994c; Fuller, 2003).

Existem também técnicas para determinação da biodisponibilidade de aminoácidos *in vitro*, porém os valores determinados podem ser menos sustentáveis uma vez que os efeitos do consumo de ração pelo animal, da digestão e do metabolismo não são considerados (van Barneveld, 1993; van Barneveld et al., 1994c; Fuller, 2003). Pode-se citar dentre as técnicas de biodisponibilidade *in vitro* o diesspectrofotometria NIR (*Near Infra-red Reflectance Spectrophotometry* – NIRS), que tem sido apontada como a mais promissora para a determinação rápida da estimativa dos aminoácidos disponíveis (Batterham, 1992).

Neste contexto, é possível assumir que com as técnicas da digestibilidade ileal e *in vitro* nem sempre se consegue determinar a biodigestibilidade verdadeira dos aminoácidos, ou seja, a proporção do total do aminoácido que é digerida e absorvida sob forma apropriada para a síntese protéica animal (Batterham, 1992; van Barneveld et al., 1994c). Diversos estudos têm comprovado que as diferentes espécies de animais possuem diferentes capacidades de aproveitamento dos aminoácidos proveniente de uma mesma fonte protéica, tornando-se portanto necessária adequada mensuração da biodisponibilidade de um aminoácido diretamente com a espécie animal de interesse (Batterham, 1992).

As mais recentes técnicas empregadas na tentativa de se determinar a biodisponibilidade de aminoácidos têm envolvido a utilização de carbono<sup>14</sup> (Batterham, 1992; Ball e Bayley, 1985). Black e Batterham (1987) descreveram o emprego de aminoácido marcado para o estudo da biodisponibilidade deste mesmo aminoácido. Esta técnica requer uma fonte de traçador adequadamente marcado para cada um dos aminoácidos essenciais. A utilização de aminoácido indicador para o estudo da biodisponibilidade de outro aminoácido foi descrita primeiramente por Kyu-il Kim et al. (1983a). Esta técnica envolve a mensuração de alterações na oxidação de um aminoácido indicador em resposta a ingestão gradual de outro aminoácido (House et al., 1998).

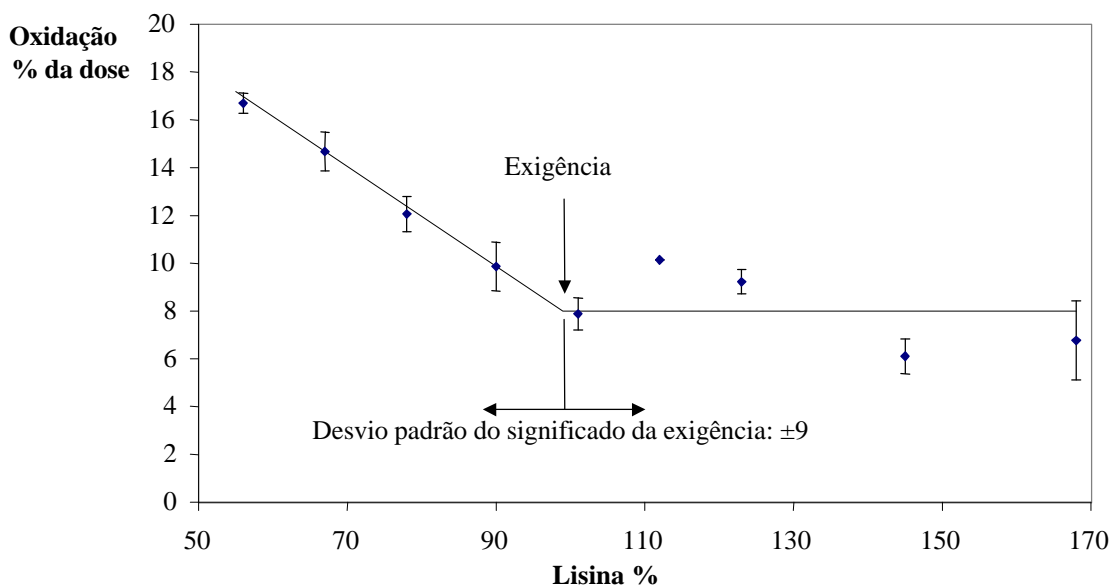
Se nenhum aminoácido essencial estiver deficiente na dieta em relação a outros aminoácidos, ele é conservado por mecanismos que evitam sua oxidação. Todavia, mesmo que o aminoácido esteja completamente ausente na dieta, a oxidação não é

completamente evitada e esta oxidação mínima forma o maior componente das exigências de manutenção de um animal (Mnilk et al., 1996).

Em sendo a lisina o primeiro aminoácido limitante para a síntese protéica, se houver excesso dos outros aminoácidos eles devem ser oxidados (Kim et al., 1983a e b; Zello et al., 1993). Salter et al. (1990) trabalharam com lisina como primeiro aminoácido limitante e vinham observando crescentes deposição de proteína e *turnover* protéico conforme adicionavam lisina à dieta e descobriram que ao redor do valor em que as exigências de lisina são supridas e dali pra cima tanto a taxa de deposição de proteína pelo animal quanto o seu *turnover* protéico deixaram de aumentar.

Aminoácidos absorvidos pelo trato digestivo que não são usados para síntese protéica e outras funções essenciais entram no *pool* comum de combustíveis de tecido, quer para serem oxidados quer para serem utilizados como combustíveis primariamente através da síntese de ácidos graxos, o que é importante inclusive para prevenir um potencial acúmulo de aminoácidos livres tóxicos (Kim et al., 1983a; Mnilk et al., 1996).

Face à teoria exposta, idealizou-se a técnica do aminoácido indicador, na qual se leva em consideração que enquanto a lisina dietética for deficiente, o aminoácido indicador não pode ser incorporado na proteína e o excesso deve ser oxidado. Conforme a lisina dietética vai sendo aumentada, mais aminoácido indicador vai sendo incorporada em proteína e menos vai sendo oxidada (Zello et al., 1993). Se a quantidade do aminoácido primeiro limitante estiver abaixo das necessidades reais dos animais, a mudança na oxidação do indicador dá uma resposta linear em função dos aumentos na ingestão deste aminoácido (Ball et al., 2002). Esta condição, segundo House et al. (1998), é necessária para se garantir o êxito da técnica. Esta particularidade ganha importância à medida que uma resposta não-linear complicaria o cálculo da biodisponibilidade de lisina. Se a lisina fosse usada em níveis superiores aos referentes à necessidade dos animais oxidação de fenilalanina permaneceria constante, uma vez que aumentos na quantidade de lisina não levariam ao aumento na síntese protéica. O nível de lisina dietética em que a oxidação de fenilalanina muda do padrão decrescente para o padrão constante tem sido denominado de *breakpoint* e equivale à necessidade de lisina para o animal (Ball e Bayley, 1984; Zello et al., 1993, Bos et al., 2002) (Figura 1).



**Figura 1: Modelo do padrão de determinação da exigência de lisina pela técnica de oxidação do aminoácido indicador.**

Fonte: Ball et al., 2002.

A oxidação de fenilalanina reflete a síntese protéica (Ball e Bayley, 1985, 1986; Zello et al., 1993) que, a seu turno, é dependente da lisina metabolicamente disponível para incorporação em proteína. Então, a oxidação de fenilalanina reflete a lisina metabolicamente disponível dispensando-se qualquer cálculo indireto relativo a digestibilidade dietética ou perdas endógenas específicas para cada alimento. Todavia, pode-se calcular a lisina metabolicamente disponível a partir da oxidação de fenilalanina se o animal for alimentado com níveis deficientes de lisina, baseando-se na redução da oxidação da lisina de dietas teste em relação à equação linear obtida como padrão.

O aminoácido mais usado como indicador tem sido a fenilalanina. A escolha de fenilalanina como o aminoácido indicador se deve principalmente a duas razões: tem sido o aminoácido essencial marcado mais em conta disponível no mercado (Kim et al., 1983a), e tem sido degradada principalmente no fígado (Ball e Bayley, 1984; Kim et al., 1983a).

Por ser o fígado local de oxidação da fenilalanina, o nível de oxidação deste aminoácido pode ser afetado pelo padrão de aminoácidos que entram no fígado após uma refeição (Ball e Bayley, 1984). A fenilalanina-4-mono-oxigenase, enzima responsável pela conversão de fenilalanina a tirosina, bem como pelo passo final da

degradação da fenilalanina, somente é encontrada no fígado (Ball e Bayley, 1984). A tirosina derivada da hidroxilação de fenilalanina no fígado é degradada sem a necessidade de se equilibrar com a tirosina presente no plasma (Ball e Bayley, 1984). Além disto, o carbono carboxílico da fenilalanina é perdido sob forma de CO<sup>2</sup> durante a formação de todos os produtos metabólicos, à exceção dos hormônios tireoideanos; uma vez que estes produtos são sintetizados a partir da tirosina fora do fígado e em quantidades diminutas, não é provável que eles afetem as medições da oxidação hepática da fenilalanina (Ball e Bayley, 1984).

Além disto, foi demonstrado que os *pools* de fenilalanina livre no plasma e no sangue são estreitamente regulados; o que se explica pelos sensíveis mecanismos de ativação da fenilalanina-4-mono-oxigenase, que pode resultar em um aumento de 20 vezes na atividade enzimática (Ball e Bayley, 1984).

A lisina é o único aminoácido essencial além da fenilalanina que é inicialmente oxidado no fígado e cujo carbono carboxílico deve ser eliminado como CO<sup>2</sup> (Ball e Bayley, 1984).

A lisina tem sido degradada na mitocôndria hepática primeiro por converter-se a sacaropina pela enzima lisina- $\alpha$ -cetoglutarato redutase (LKGR), que é a reação limitante; a sacaropina é então clivada a 2-amioadipic semialdeido e ácido glutâmico, o que é catalizado pelas enzimas lisina:2-oxoglutarate redutase (LOGR; EC 1.5.1.8) e sacaropina desidrogenase (SADH; EC 1.5.1.9), respectivamente (Beckett, 1990; Scislawski, 1994).

Para se assegurar máxima sensibilidade da oxidação de fenilalanina com respeito à adequação dos níveis dietéticos de outros aminoácidos é necessário que a dieta não seja deficiente em fenilalanina e nem contenha mais do que 20% de excesso de fenilalanina (Kim et al., 1983a), porque a deficiência de fenilalanina resultaria em subestimação da exigência do aminoácido a ser estudado, enquanto que o excesso elevaria a oxidação de fenilalanina quando níveis de outros aminoácidos essenciais estiverem adequados, diminuindo a sensibilidade do procedimento (Kim et al., 1983a; Ball et al., 1996).

A oxidação de aminoácidos essenciais é dependente do nível dietético do aminoácido primeiro-limitante (Ball e Bayley, 1984). Kyu-il Kim et al. (1983a) comprovaram que a redução na utilização de um aminoácido essencial para síntese protéica devido a uma deficiência dietética de outro

aminoácido essencial pode ser detectada pelo aumento da liberação de  $^{14}\text{CO}_2$  da dose traçadora do aminoácido indicador, através de estudos com dietas deficientes em lisina ou em fenilalanina. Demonstraram também que o catabolismo do aminoácido indicador não foi influenciado pelo aumento do nível dietético da lisina acima de um ponto específico.

A oxidação da fenilalanina aumenta quando uma refeição deficiente em um aminoácido é oferecida, e o nível desta oxidação é proporcional ao grau da referida deficiência (Ball e Bayley, 1984; Ball e Bayley, 1986). Um desvio da linearidade na mensuração da resposta oxidativa poderia afetar a estimativa do valor real (House et al., 1998). Para a técnica de indicador, o desvio da linearidade resultaria numa superestimação do valor real, enquanto que em experimentos com oxidação direta o valor real tende a ser subestimado (House et al., 1998).

A perda do carbono-1 da fenilalanina resulta da ação da 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase, a qual converte 4-hidroxifenilpiruvato a homogentisato e dióxido de carbono (House et al., 1998). Desvios na resposta de oxidação de fenilalanina a baixos níveis de ingestão de lisina podem dever-se ao excesso do suprimento de fenilalanina a baixos níveis de ingestão de lisina, com a fenilalanina ingerida excedendo a capacidade dos caminhos catabólicos (House et al., 1998).

Quanto ao espaço de tempo requerido entre as coletas de amostras de ar com vistas a adequada sensibilidade e aproveitamento do tempo, Ball e Bayley (1985) sugerem que um período de 20 minutos seja necessário para que 99% do ar seja trocado dentro de uma gaiola de oxidação, ou seja, para que se atinja o equilíbrio entre as concentrações de gás carbônico e de oxigênio dentro da gaiola, antes que as mensurações possam ser feitas. No mesmo trabalho, os autores relatam que as mensurações do efeito do balanço aminoacídico da dieta foram mais sensíveis na quarta hora após a primeira refeição-teste, sendo um total de duas refeições-teste fornecidas com duas horas de intervalo, contendo o radioisótopo.

Assim, verifica-se a necessidade de se estabelecerem técnicas que mensurem a real utilização dos aminoácidos.

## **2. PROCESSAMENTO POR CALOR E BIODISPONIBILIDADE DE AMINOÁCIDOS**

Ervilhas (*Pisum sativum*) são uma fonte protéica de boa qualidade, em termos de digestibilidade e balanço de aminoácidos, e estão livres da maioria dos fatores anti-nutricionais, à exceção de fatores anti-trípticos, que são encontrados nelas em baixos níveis (van Barneveld et al., 1994a).

O aquecimento de ervilhas a uma temperatura de 110°C pode melhorar a digestibilidade ileal de lisina, mas diminui significativamente a sua utilização pelo suíno (van Barneveld et al., 1994a; van Barneveld et al., 1994c). O aquecimento de ervilhas em temperaturas acima de 150°C pode deprimir significativamente a concentração total de lisina (Batterham, 1992; van Barneveld et al., 1994a) cistina e arginina (van Barneveld et al., 1994a) e comprometer a digestibilidade ileal de ácido aspartico, de ácido glutâmico, de isoleucina, de leucina, de fenilalanina, de histidina, de arginina e, principalmente, de lisina (van Barneveld et al., 1994a; van Barneveld et al., 1994c). Tem-se verificado, também, um decréscimo linear significativo na digestibilidade fecal de todos os aminoácidos com o aquecimento em temperaturas acima de 150 °C, sugerindo, conseqüentemente, que os microorganismos do intestino grosso podem ter limitada a sua habilidade de digerir e utilizar aminoácidos após tratamento térmico excessivo das ervilhas (van Barneveld et al., 1994a).

Perdas de lisina, arginina e cistina em ervilhas tratadas termicamente podem ser devidas a reações de Maillard. Estas, resultam na formação de complexos com açúcares redutores e conseqüente perda de lisina. Em estágios mais avançados, resultam na formação dos pigmentos marrons evidentes em ervilhas aquecidas a temperaturas acima de 150 °C e responsáveis por grande destruição de lisina e arginina e, em menor extensão, de cistina, triptofano e histidina (van Barneveld et al., 1994a; Hurrell e Carpenter, 1977). Perdas de lisina e cistina também podem ocorrer devido à formação de ligações cruzadas entre aminoácidos.

O aquecimento de ervilhas a 165°C pode reduzir a biodisponibilidade de lisina a 70% e tornar os valores de digestibilidade fecal de aminoácidos superiores aos de digestibilidade ileal (van Barneveld et al., 1994a; van Barneveld et al., 1994c). Van Barneveld et al. (1994c) observaram uma diminuição na retenção de energia na massa corporal de suínos alimentados com dietas contendo ervilhas aquecidas a 150°C e a 165°C. Estes autores sugeriram que esta redução pode ter sido devido à maior demanda de energia para catabolizar os aminoácidos excedentes ou não utilizáveis dessas dietas.

Batterham (1992) estabeleceu a relação entre digestibilidade ileal e biodisponibilidade de aminoácido e verificou que a ação do calor alterou a biodisponibilidade de lisina, treonina, metionina e triptofano, enquanto não alterou significativamente a biodisponibilidade de leucina, isoleucina e valina. Este autor concluiu que para lisina, treonina, metionina e triptofano, a aferição de digestibilidade ileal superestima a sua biodisponibilidade, não podendo ser empregada a determinação da digestibilidade ileal como previsão de biodisponibilidade, enquanto que para leucina, isoleucina e valina, a digestibilidade ileal pode perfeitamente servir como estimativa da biodisponibilidade destes aminoácidos, uma vez que ou estes aminoácidos são pouco susceptíveis a danos pelo calor ou o dano sofrido tem pouco ou nenhum efeito na síntese protéica em nível muscular.

A lisina tem sido considerada o aminoácido mais susceptível a reações com outros compostos, uma vez que ela tem um grupo  $\epsilon$ -amino livre quando ligada a outros aminoácidos (Batterham, 1992; Ferrer et al., 2000). Quando sofre ação do calor, na presença de açúcares redutores, este grupo amino livre forma complexos com tais açúcares por meio de reações de Maillard, tais como frutoselisina e lactuloselisina (galactose-frutoselisina), em que esses açúcares são ligados a  $\epsilon$ -amino grupos de lisina (Batterham, 1992; van Barneveld et al., 1994a; Ferrer et al., 2000; Erbersdobler, 1977). Em estágios mais avançados, compostos indesejáveis como furfurais podem ser encontrados (Ferrer et al., 2000).

Na ausência de açúcares redutores, o grupo  $\epsilon$ -amino livre da lisina pode reagir com cadeias laterais de outros aminoácidos e formar isopeptídeos, tais como aspartil-lisina, glutamyl-lisina ou lisinoalanina, que podem ser absorvidos mas cujo valor nutricional é difícil de se aquilatar (Batterham, 1992; van Barneveld et al., 1994a). Lisinoalanina tem inclusive revelados efeitos tóxicos (Batterham, 1992).

O principal fator que predispõe a reações de Maillard são altas concentrações de lisina e de açúcares redutores (sendo a lactose o mais atuante), seguido de: qualidade do material cru, altas temperaturas durante o processo de manufaturação, alta temperatura de estocagem e longo tempo de estocagem (Ferrer et al., 2000). Em temperaturas ainda mais intensas, ocorre o chamado *cross-link*, ou ligações cruzadas entre proteínas, que não afeta apenas lisina e arginina, mas todos os aminoácidos, diminuindo significativamente seu valor nutricional (Hurrell e Carpenter, 1977).

Objetivou-se, com este trabalho, estudar a técnica de oxidação de aminoácido indicador para a determinação da biodisponibilidade de aminoácidos e determinar a biodisponibilidade de lisina, pela mesma técnica, de canola, farelo de soja, cevada e farelo de algodão.

Esta tese foi redigida em capítulos, seguindo-se as normas para feitura de tese da UFV (UFV, 2000), e os capítulos 2 e 3, redigidos de acordo com as normas de publicação de artigos, exceto com relação à língua, da Revista *Livestock Production Science*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALL, R. O.; BAYLEY, H. S. Tryptophan requirement of the 2,5-kg piglet determined by the oxidation of an indicator amino acid. **J. Nutr.**, v.114, p. 1741-1746, 1984.

BALL, R. O.; BAYLEY, H. S. The effect of diarrhea on the oxidation of <sup>14</sup>C-phenylalanine in piglets receiving diets varying in protein and proline concentration. **Can. J. Ve. Res.**, v. 50, p. 393-396, 1985.

BALL, R. O.; BAYLEY, H. S. Influence of dietary protein concentration on the oxidation of phenylalanine by the young pig. **British Journal of Nutrition**, v. 55, p. 651-658, 1986.

BALL, R. O.; HOUSE, J. D./ WYKES, L. J.; PENCHARZ, P. B. A piglet model for neonatal amino acid metabolism during total parenteral nutrition. In: **Advances in Swine in Biomedical Research**, New York: Tumbleson and Schook Plenum Press, 1996, p. 713-731.

BALL, R. O.; MÖHN, S.; BERTOLO, R. F. P.; KORVER, D. Rapid new methods for measuring amino acid requirements and 'true' amino acid availability in feeds for swine and poultry. In: **Western Nutrition Conference**, 23. 2002, p. 151-161.

BATTERHAM, E. S. Availability and utilization of amino acids for growing pigs. **Nutrition Research Reviews**, v. 5, p. 1-18, 1992.

BECKETT, P.; CADENHEAD, A.; REES, W. D.; FULLER, M. F. Lysine oxidation by rat hepatocytes: effect of serum from pigs given a high or low lysine diet. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 18, n. 6, p. 1208, 1990.

BLACK, J. L. e BATTERHAM, E. S. A proposed method for determining amino acid availability in pig diets. In: **Proceedings of the Inaugural Conference of the Australasian Pig Science Association (A.P.S.A.)**, Albury, NSW, November, 1987. (Ed. BARNETT, J. L.; BATTERHAM, E. S.; CRONIN, G. M.; HANSEN, C.; HEMSWORTH, P. H.; HENNESSY, D. P.; HUGHES, P. E.; JOHNSTON, N. E.; KING, R. H.) Australasian Pig Science Association, Werribee, Victoria, Australia. p. 145.

BOS, C.; GAUDICHON, C.; TOMÉ, D. Isotopic studies of protein and amino acid requirements. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 5, n. 1, p. 55-61, 2002.

ERBERSDOBLER, H. F. The biological significance of carbohydrate-lysine crosslinking during heat-treatment of food proteins. In: **Symposium on Protein Crosslinking: Nutritional and Medical Consequences**, New York, 1977. [M. Friedman, editor], New York: Plenum Press, 1977, p. 367-378.

FAN, M. Z.; SAUER, W. C. Determination of apparent ileal amino acid digestibility in barley and canola meal for pigs with the direct, difference and regression methods. **J. Anim. Sci.**, vol. 73, p. 2364-2374, 1994.

FERRER, E.; ALEGRÍA, A.; FARRÉ, R.; ABELLÁN, P.; ROMERO, F. Effects of thermal processing and storage on available lysine and furfural compounds contents of infant formulas. **J. Agric. Food Chem.**, vol. 48, p. 1817-1822, 2000.

FULLER, M. F.; McWILLIAM, R.; WANG, T. C.; GILES, L. R. The optimum dietary amino acid pattern for growing pigs. 2. Requirements for maintenance and for tissue protein accretion. **British Journal of Nutrition**, vol. 62, p. 255-267, 1989.

FULLER, Malcolm. Amino Acid Bioavailability - A Brief History. In: **International Symposium on Digestive Physiology in Pigs, 9**. Banff, 2003. [Ronald O. Ball, editor], Edmonton: University of Alberta, 2003, p.183-198, vol. 1.

HOUSE, J. D.; PENCHARZ, P. B.; BALL, R. O. Lysine requirement of neonatal piglets receiving total parenteral nutrition as determined by oxidation of the indicator amino acid L-[1-<sup>14</sup>C]phenylalanine. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 67, p. 67-73, 1998.

HURRELL, R. F.; CARPENTER, K. J. Nutritional significance of cross-link formation during food processing. In: **Protein Crosslinking: Nutritional and Medical Consequences (Advances in Experimental Medicine and Biology vol. 86B)**, New York, 1977. [M. Friedman, editor] New York: Plenum Press. 1977, p. 225-238.

HURRELL, R. F.; CARPENTER, K. J. The estimation of available lysine in foodstuffs after Maillard reactions. **Prog. Fd. Nutr. Sci.**, v. 5, p. 159-176, 1981.

KIM, K.-I.; McMILLAN, I.; BAYLEY, H. S. Determination of amino acid requirements of young pigs using an indicator amino acid. **British Journal of Nutrition**, v. 50, p. 369-382, 1983a.

KIM, K.-I.; ELLIOTT, J. I.; BAYLEY, H. S. Oxidation of an indicator amino acid by young pigs receiving diets with varying levels of lysine or threonine, and an assessment of amino acid requirements. **British Journal of Nutrition**, v. 50, p. 391-399, 1983b.

LANGER, S.; FULLER, M. The effects of excessive amounts of protein on lysine utilization in growing pigs. **British Journal of Nutrition**, v. 76, p. 743-754, 1996.

LEIBHOLZ, J. The availability of lysine in diets for pigs: comparative methodology. **British Journal of Nutrition**, v. 67, p. 401-410, 1992.

MNILK, B.; HARRIS, C. I.; FULLER, M. F. Lysine utilization by growing pigs: simultaneous measurement of protein accretion and lysine oxidation. **British Journal of Nutrition**, v. 75, p. 57-67, 1996.

MYER, R. O.; BRENDEMUHL, J. H.; BARNETT, R. D. Crystalline lysine and threonine supplementation of soft red winter wheat or triticale, low-protein diets for growing-finishing swine. **J. Anim. Sci.**, v. 74, n. 3, p. 785-792, 1996.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). **Nutrient requirements of swine**. Washington/DC: National Academic Press, 1998.

NORMAS DE FEITURA DE TESE aprovadas pelo Conselho de Pós-Graduação da UFV, em 01 de dezembro de 2000.

SALTER, D. N.; MONTGOMERY, A. I.; HUDSON, A.; QUELCH, D. B.; ELLIOTT, R. J. Lysine requirements and whole-body protein turnover in growing pigs. **British Journal of Nutrition**, v. 63, p. 503-513, 1990

SCISLOWSKI, P. W.D; FOSTER, A. R.; FULLER, M. F. Regulation of oxidative degradation of L-lysine in rat liver mitochondria. **Biochem. J.**, v. 300, p. 887-891, 1994.

SÈVE, B.; LAHAYE, L. Nitrogen and amino acid cost of digestion: dietary factors affecting ileal endogenous losses and consequences on the net availability of dietary amino acids for maintenance and growth. In: **International Symposium on Digestive Physiology in Pigs, 9**. Banff, AB, Canada, 2003. [Ronald O. Ball, editor] Edmonton: University of Alberta, 2003, p. 263a-v, v. 1.

TORRALLARDONA, D.; HARRIS, I. C.; FULLER, M. F. Pigs' gastrointestinal microflora provide them with essential amino acids. **American Society for Nutritional Sciences**, p. 1127-1131, 2003a.

TORRALLARDONA, D.; HARRIS, I. C.; FULLER, M. F. Lysine synthesized by the gastrointestinal microflora of pigs is absorbed, mostly in the small intestine. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 284, p. E1177-E1180, 2003b.

TUITOEK, K.; YOUNG, L. G.; de LANGE, C. F. M.; KERR, B. J. The effect of reducing excess dietary amino acids on growing-finishing pig performance: an evaluation of the ideal protein concept. **J. Anim. Sci.**, v. 75, p. 1575-1583, 1997.

WANG, T. C.; FULLER, M. F. The optimum dietary amino acid pattern for growing pigs. 1. Experiments by amino acid deletion. **British Journal of Nutrition**, v. 62, p. 77-89, 1989.

van BARNEVELD, R. J. Rapid assessment of amino acid availability for growing pigs – development and potential. In: **Manipulating pig production, 4**. Australasian Pig Science Association, Attwood, Australia, 1993, p. 204-214.

van BARNEVELD, R. J.; BATTERHAM, E. S.; NORTON, B. W. The effect of heat on amino acid for growing pigs. 1. A comparison of ileal and faecal digestibilities of amino acid in raw and heated-treated field peas (*Pisum sativum* cultivar Dundale). **British Journal of Nutrition**, v. 72, p. 221-241, 1994a.

van BARNEVELD, R. J.; BATTERHAM, E. S.; NORTON, B. W. The effect of heat on amino acid for growing pigs. 2. Utilization of ileal-digestible lysine from heat-treated field peas (*Pisum sativum* cultivar Dundale). **British Journal of Nutrition**, v. 72, p. 243-256, 1994b.

van BARNEVELD, R. J.; BATTERHAM, E. S.; NORTON, B. W. The effect of heat on amino acid for growing pigs. 3. The availability of lysine from heated-treated field peas (*Pisum sativum* cultivar Dundale) determined using the slope-ratio assay. **British Journal of Nutrition**, v. 72, p. 257-275, 1994c.

ZELLO, G. A.; PENCHARZ, P. B.; BALL, R. O. Dietary lysine requirement of young adult males determined by oxidation of L-[1-<sup>13</sup>C]phenylalanine. **The American Physiological Society**, p. E667-E685, 1993.

# **TÉCNICA DE OXIDAÇÃO DE AMINOÁCIDO INDICADOR PARA SE DETERMINAR A BIODISPONIBILIDADE DE AMINOÁCIDOS EM ALIMENTOS PARA SUÍNOS.**

## **INTRODUÇÃO**

O aminoácido de um alimento, se não for recuperado da digesta, no íleo terminal, de acordo com o conceito de digestibilidade, ele foi absorvido e está presumivelmente disponível para o animal (Prawirodigdo et al., 1997); entretanto, o aminoácido pode ser digerido e absorvido, mas não ser utilizado pelo animal, sendo excretado pela urina.

A disponibilidade de um aminoácido pode ser definida como a porção do aminoácido na dieta que é absorvida em forma apropriada para utilização pelo organismo animal, ou seja, trata-se de um conceito abstrato, pois o aminoácido disponíveis não pode ser mensurado, mas apenas estimado (Leibholz, 1992; Gatel, 1994; Prawirodigdo et al., 1997). As técnicas normalmente utilizadas (dieta isenta de proteína, técnica de comparação com caseína, entre outras) não têm possibilitado uma quantificação acurada da biodisponibilidade de aminoácidos.

A determinação da disponibilidade de aminoácidos em dietas para suínos tem inspirado muitas pesquisas; todavia, ainda não se tem por certa uma técnica adequada, dentre as existentes, para esta finalidade, nem a validade dos resultados destas técnicas (Batterham, 1992; Leibholz, 1992).

A técnica de oxidação de aminoácido indicador parte da premissa de que aminoácidos absorvidos pelo trato digestivo que não são usados para síntese protéica e outras funções essenciais entram no *pool* comum de combustíveis para o tecido, quer

para serem oxidados quer para serem utilizados como combustíveis primariamente através da síntese de ácidos graxos (Kim et al., 1983).

Na técnica do aminoácido indicador leva-se em consideração que enquanto a lisina dietética for deficiente, o aminoácido indicador não pode ser incorporada na proteína e o excesso deve ser oxidado. Conforme a lisina dietética vai sendo aumentada, mais aminoácido indicador vai sendo incorporada em proteína e menos vai sendo oxidada (Zello et al., 1993). Se a quantidade do aminoácido primeiro limitante estiver abaixo das necessidades reais dos animais, a mudança na oxidação do indicador dá uma resposta linear em função dos aumentos na ingestão deste aminoácido (Ball et al., 2002).

O aminoácido mais usado como indicador tem sido a fenilalanina. A escolha de fenilalanina como o aminoácido indicador se deve a duas razões principais: ela tem sido o aminoácido essencial marcado mais em conta disponível no mercado (Kim et al., 1983), e ela é degradada no fígado (Kim et al., 1983; Ball e Bayley, 1984).

A oxidação de fenilalanina reflete a síntese protéica (Ball e Bayley, 1985, 1986; Zello et al., 1993) que, a seu turno, é dependente da lisina metabolicamente disponível para incorporação em proteína. Então, a oxidação de fenilalanina deve refletir a lisina metabolicamente disponível dispensando-se qualquer cálculo indireto relativo a digestibilidade dietética ou perdas endógenas específicas para cada alimento.

A lisina é o único aminoácido essencial além da fenilalanina que é inicialmente oxidado no fígado e cujo carbono carboxílico deve ser perdido como  $\text{CO}_2$  (Ball e Bayley, 1984).

Se os valores de biodisponibilidade de lisina da ervilha crua forem diferentes dos valores de biodisponibilidade de lisina da ervilha tostada após a oxidação com aminoácido indicador e se o uso de lisina sintética for capaz de resgatar os valores de

biodisponibilidade quando adicionados à ervilha tostada, a técnica de oxidação de aminoácido indicador poderá ser considerada adequada para determinar a biodisponibilidade de aminoácidos em alimentos para suínos.

A ervilha apresenta alta digestibilidade ileal verdadeira de proteína bruta, podendo variar, sem tratamento, de 77,6% a 82,7%; lisina segue a regra, variando de 81,5% a 86,2% (Mariscal-Ladín et al., 2002). Todavia, a aplicação de calor (165 °C) diminui a digestibilidade ileal de ervilhas (van Barneveld et al., 1995).

Assim sendo, verifica-se a necessidade de se estudar a técnica de oxidação de aminoácido indicador para a determinação da biodisponibilidade de aminoácidos em alimentos para suínos.

## **METODOLOGIA**

Os procedimentos adotados no estudo foram aprovados pelo Comitê de Bem-Estar Animal da Faculdade de Agricultura, Alimentos e Ecologia Humana da Universidade de Alberta, em Edmonton, Alberta, Canadá.

Foi realizado um experimento para se determinar a biodisponibilidade de lisina em ervilha crua, ervilha tostada e ervilha tostada com adição de lisina sintética. Foi determinada a equação linear de biodisponibilidade de lisina com dietas contendo 50, 60, 70 e 80% das exigências de lisina conforme NRC (1998).

Foram utilizados quatro suínos machos castrados, cruzados Yorkshire/Landrace, com peso inicial médio de 20,0 kg, provenientes do plantel livre de patógenos específicos da Unidade de Suínos da Universidade de Alberta. Eles foram

mantidos aos pares, nos três primeiros dias. Após este período, os animais foram mantidos em baias individuais, onde permaneceram por todo o período experimental, exceto durante os períodos de oxidações, quando foram levados para gaiolas especiais. Os animais foram mantidos por uma hora durante quatro dias antecedentes ao período de oxidações para adaptação às gaiolas especiais.

O período experimental correspondeu a uma etapa inicial em que os animais foram mantidos por dez dias recebendo a dieta basal, e uma segunda etapa de períodos sucessivos de dois dias de adaptação a uma dieta-teste (Moehn et al., 2004) seguidos de quatro horas de oxidação para a primeira dieta-teste e de cinco horas de oxidação para as demais (a primeira hora de oxidação destas dietas se deu sem o emprego do radioisótopo, para a mensuração do resíduo de radioatividade dos animais – radioatividade residual advinda das oxidações anteriores). No caso específico das dietas experimentais contendo os alimentos teste (ervilha crua, ervilha tostada e ervilha tostada com adição de lisina sintética), foram realizados dois períodos de oxidação para cada dieta, em dois dias consecutivos.

Durante os primeiros sete dias a dieta basal foi fornecida *ad libitum*, sendo que nos últimos três dias foi restrita a 80% do consumo voluntário, com base no peso metabólico do animal, equivalendo-se a 90g por quilo de peso metabólico, dividida em duas refeições diárias. As dietas-teste foram fornecidas nesta base de restrição.

No intervalo entre as duas primeiras refeições, as gaiolas de oxidação foram calibradas para a estabilização do fluxo de gás carbônico. Na seqüência, seguiram-se quatro ou cinco horas de oxidações. A segunda metade da dieta diária foi fornecida às 20 horas.

TABELA 1 – Composição das dietas experimentais em g/Kg.

|                          | DIETAS COM NÍVEIS SUB-ÓTIMOS DE LISINA <sup>1</sup> |          |          |          | ERVILHA<br>CRUA | ERVILHA TOSTADA |          |
|--------------------------|---|----------|----------|----------|-----------------|-----------------|----------|
|                          | 50%   | 60%      | 70%      | 80%      |                 |                 | + LISINA |
| Cevada                   | 501,000   | 501,000  | 501,000  | 501,000  | 501,000         | 501,000         | 501,000  |
| Amido                    | 115,630   | 115,953  | 116,277  | 116,600  | 84,230          | 82,000          | 82,000   |
| Açúcar de<br>beterraba   | 116,000   | 116,167  | 116,333  | 116,500  | 85,000          | 83,320          | 83,320   |
| <i>Sulkaflor</i>         | 64,000  | 63,500   | 63,000   | 62,500   | 0,000           | 0,000           | 0,000    |
| Farelo de soja           | 99,000  | 99,000   | 99,000   | 99,000   | 99,000          | 99,000          | 99,000   |
| Ervilha moída            | 0,000   | 0,000    | 0,000    | 0,000    | 168,000         | 0,000           | 0,000    |
| Ervilha moída<br>tostada | 0,000   | 0,000    | 0,000    | 0,000    | 0,000           | 172,500         | 172,500  |
| Hys                      | 1,130   | 1,130    | 1,130    | 1,130    | 0,200           | 0,150           | 0,150    |
| Iso                      | 2,160   | 2,160    | 2,160    | 2,160    | 0,590           | 0,710           | 0,710    |
| Leu                      | 3,280   | 3,280    | 3,280    | 3,280    | 0,600           | 0,610           | 0,610    |
| Lys                      | 0,00  | 1,143    | 2,287    | 3,430    | 0,000           | 0,000           | 0,559    |
| Cie                      | 0,00  | 0,000    | 0,000    | 0,000    | 0,000           | 0,000           | 0,000    |
| Met                      | 3,050   | 3,050    | 3,050    | 3,050    | 2,170           | 2,180           | 2,180    |
| Phe                      | 2,010   | 2,010    | 2,010    | 2,010    | 0,430           | 0,420           | 0,420    |
| Tir                      | 1,790   | 1,790    | 1,790    | 1,790    | 0,700           | 0,700           | 0,700    |
| Thr                      | 3,640   | 3,640    | 3,640    | 3,640    | 2,260           | 2,190           | 2,190    |
| Trp                      | 0,710   | 0,710    | 0,710    | 0,710    | 0,370           | 0,360           | 0,360    |
| Val                      | 2,800   | 2,800    | 2,800    | 2,800    | 1,050           | 1,160           | 1,160    |
| Asp                      | 25,000  | 24,433   | 23,867   | 23,300   | 10,300          | 9,900           | 9,900    |
| Glu                      | 25,000  | 24,440   | 23,880   | 23,320   | 10,300          | 10,000          | 10,000   |
| Premix <sup>2</sup>      | 32,300  | 32,300   | 32,300   | 32,300   | 32,300          | 32,300          | 32,300   |
| NaCl                     | 1,500   | 1,500    | 1,500    | 1,500    | 1,500           | 1,500           | 1,500    |
| Soma                     | 1000,000  | 1000,000 | 1000,000 | 1000,000 | 1000,000        | 1000,000        | 1000,559 |

1. Os níveis de lisina apresentados referem-se ao percentual em relação às necessidades dos animais de acordo com NRC (1998).

2. Premix – formulado para atender às exigências dos animais em minerais e vitaminas.

TABELA 2 – Composição nutricional das dietas experimentais.

|                  | DIETAS COM NÍVEIS SUB-ÓTIMOS DE LISINA |        |        |        | ERVILHA<br>CRUA | ERVILHA TOSTADA |          |
|------------------|--|--------|--------|--------|-----------------|-----------------|----------|
|                  | 50%                                    | 60%    | 70%    | 80%    |                 |                 | + LISINA |
| ME KJ/kg         | 13,000                                 | 13,000 | 13,000 | 13,000 | 13,016          | 13,001          | 13,010   |
| PB %             | 15,825                                 | 15,822 | 15,819 | 15,816 | 15,817          | 15,821          | 15,870   |
| Arg, %           | 0,556                                  | 0,556  | 0,556  | 0,556  | 0,875           | 0,876           | 0,876    |
| Hys %            | 0,336                                  | 0,336  | 0,336  | 0,336  | 0,336           | 0,336           | 0,336    |
| Iso, %           | 0,588                                  | 0,588  | 0,588  | 0,588  | 0,587           | 0,588           | 0,588    |
| Leu, %           | 1,020                                  | 1,020  | 1,020  | 1,020  | 1,020           | 1,020           | 1,020    |
| Lys, %           | 0,445                                  | 0,534  | 0,623  | 0,712  | 0,712           | 0,712           | 0,768    |
| Met, %           | 0,449                                  | 0,449  | 0,449  | 0,449  | 0,395           | 0,393           | 0,393    |
| Cie, %           | 0,176                                  | 0,176  | 0,176  | 0,176  | 0,229           | 0,231           | 0,231    |
| Met + Cie, %     | 0,624                                  | 0,624  | 0,624  | 0,624  | 0,624           | 0,624           | 0,624    |
| Phe, %           | 0,669                                  | 0,669  | 0,669  | 0,669  | 0,693           | 0,693           | 0,693    |
| Tir, %           | 0,484                                  | 0,484  | 0,484  | 0,484  | 0,500           | 0,500           | 0,500    |
| Thr, %           | 0,708                                  | 0,708  | 0,708  | 0,708  | 0,708           | 0,708           | 0,708    |
| Trp, %           | 0,192                                  | 0,192  | 0,192  | 0,192  | 0,192           | 0,192           | 0,192    |
| Val, %           | 0,732                                  | 0,732  | 0,732  | 0,732  | 0,732           | 0,732           | 0,732    |
| Ac. linoléico, % | 0,509                                  | 0,509  | 0,509  | 0,509  | 0,588           | 0,590           | 0,590    |
| Ca %             | 0,756                                  | 0,756  | 0,756  | 0,756  | 0,775           | 0,775           | 0,775    |
| P%, disp.        | 0,344                                  | 0,344  | 0,344  | 0,344  | 0,364           | 0,364           | 0,364    |
| FDN              | 10,335                                 | 10,335 | 10,335 | 10,335 | 12,468          | 12,525          | 12,530   |
| FDA              | 4,037                                  | 4,037  | 4,037  | 4,037  | 5,246           | 5,279           | 5,280    |

As composições das dietas experimentais utilizadas podem ser visualizadas nas tabelas 1 e 2. A dieta basal foi formulada à base de cevada, amido, açúcar de beterraba e farelo de soja, suplementada com aminoácidos sintéticos, para atender às exigências dos animais em lisina, energia, minerais e vitaminas, e para exceder em 20% as exigências dos demais aminoácidos essenciais, conforme exigências contidas em NRC (1998). Os aminoácidos não essenciais asparagina e ácido glutâmico foram incorporados às dietas experimentais em quantidades variáveis a fim de mantê-las isonitrogenadas. Os aminoácidos das dietas-teste foram balanceados com base em aminoácidos totais.

Amostras de cevada, farelo de soja, ervilhas e ervilhas tostadas foram coletadas e enviadas para análise de aminoácidos no Laboratório de Análise de Aminoácidos da companhia Degussa Ag, em Hanau, Alemanha, antes do início da formulação das dietas. Após preparadas, as dietas foram amostradas e as amostras foram enviadas para análise de proteína bruta e aminoácidos no mesmo laboratório.

Foram utilizadas dietas-teste contendo níveis sub-ótimos de lisina (50, 60, 70 e 80% da exigência do animal, NRC 1998), obtidas por meio da suplementação de lisina sintética (L-lisina-HCL), considerando-se o aminoácido sintético como 100% disponível. Os alimentos ervilha crua, ervilha tostada e, ervilha tostada com lisina foram incorporados à dieta-teste com nível de lisina correspondente a 80% da exigência do animal, em substituição equivalente à lisina sintética. Posteriormente, foram feitos os ajustes necessários para manter-se o mesmo padrão da dieta em níveis de energia e proteína.

As ervilhas foram tostadas seguindo-se o protocolo estabelecido na Universidade de Alberta.

Antes da realização da oxidação, os suínos usados no teste receberam uma porção de 1/32 da quantidade de dieta a cada meia hora. Na primeira meia hora foi feita a calibração de ar nas gaiolas e após esse período iniciou-se a oxidação em duas etapas de mensuração de radioatividade residual de meia hora cada e em cada uma destas etapas os suínos receberam uma porção de 1/32 da quantidade de dieta sem radioisótopo. Na terceira porção da dieta, ou seja, uma hora após a calibragem do ar nas gaiolas, foram utilizados 6,5 ml de uma solução de L-[1-<sup>14</sup>C] fenilalanina [200 MBq (54 mCi)/mmol] a 3,5 µCi/ml (*primer*). A cada meia-hora seguinte, foram utilizadas doses constantes de radioisótopo, na proporção de 1,5 ml da mesma solução de L-[1-<sup>14</sup>C] fenilalanina [200 MBq (54 mCi)/mmol] a 3,5 µCi/ml, em oito rações por um período de

quatro horas. Após as oxidações, os comedouros foram lavados com água e solução de ácido clorídrico a 10% em água, para que qualquer comida não ingerida fosse coletada, amostrada, pipetada e analisada para conteúdo total de radioatividade.

As garrafas coletoras de gás ( $^{14}\text{CO}_2$ ) foram trocadas a intervalos de 30 minutos, ao longo de todo o estudo. A solução absorvente (uma parte de monoetanolamina, absorvente, e duas partes de 2-metoxietanol, solvente) foi pesada, amostrada e misturada com um coquetel de cintilação para contagem por cintilação. As amostras foram contadas por 15 minutos, com margem de erro de 2%, num contador por cintilação líquida. Foi construído um gráfico opondo o gás carbônico total coletado ao período de coleta.

Foi utilizado *Linear Response Plateau* para estimar o nível ótimo de oxidação de aminoácido quando o radioisótopo se estabiliza no metabolismo animal. Foi empregada regressão linear para estimar a taxa de oxidação de aminoácidos pelos animais quando da lisina 100% biodisponível aos níveis de 60, 70 e 80%. As biodisponibilidades dos alimentos teste foram encontradas por equivalência da taxa de oxidação obtida com a dieta do alimento teste com a reta obtida por regressão linear estabelecendo o padrão 100% biodisponível da lisina.

## **RESULTADOS**

Os *plateaux* de oxidação de fenilalanina, para lisina, para as oxidações das rações 50, 60, 70 e 80%, foram, respectivamente: 22,7%, 23,2%, 21,6% e 17,1%.

A representação gráfica da função linear do nível de lisina em função da taxa de oxidação pode ser visualizada na figura 1.

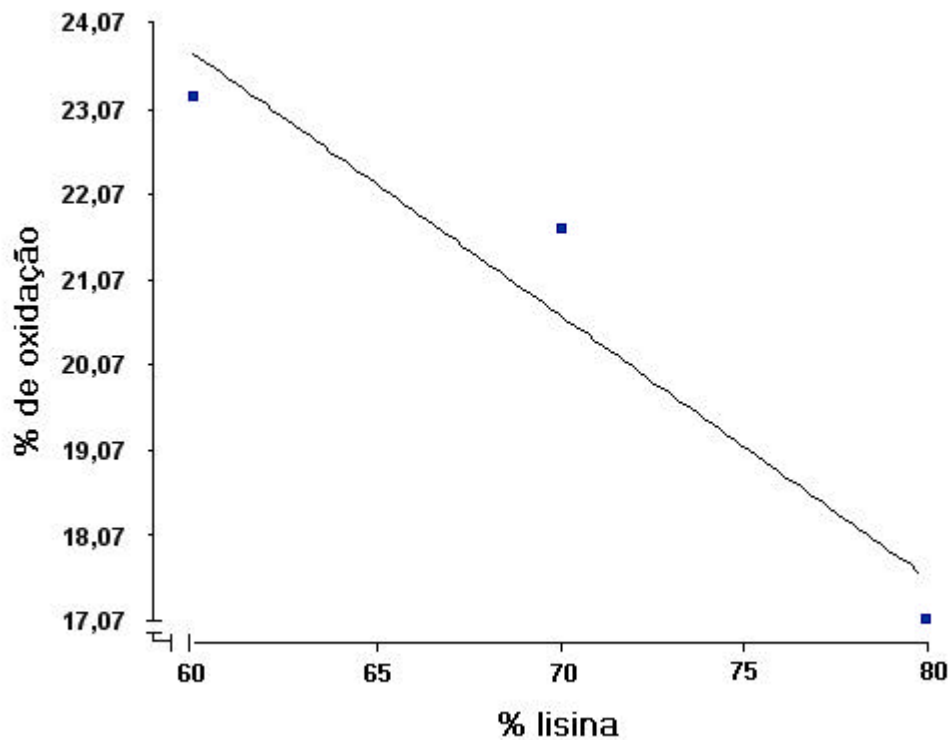


Figura 1.: Representação gráfica da função linear do nível de lisina em função da taxa de oxidação.

A equação de biodisponibilidade encontrada com base na função linear foi:  $y = 42,06167 - 0,30616x$ . O  $R^2$  foi de 92,6%.

A média dos valores encontrados por *Linear Response Plateau* para as oxidações de ervilha foi de 19,8%. Sua equação de biodisponibilidade foi:  $19,79 = 42,06167 - 0,30616x$ . Seu valor de biodisponibilidade foi 72,7%. A representação gráfica, *plateau* médio atingido pela oxidação da fenilalanina quando o radiossótopo se tornou estável no metabolismo dos animais alimentados com esta dieta, pode ser visualizada na figura 2.

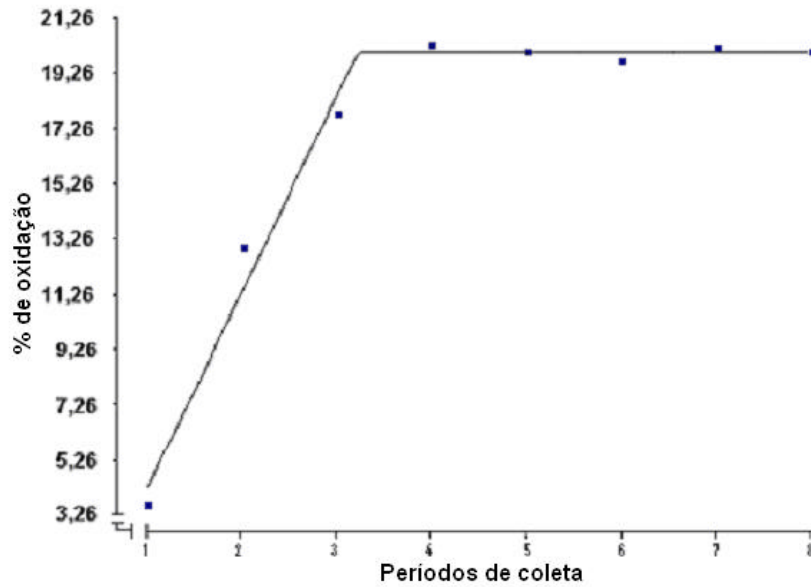


Figura 2.: Representação gráfica da oxidação em função do período obtida pela ervilha.

A média dos valores encontrados por *Linear Response Plateau* para as oxidações de ervilha tostada foi de 17,3%. Sua equação de biodisponibilidade foi:  $17,28 = 42,06167 - 0,30616x$ . Seu valor de biodisponibilidade foi 80,9%. A representação gráfica, *plateau* médio atingido pela oxidação da fenilalanina quando o radiossótoto se tornou estável no metabolismo dos animais alimentados com esta dieta, pode ser visualizada na figura 3:

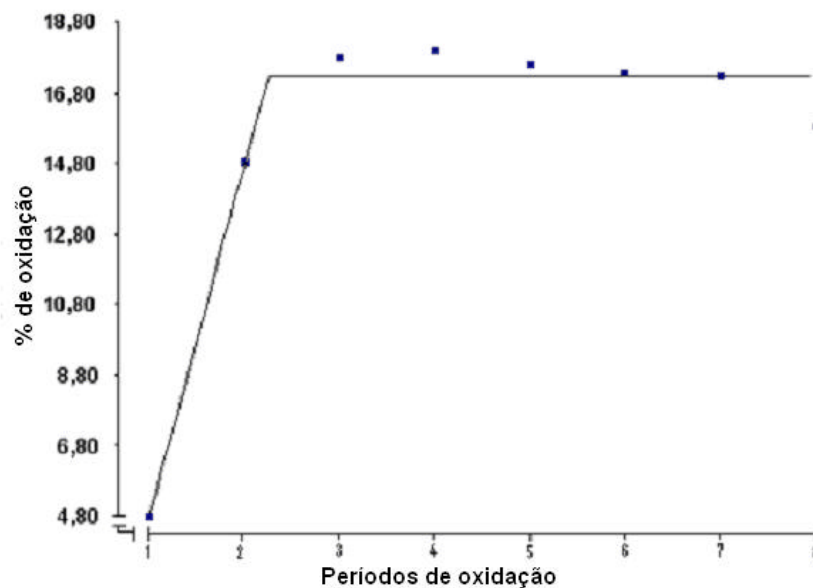


Figura 3.: Representação gráfica da oxidação em função do período obtida pela ervilha tostada.

A média dos valores encontrados por *Linear Response Plateau* para as oxidações de ervilha tostada com adição de lisina sintética foi de 20,7%. Sua equação de biodisponibilidade foi:  $20,66 = 42,06167 - 0,30616x$ . Seu valor de biodisponibilidade foi 69,9%. A representação gráfica, *plateau* médio atingido pela oxidação da fenilalanina quando o radiossótomo se tornou estável no metabolismo dos animais alimentados com esta dieta, pode ser visualizada na figura 4.

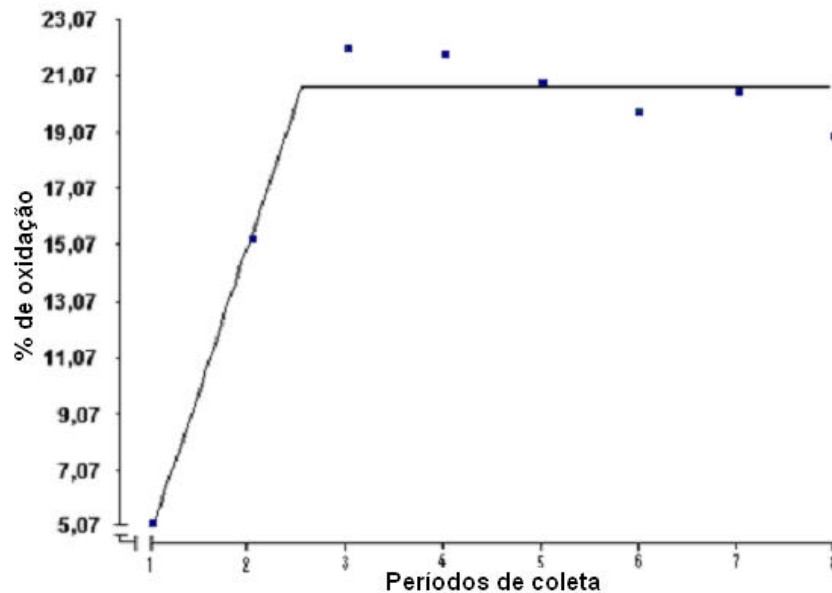


Figura 4.: Representação gráfica da oxidação em função do período obtida pela ervilha tostada com lisina sintética.

## DISCUSSÃO

Obteve-se média de oxidação de *plateaux* para dieta 50% lisina inferior à média de oxidação de *plateaux* da dieta 60% lisina. Isto pode ser indicativo de que

alguns animais não conseguiram oxidar quantidades excedentes dos aminoácidos fornecidos ao nível de 120% das exigências dos animais, tendo a lisina como o único aminoácido limitante. Por este motivo, neste experimento, para o cálculo da equação linear da biodisponibilidade padrão da lisina, o ponto de oxidação média dos *plateaux* das dietas 50% lisina foram excluídos.

O resultado da biodisponibilidade encontrada para ervilhas, 72,7% está abaixo do que se tem encontrado na literatura como digestibilidade ileal, sempre acima de 80% (van Barneveld et al, 1995; Castell et al., 1996; Canibe e Eggum, 1997; Grala et al., 1999; Mariscal-Landín et al., 2002).

O resultado obtido para ervilhas tostadas, 80,9%, pode ser considerado um valor aceitável, mesmo tendo sido o limite para biodisponibilidade, estabelecido no limite de 80%. A variação entre os valores foi atribuída ao fato de se ter trabalhado com quatro suínos, sendo oito oxidações para ervilhas tostadas e quatro oxidações para 80% lisina, o que pode ter proporcionado pequeno desvio no erro padrão. Tal resultado pode ser explicado devido à possibilidade de ter ocorrido destruição dos fatores anti-nutricionais da ervilha, o que pode ter tornado sua lisina mais disponível para o animal. É possível que a temperatura e o tempo para a tostagem da ervilha não tenham sido suficientes para desenvolver reação de Maillard. Canibe e Eggum (1997) demonstram uma melhoria na digestibilidade aparente da lisina de 0,2% após a tostagem da ervilha. Mariscal-Landín et al. (2002) verificaram ter ocorrido melhoria na digestibilidade ileal padrão de 81,5 para 91,4 na lisina de um mesmo cultivar de ervilha após extrusão. Van Barneveld et al (1995) observaram uma queda de 82% da digestibilidade ileal da lisina da ervilha crua para 64% quando aquecida a 150°C e para 35% quando aquecida a 165 °C.

Tem-se verificado na ervilha dois tipos de anti-tripsinas: Kunitz (STI), originalmente isolada de grãos de soja e que inibe principalmente a tripsina, e BBI (identificada por Bowman e Birk), que é comum em outros grãos de leguminosas e reduz a atividade tanto de tripsina quanto de quimiotripsina (Castell et al., 1996). Em variedades de ervilhas próprias do inverno, a Atividade Inibidora de Tripsina (TIA) é duas a quatro vezes maior que a TIA de variedades de ervilhas próprias da primavera, da mesma forma como ervilhas secas normalmente apresentam menos TIA do que ervilhas úmidas (Gatel, 1994).

Outros fatores anti-nutricionais das ervilhas, tais como inibidores da amilase, compostos fenólicos (taninos), ácido fítico, proteínas antigênicas e saponinas, têm sido citados (Gatel, 1994; Castell et al., 1996).

O resultado obtido para ervilhas tostadas com adição de lisina sintética foi 69,9%. Como o excesso de lisina sintética além dos níveis já constantes não pode interferir positivamente na oxidação da fenilalanina, não se pode atribuir o excedente de lisina sobre a fenilalanina pelo decréscimo denotado na biodisponibilidade da lisina nesta dieta; mas foi observado que o efeito de decréscimo percebido na biodisponibilidade da lisina na dieta foi devido ao acréscimo da própria lisina 100% biodisponível na dieta (o nível de inclusão de L-lisina-HCL nesta dieta foi de 0,0559 %, ou seja, 0,0391% de g/kg lisina 100% biodisponível).

Há que se considerar, também, que foram adicionadas quantidades extras de fenilalanina e tirosina às dietas contendo alimentos teste visando alcançar-se a mesma quantidade, em termos biodisponíveis, presente nas rações com lisina sintética. Segundo Moenh et al. (2004), o organismo de um suíno se adapta metabolicamente à alteração de um nível de um único aminoácido em menos de dois dias, desde que os demais permaneçam constantes. É provável que, em função destes acréscimos, fosse necessário

um período maior, superior a dois dias de adaptação dos animais, a cada uma das dietas teste, prévio às oxidações.

Uma importante observação sobre o cálculo das rações foi que a carência de dados sobre a biodisponibilidade de fenilalanina dos ingredientes testados não possibilitou o estabelecimento de uma correlação mais acurada entre fenilalanina biodisponível e lisina biodisponível.

Outra consideração a ser feita sobre a técnica executada é a de que, tendo sido o ponto da dieta 50% lisina eliminado, seira necessário utilizar outras dietas com níveis superiores aos da dieta 80% para melhor estabelecer a equação linear.

## **CONCLUSÃO**

A técnica de oxidação de aminoácido indicador (fenilalanina-<sup>14</sup>C), com a metodologia utilizada neste experimento, mostrou-se eficiente para se determinar a biodisponibilidade de lisina tanto para ervilha crua quanto para ervilha tostada; todavia, não se mostrou eficiente para se determinar a biodisponibilidade de lisina em ervilha tostada com a adição de lisina sintética.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Professor Ronald O. Ball, por ter possibilitado a realização desta pesquisa.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BALL, R. O.; BAYLEY, H. S. (1984) Tryptophan requirement of the 2,5-kg piglet determined by the oxidation of an indicator amino acid. *J. Nutr.* 114: 1741-1746.
2. BALL, R. O.; BAYLEY, H. S. (1985) The effect of diarrhea on the oxidation of <sup>14</sup>C-phenylalanine in piglets receiving diets varying in protein and proline concentration. *Can. J. Ve. Res.* 50: 393-396.
3. BALL, R. O.; MÖHN, S.; BERTOLO, R. F. P.; KORVER, D. (2002) Rapid new methods for measuring amino acid requirements and 'true' amino acid availability in feeds for swine and poultry. 23<sup>rd</sup> Western Nutrition Conference p. 151-161.
4. BATTERHAM, E. S. (1992) Availability and utilization of amino acids for growing pigs. *Nutrition Research Reviews* 5: 1-18.
5. CANIBE, N.; EGGUM, B. O. 1997 Digestibility of dried and toasted peas in pigs.  
2. Ileal and total tract digestibilities of amino acids, protein and other nutrients. *Animal Feed Science Technology* 64: 311-325.
6. CASTELL, A. G.; GUENTER, W.; IGBASAN, F. A. 1996 Nutritive value of peas for nonruminant diets. *Animal Feed Science Technology* 60: 209-227.
7. GATEL, F. (1994) Protein quality of legume seeds for non-ruminant animals: a literature review. *Animal Feed Science and Technology* 45: 317-348.

8. GRALA, W.; VERSTEGEN, M. W. A.; JANSMAN, A. J. M.; HUISMAN, J.; van LEEUWEEN, P. 1999 Apparent protein digestibility and recovery of endogenous nitrogen at the terminal ileum of pigs fed diets containing various soyabean products, peas or rapeseed hulls. *Animal Feed Science and Technology* 80: 231-245.
9. KIM, K.-I.; McMILLAN, I.; BAYLEY, H. S. (1983) Determination of amino acid requirements of young pigs using an indicator amino acid. *British Journal of Nutrition*, 50: 369-382.
10. LEIBHOLZ, J. (1992) The availability of lysine in diets for pigs: comparative methodology. *British Journal of Nutrition* 67: 401-410.
11. MARISCAL-LANDÍN, G.; LEBRETON, Y.; SÈVE, B. (2002) Apparent and standardised true ileal digestibility of protein and amino acids from faba bean, lupin and pea, provided as whole seeds, dehulled or extruded in pig diets. *Animal Feed Science and Technology* 97: 183-198.
12. NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC) (1998) Nutrient requirements of swine. Washington/DC: National Academic Press.

13. MOEHN, S. BERTOLO, R. F., PENCHARZ, P. B., BALL, R. O. 2004 Indicator amino acid oxidation responds rapidly to changes in lysine or protein intake in growing and adult pigs. *J. Nutr.*, 134(4): 836-841.
14. PRAWIRODIGDO, S.; BATTERHAM, E. S.; ANDERSEN, L. M.; DUNSHEA, F. R.; FARRELL, D. J. (1997) Nitrogen retention in pigs given diets containing cottonseed meal or soybean meal. *Animal Feed Science and Technology* 67: 205-211.
15. van BARNEVELD, R. J.; THE LATE, E. S.; BATTERHAM, E. S.; SKINGLE, D. C.; NORTON, B. W. (1995) The effect of heat on amino acid for growing pigs. 4. Nitrogen balance and urine, serum and plasma composition of growing pigs fed on raw or heat-treated field peas (*Pisum sativum*). *British Journal of Nutrition* 73: 259-273.
16. ZELLO, G. A.; PENCHARZ, P. B.; BALL, R. O. (1993) Dietary lysine requirement of young adult males determined by oxidation of L-[1-<sup>13</sup>C]phenylalanine. *The American Physiological Society* 0193-1849/93: E667-E685.

# **BIODISPONIBILIDADE DE LISINA EM ALIMENTOS PARA SUÍNOS VIA TÉCNICA DE OXIDAÇÃO DE AMINOÁCIDO INDICADOR**

## **INTRODUÇÃO**

Proteína ideal pode ser definida como o balanço de aminoácidos necessário para máximo crescimento (Firman e Boling, 1998). Para uso efetivo do conceito de proteína ideal em formulações de dietas para suínos, a proteína ideal deveria ser expressa baseada em aminoácidos disponíveis na dieta, ao invés de aminoácidos totais (Tuitoek et al., 1997).

A técnica de oxidação de aminoácido indicador para a determinação da disponibilidade de um aminoácido, em função da sua acurácia, pode ser a melhor para este fim..

A técnica de oxidação de aminoácido indicador parte da premissa de que aminoácidos absorvidos pelo trato digestivo que não são usados para síntese protéica e outras funções essenciais entram no *pool* comum de combustíveis para o tecido, quer para serem oxidados quer para serem estocados como combustíveis primariamente através da síntese de ácidos graxos (Kim et al., 1983).

Têm-se constatado diferenças significativas entre os valores encontrados para lisina para os diversos alimentos em função das diferentes técnicas empregadas. Por exemplo, para canola, tem-se encontrado o valor de 83,6% pela técnica de digestibilidade ileal padrão (Stein et al., 2001), e de 74,0% pela técnica de digestibilidade ileal aparente (Knabe et al., 1989). Assim verifica-se que as técnicas

atualmente empregadas podem não ser acuradas para a determinação de valores de aminoácidos digestíveis.

Se a técnica de oxidação de aminoácido indicador for adequada para se determinar a biodisponibilidade de aminoácidos em alimentos para suínos, será possível determinar com maior precisão os valores de lisina biodisponíveis da canola, do farelo de soja, da cevada e do farelo de algodão, dentre outros alimentos.

Assim sendo, verifica-se a necessidade de se determinar, pela técnica de oxidação de aminoácido indicador, a biodisponibilidade de lisina de canola, de farelo de soja, de cevada e de farelo de algodão.

## **METODOLOGIA**

Os procedimentos adotados no estudo foram aprovados pelo Comitê de Bem-Estar Animal da Faculdade de Agricultura, Alimentos e Ecologia Humana da Universidade de Alberta, em Edmonton, Alberta, Canadá.

Foi realizado um experimento para se determinar a biodisponibilidade de lisina em canola, farelo de soja, cevada e farelo de algodão. Foi determinada a equação linear de biodisponibilidade de lisina com dietas contendo 50, 60, 70 e 80% das exigências de lisina conforme NRC (1998).

Foram utilizados quatro suínos machos castrados, cruzados Yorkshire/Landrace, com peso inicial médio de 20 kg, provenientes do plantel livre de patógenos específicos da Unidade de Suínos da Universidade de Alberta. Eles foram mantidos aos pares, nos três primeiros dias. Após este período, os animais foram mantidos em baias individuais, onde permaneceram por todo o período experimental,

exceto durante os períodos de oxidações, quando foram levados para gaiolas especiais. Os animais foram mantidos por uma hora durante quatro dias antecedentes ao período de oxidações para adaptação às gaiolas especiais.

O período experimental correspondeu a uma etapa inicial em que os animais foram mantidos por dez dias recebendo a dieta basal, e uma segunda etapa de períodos sucessivos de dois dias de adaptação a uma dieta-teste (Moehn et al., 2004) seguidos de quatro horas de oxidação para a primeira dieta-teste e de cinco horas de oxidação para as demais (a primeira hora de oxidação destas dietas se deu sem o emprego do radioisótopo, para a mensuração do resíduo de radioatividade dos animais – radioatividade residual advinda das oxidações anteriores). No caso específico das dietas experimentais contendo os alimentos teste (canola, farelo de soja, cevada, farelo de algodão), foram realizados dois períodos de oxidação para cada dieta, em dois dias consecutivos.

Durante os primeiros sete dias a dieta basal foi fornecida *ad libitum*, sendo que nos últimos três dias foi restrita a 80% do consumo voluntário, com base no peso metabólico do animal, equivalendo-se a 90g por quilo de peso metabólico, dividida em duas refeições diárias. As dietas-teste foram fornecidas nesta base de restrição.

No intervalo entre as duas primeiras refeições, as gaiolas de oxidação foram calibradas para a estabilização do fluxo de gás carbônico. Na seqüência, seguiram-se quatro ou cinco horas de oxidações. A segunda metade da dieta diária foi fornecida às 20 horas.

As composições das dietas experimentais utilizadas podem ser visualizadas nas tabelas 1e 2. A dieta basal foi formulada à base de cevada, amido, açúcar de beterraba e farelo de soja, suplementada com aminoácidos sintéticos, para atender às exigências dos

TABELA 1 – Composição das dietas experimentais em g/Kg.

|                     | DIETAS COM NÍVEIS SUB-ÓTIMOS DE LISINA <sup>1</sup> |          |          |          | ALIMENTOS-TESTE |                |          |                   |
|---------------------|---|----------|----------|----------|-----------------|----------------|----------|-------------------|
|                     | 50%   | 60%      | 70%      | 80%      | Canola          | Farelo de Soja | Cevada   | Farelo de Algodão |
| Cevada              | 501,000   | 501,000  | 501,000  | 501,000  | 501,000         | 501,000        | 751,000  | 501,000           |
| Amido               | 122,125   | 122,003  | 121,882  | 121,760  | 102,570         | 116,575        | 30,295   | 120,787           |
| Açúcar              | 122,125   | 122,003  | 121,882  | 121,760  | 102,570         | 116,575        | 30,295   | 120,787           |
| <i>Sulkaflor</i>    | 62,900  | 62,667   | 62,433   | 62,200   | 0,000           | 12,400         |          | 0,000             |
| Óleo de canola      | 0,000   | 0,000    | 0,000    | 0,000    | 18,000          | 0,000          | 21,500   | 8,700             |
| Farelo de soja      | 93,000  | 93,000   | 93,000   | 93,000   | 93,000          | 199,000        | 93,000   | 93,000            |
| Canola              | 0,000   | 0,000    | 0,000    | 0,000    | 140,000         | 0,000          | 0,000    | 0,000             |
| Farelo de algodão   | 0,000   | 0,000    | 0,000    | 0,000    | 0,000           | 0,000          | 0,000    | 96,667            |
| Hys                 | 1,200   | 1,200    | 1,200    | 1,200    | 0,000           | 0,020          | 0,620    | 0,100             |
| Iso                 | 2,120   | 2,120    | 2,120    | 2,120    | 0,110           | 0,130          | 1,080    | 1,020             |
| Leu                 | 3,170   | 3,170    | 3,170    | 3,170    | 0,000           | 0,000          | 1,100    | 1,150             |
| Lys                 | 0,000   | 1,143    | 2,287    | 3,430    | 0,000           | 0,000          | 2,080    | 1,530             |
| Cie                 | 1,630   | 1,630    | 1,630    | 1,630    | 0,570           | 0,970          | 0,970    | 1,040             |
| Met                 | 1,290   | 1,290    | 1,290    | 1,290    | 0,330           | 0,680          | 0,810    | 0,740             |
| Phe                 | 2,010   | 2,010    | 2,010    | 2,010    | 0,240           | 0,010          | 0,860    | 0,530             |
| Tir                 | 1,790   | 1,790    | 1,790    | 1,790    | 0,490           | 0,270          | 1,130    | 0,950             |
| Thr                 | 3,540   | 3,540    | 3,540    | 3,540    | 1,370           | 1,780          | 2,500    | 2,400             |
| Trp                 | 0,640   | 0,640    | 0,640    | 0,640    | 0,000           | 0,030          | 0,270    | 0,190             |
| Val                 | 2,620   | 2,620    | 2,620    | 2,620    | 0,110           | 0,520          | 1,150    | 1,070             |
| Asn                 | 21,000  | 20,100   | 19,200   | 18,300   | 0,000           | 0,000          | 0,000    | 0,000             |
| Glu                 | 24,300  | 24,533   | 24,767   | 25,000   | 6,100           | 16,500         | 27,800   | 14,800            |
| Premix <sup>2</sup> | 32,400  | 32,400   | 32,400   | 32,400   | 32,400          | 32,400         | 32,400   | 32,400            |
| NaCl                | 1,140   | 1,140    | 1,140    | 1,140    | 1,140           | 1,140          | 1,140    | 1,140             |
| Soma                | 1000,000  | 1000,000 | 1000,000 | 1000,000 | 1000,000        | 1000,000       | 1000,000 | 1000,000          |

1. Os níveis de lisina apresentados referem-se ao percentual em relação às necessidades dos animais de acordo com NRC (1998).

2. Premix – formulado para atender às exigências dos animais em minerais e vitaminas.

TABELA 2 – Composição nutricional das dietas experimentais.

|                  | DIETAS COM NÍVEIS SUB-ÓTIMOS DE |        |        |        | ALIMENTOS-TESTE |                |        |                   |
|------------------|---------------------------------|--------|--------|--------|-----------------|----------------|--------|-------------------|
|                  | LISINA                          |        |        |        | Canola          | Farelo de Soja | Cevada | Farelo de Algodão |
|                  | 50%                             | 60%    | 70%    | 80%    |                 |                |        |                   |
| ME KJ/kg         | 13,000                          | 13,000 | 13,000 | 13,000 | 13,000          | 13,374         | 13,000 | 13,000            |
| PB %             | 15,819                          | 15,819 | 15,819 | 15,819 | 15,813          | 15,818         | 15,809 | 15,819            |
| Arg, %           | 0,583                           | 0,583  | 0,583  | 0,583  | 0,895           | 0,899          | 0,735  | 0,966             |
| Hys, %           | 0,336                           | 0,336  | 0,336  | 0,336  | 0,352           | 0,336          | 0,336  | 0,336             |
| Iso, %           | 0,588                           | 0,588  | 0,588  | 0,588  | 0,588           | 0,588          | 0,588  | 0,588             |
| Leu, %           | 1,020                           | 1,020  | 1,020  | 1,020  | 1,072           | 1,044          | 1,020  | 1,020             |
| Lys, %           | 0,445                           | 0,534  | 0,623  | 0,712  | 0,712           | 0,712          | 0,712  | 0,712             |
| Met, %           | 0,276                           | 0,276  | 0,276  | 0,276  | 0,276           | 0,276          | 0,276  | 0,276             |
| Cie, %           | 0,348                           | 0,348  | 0,348  | 0,348  | 0,348           | 0,348          | 0,348  | 0,348             |
| Met + Cie,%      | 0,624                           | 0,624  | 0,624  | 0,624  | 0,624           | 0,624          | 0,624  | 0,624             |
| Phe, %           | 0,657                           | 0,657  | 0,657  | 0,657  | 0,696           | 0,683          | 0,673  | 0,692             |
| Tir, %           | 0,474                           | 0,474  | 0,474  | 0,474  | 0,508           | 0,491          | 0,484  | 0,498             |
| Thr, %           | 0,708                           | 0,708  | 0,708  | 0,708  | 0,708           | 0,708          | 0,708  | 0,708             |
| Trp, %           | 0,192                           | 0,192  | 0,192  | 0,192  | 0,198           | 0,192          | 0,192  | 0,192             |
| Val, %           | 0,732                           | 0,732  | 0,732  | 0,732  | 0,732           | 0,73           | 0,732  | 0,732             |
| Ac. Linoléico, % | 0,505                           | 0,505  | 0,505  | 0,505  | 0,929           | 0,830          | 1,161  | 0,731             |
| Ca %             | 0,756                           | 0,756  | 0,756  | 0,756  | 0,845           | 0,790          | 0,771  | 0,775             |
| P%, disp.        | 0,344                           | 0,344  | 0,344  | 0,344  | 0,3732          | 0,365          | 0,370  | 0,345             |
| FDN              | 10,255                          | 10,255 | 10,255 | 10,255 | 13,223          | 11,665         | 14,755 | 13,000            |
| FDA              | 3,980                           | 3,980  | 3,980  | 3,980  | 6,388           | 4,977          | 5,530  | 5,856             |

animais em lisina, energia, minerais e vitaminas, e para exceder em 20% as exigências dos demais aminoácidos essenciais, conforme exigências contidas em NRC (1998). Os aminoácidos não essenciais asparagina e ácido glutâmico foram incorporados às dietas experimentais em quantidades variáveis a fim de mantê-las isonitrogenadas. Os aminoácidos das dietas-teste foram balanceados com base em aminoácidos totais.

Amostras de cevada, farelo de soja, canola e farelo de algodão foram coletadas e enviadas para análise de aminoácidos no Laboratório de Análise de Aminoácidos da

companhia Degussa Ag, em Hanau, Alemanha, antes do início da formulação das dietas. Após preparadas, as dietas foram amostradas e as amostras foram enviadas para análise de proteína bruta e aminoácidos no mesmo laboratório.

Foram utilizadas dietas-teste contendo níveis sub-ótimos de lisina (50, 60, 70 e 80% da exigência do animal, NRC 1998), obtidas por meio da suplementação de lisina sintética (L-lisina-HCL), considerando-se o aminoácido sintético como 100% disponível. Os alimentos canola, cevada, farelo de algodão e farelo de soja foram incorporados à dieta-teste com nível de lisina correspondente a 80% da exigência do animal, em substituição equivalente à lisina sintética. Posteriormente, foram feitos os ajustes necessários para manter-se o mesmo padrão da dieta em níveis de energia e proteína.

Antes da realização da oxidação, os suínos usados no teste receberam uma porção de 1/32 da quantidade de dieta a cada meia hora. Na primeira meia hora foi feita a calibração de ar nas gaiolas e após esse período iniciou-se a oxidação em duas etapas de mensuração de radioatividade residual de meia hora cada e em cada uma destas etapas os suínos receberão uma porção de 1/32 da quantidade de dieta sem radioisótopo. Na terceira porção da dieta, ou seja, uma hora após a calibragem do ar nas gaiolas, foram utilizados 6,5 ml de uma solução de L-[1-<sup>14</sup>C] fenilalanina [200 MBq (54 mCi)/mmol] a 3,5 µCi/ml (*primer*). A cada meia hora seguinte, foram utilizadas doses constantes de radioisótopo, na proporção de 1,5 ml da mesma solução de L-[1-<sup>14</sup>C] fenilalanina [200 MBq (54 mCi)/mmol] a 3,5 µCi/ml, em oito rações por um período de quatro horas. Após as oxidações, os comedouros foram lavados com água e solução de ácido clorídrico a 10% em água, para que qualquer comida não ingerida fosse coletada, amostrada, pipetada e analisada para conteúdo total de radioatividade.

As garrafas coletoras de gás ( $^{14}\text{CO}_2$ ) foram trocadas a intervalos de 30 minutos, ao longo de todo o estudo. A solução absorvente (uma parte de monoetanolamina, absorvente, e duas partes de 2-metoxietanol, solvente) foi pesada, amostrada e misturada com um coquetel de cintilação para contagem por cintilação. As amostras foram contadas por 15 minutos, com margem de erro de 2%, num contador por cintilação líquida. Foi construído um gráfico opondo o gás carbônico total coletado ao período de coleta.

Foi utilizado *Linear Response Plateau* para estimar o nível ótimo de oxidação de aminoácido quando o radioisótopo se estabiliza no metabolismo animal. Foi empregada regressão linear para estimar a taxa de oxidação de aminoácidos pelos animais quando da lisina 100% biodisponível aos níveis de 50, 60, 70 e 80%. As biodisponibilidades dos alimentos teste foram encontradas por equivalência da taxa de oxidação obtida com a dieta do alimento teste com a reta obtida por regressão linear estabelecendo o padrão 100% biodisponível da lisina.

## **RESULTADOS**

Os *plateaux* de oxidação de fenilalanina, para lisina, para as oxidações das rações 50, 60, 70 e 80%, foram, respectivamente: 24,1%, 23,2%, 21,1% e 15,9%.

A representação gráfica da função linear dos níveis de lisina em função da taxa de oxidação pode ser visualizada na figura 1.

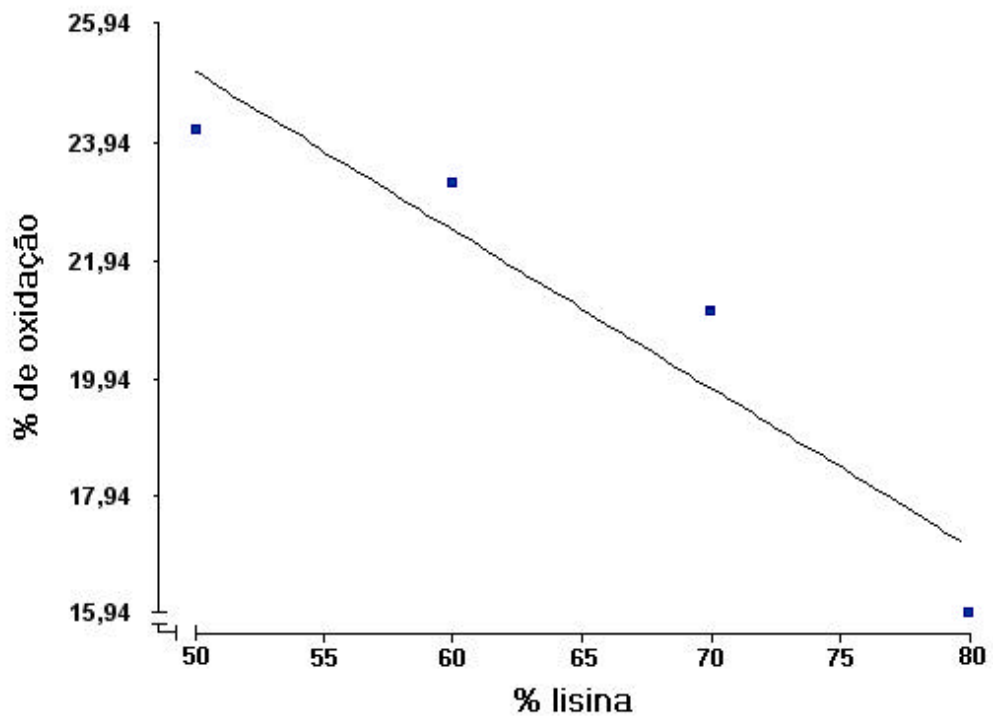


Figura 1: Representação gráfica da função linear dos níveis de lisina em função da taxa de oxidação.

A equação de biodisponibilidade encontrada com base na função linear foi:  $y = 38,4764 - 0,267391x$ . Apresentou  $R^2 = 88,6\%$ .

A média dos valores encontrados por *Linear Response Plateau* para as oxidações de canola foi de 21,0%. Sua equação de biodisponibilidade foi:  $20,98 = 38,4764 - 0,267391x$ . Seu valor de biodisponibilidade foi 65,4%. A representação gráfica, *plateau* médio atingido pela oxidação da fenilalanina quando o radiossótópo se tornou estável no metabolismo dos animais alimentados com esta dieta, pode ser visualizada na figura 2.

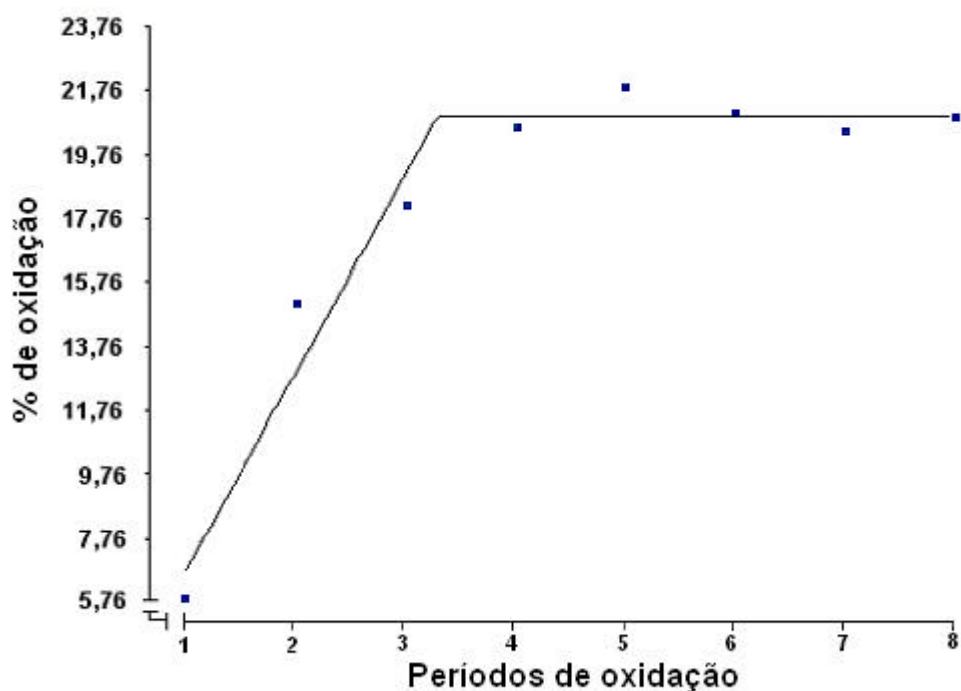


Figura 2: Representação gráfica da oxidação em função do período obtida pela canola.

A média dos valores encontrados por *Linear Response Plateau* para as oxidações de cevada foi de 19,9%. Sua equação de biodisponibilidade foi:  $19,87 = 38,4764 - 0,267391x$ . Seu valor de biodisponibilidade foi 69,6%. A representação gráfica, *plateau* médio atingido pela oxidação da fenilalanina quando o radiossótoto se tornou estável no metabolismo dos animais alimentados com esta dieta, pode ser visualizada na figura 3.

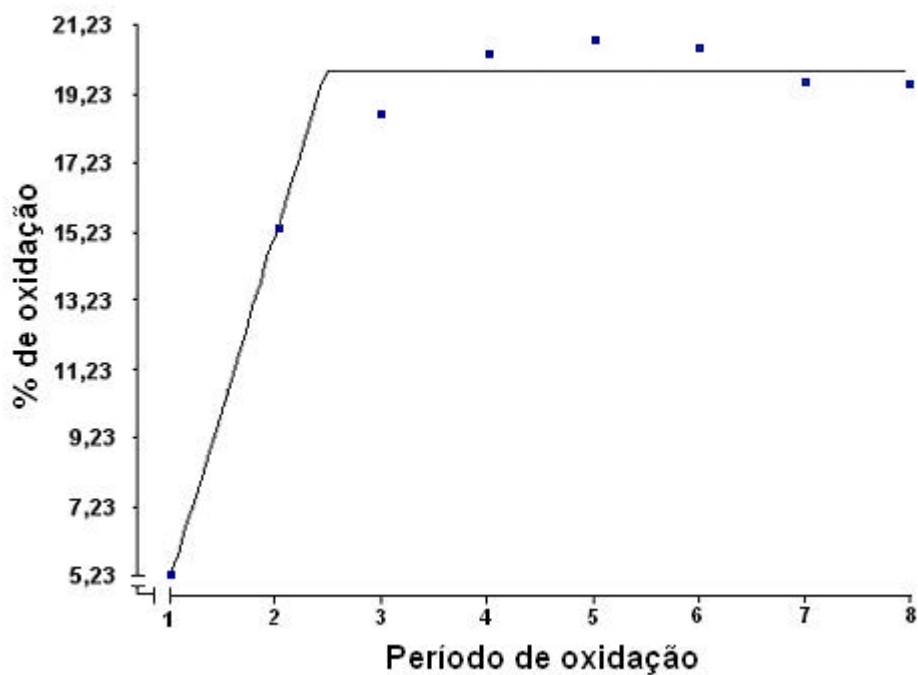


Figura 3: Representação gráfica da oxidação em função do período obtida pela cevada.

A média dos valores encontrados por *Linear Response Plateau* para as oxidações de farelo de algodão foi de 20,7%. Sua equação de biodisponibilidade foi:  $20,71 = 38,4764 - 0,267391x$ . Seu valor de biodisponibilidade foi 66,4%. A representação gráfica, *plateau* médio atingido pela oxidação da fenilalanina quando o radioisótopo se tornou estável no metabolismo dos animais alimentados com esta dieta, pode ser visualizada na figura 4.

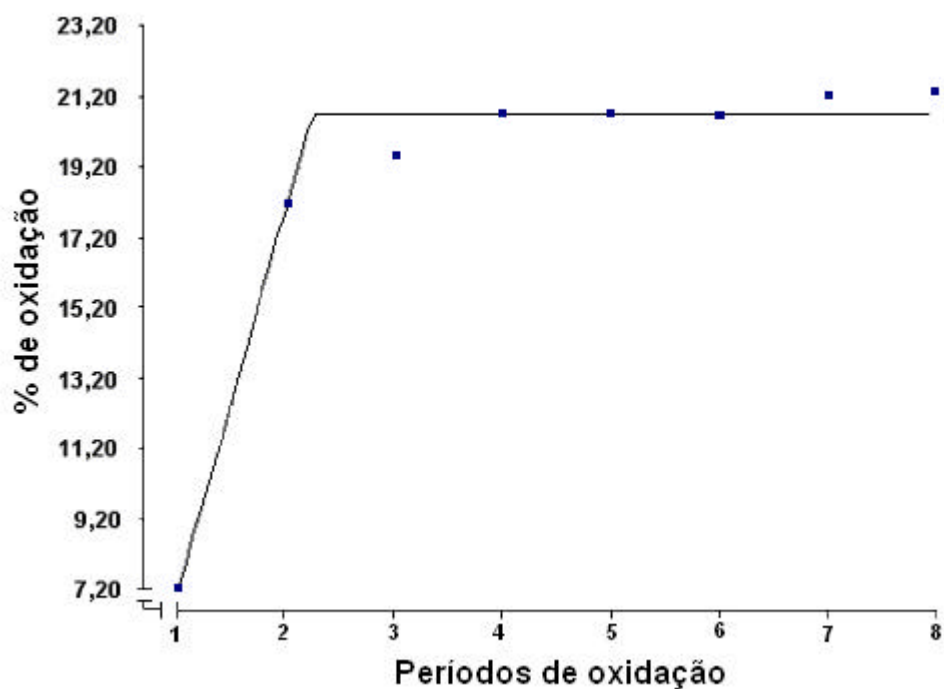


Figura 4: Representação gráfica da oxidação em função do período obtida pela farelo de algodão.

A média dos valores encontrados por *Linear Response Plateau* para as oxidações de farelo de soja foi de 18,5%. Sua equação de biodisponibilidade foi:  $18,48 = 38,4764 - 0,267391x$ . Seu valor de biodisponibilidade foi 74,8%. A representação gráfica, *plateau* médio atingido pela oxidação da fenilalanina quando o radioisótopo se tornou estável no metabolismo dos animais alimentados com esta dieta, pode ser visualizada na figura 5.

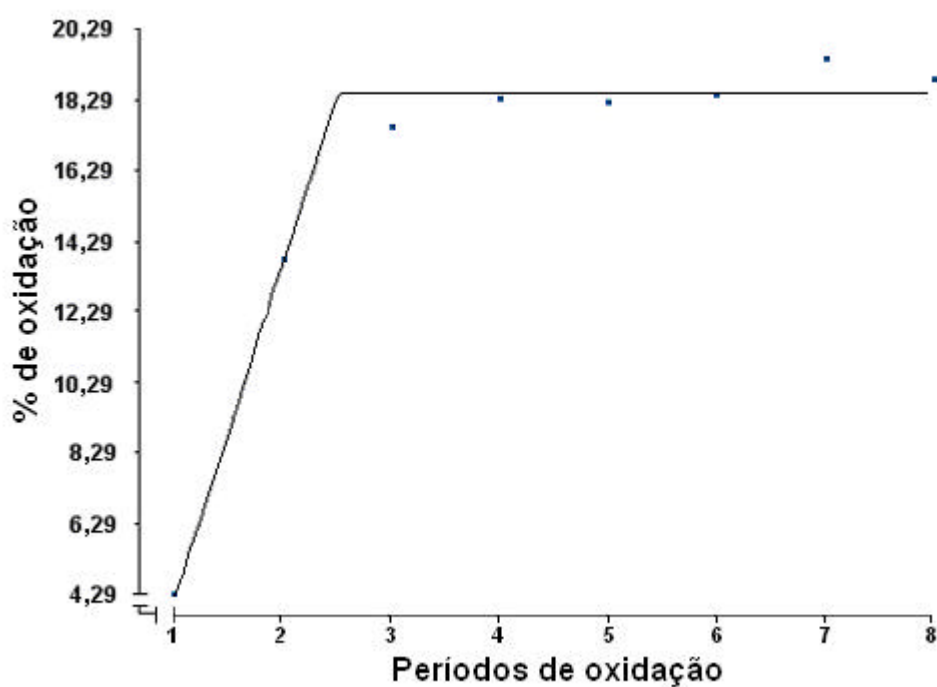


Figura 5: Representação gráfica da oxidação em função do período obtida pela farelo de soja.

## DISCUSSÃO

O resultado de 65,4%, obtido para canola, foi inferior à média de  $74,0\% \pm 1,9$  encontrada por digestibilidade ileal aparente por Knabe et al. (1989), bem como ao valor de  $83,6 \pm 1,8$ , encontrado por Stein et al. (2001), por digestibilidade ileal padrão  $([\text{digestibilidade aparente} + (\text{perdas endógenas}/\text{ingestão})] \times 100)$ .

O resultado de 69,6%, obtido para cevada, foi inferior ao encontrado por Yin et al. (1993), que encontraram 74% por digestibilidade ileal aparente, bem como por Stein et al. (2001), que observaram  $83,4 \pm 2,0$ , por digestibilidade ileal padrão.

O resultado obtido de 66,4%, para farelo de algodão, foi superior à média de  $42,0\% \pm 2,6$  encontrada por Knabe et al. (1989) por digestibilidade ileal aparente, bem

como ao valor de 57,0% encontrado por Yin et al. (1993) pela mesma técnica. Knabe et al. (1989) justificaram que o baixo valor encontrado provavelmente se deveu aos efeitos do gossipol presente. Batterham et al. (1990) encontraram valores de  $74,0\% \pm 0,22$  por digestibilidade ileal aparente.

É possível que a lisina sintética 100% disponível adicionada às dietas teste com farelo de algodão e cevada tenha contribuído para a alteração dos valores de biodisponibilidade destes alimentos. Efeito deletério da adição de lisina sintética na ervilha tostada foi observada conforme consta no Capítulo 1 desta Tese.

O resultado de 74,8%, obtido para farelo de soja, foi inferior ao valor de  $91,4\% \pm 1,8$  obtido por Stein et al. (2001), por digestibilidade ileal padrão e também foi inferior à média de  $84,0\% \pm 1,2$  encontrada por digestibilidade ileal aparente por Knabe et al. (1989) e aos valores de  $89\% \pm 0,22$  obtidos por Batterham et al. (1990), de 86,0% obtidos por Yin et al. (1993), e de  $82,1\% \pm 0,99$  obtidos por Grala et al. (1999), pela mesma técnica.

Há que se considerar, também, que foram adicionadas quantidades extras de fenilalanina e tirosina às dietas contendo alimentos teste visando alcançar-se a mesma quantidade, em termos biodisponíveis, presente nas rações com lisina sintética. Segundo Moenh et al. (2004), o organismo de um suíno se adapta metabolicamente à alteração de um nível de um único aminoácido em menos de dois dias, desde que os demais permaneçam constantes. É provável que, em função destes acréscimos, fosse necessário um período maior, superior a dois dias de adaptação dos animais, a cada uma das dietas teste, prévio às oxidações.

Uma importante observação sobre o cálculo das rações foi que a carência de dados sobre a biodisponibilidade de fenilalanina dos ingredientes testados não

possibilitou o estabelecimento de uma correlação mais acurada entre fenilalanina biodisponível e lisina biodisponível.

Outra consideração a ser feita sobre a técnica executada é a de que seira necessário utilizar outras dietas com níveis superiores aos da dieta 80% para melhor estabelecer a equação linear.

## **CONCLUSÃO**

Os valores de biodisponibilidade de lisina determinados pela técnica de oxidação de aminoácido indicador de canola, de cevada, de farelo de algodão e de soja foram, respectivamente, 65,4%, 69,6%, 66,4% e 74,8%.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Professor Ronald O. Ball, por ter possibilitado a realização desta pesquisa.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. BATTERHAM, E. S.; ANDERSEN, S. M.; BAIGENT, S. R.; BEECH, S. A.; ELLIOTT, R. 1990 Utilization of ileal digestible amino acids by pigs: lysine. British Journal of Nutrition 64: 679-690.

2. FIRMAN J. D.; BOLING, S. D. (1998) Lysine: Ideal protein in turkeys. *Poult Sci.* 77 (1): 105-110.
3. GRALA, W.; VERSTEGEN, M. W. A.; JANSMAN, A. J. M.; HUISMAN, J.; van LEEUWEEN, P. 1999 Apparent protein digestibility and recovery of endogenous nitrogen at the terminal ileum of pigs fed diets containing various soyabean products, peas or rapeseed hulls. *Animal Feed Science and Technology* 80: 231-245.
4. KIM, K.-I.; McMILLAN, I.; BAYLEY, H. S. (1983a) Determination of amino acid requirements of young pigs using an indicator amino acid. *British Journal of Nutrition* 50: 369-382.
5. KNABE, D. A.; LaRUE, D. C.; GREGG, E. J.; MARTINEZ, G. M.; TANKSLEY Jr., T. D. 1989 Apparent digestibility of nitrogen and amino acids in protein feedstuffs by growing pigs. *J. Anim. Sci.* 67: 441-458.
6. NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC) (1998) Nutrient requirements of swine. Washington/DC: National Academic Press.
7. STEIN, H. H.; KIM, S. W.; NIELSEN, T. T.; EASTER, R. A. 2001 Standardized ileal protein and amino acid digestibility by growing pigs and sows. *J. Anim. Sci.* 79: 2113-2122.

8. TUITOEK, K.; YOUNG, L. G.; de LANGE X. F. M; KERR, B. J. (1997) The effect of reducing excess dietary amino acids on growing-finishing pig performance: an evaluation of the ideal protein concept. *J. Anim. Sci.* 75: 1575-1583.
9. YIN, Y. -L; HUANG, R. -L.; ZHANG, H. -Y; CHEN, C. -M; .I, T. -J; PAN, Y, - F. 1993 Nutritive value of feedstuffs and diets for pigs: I. Chemical composition, apparent ileal and faecal digestibilities. *Animal Feed Science and Technology* 44: 1-27.
10. BATTERHAM, E. S.; ANDERSEN, S. M.; BAIGENT, S. R.; BEECH, S. A.; ELLIOTT, R. 1990 Utilization of ileal digestible amino acids by pigs: lysine. *British Journal of Nutrition* 64: 679-690.
11. FIRMAN J. D.; BOLING, S. D. (1998) Lysine: Ideal protein in turkeys. *Pout Sci.* 77 (1): 105-110.
12. GRALA, W.; VERSTEGEN, M. W. A.; JANSMAN, A. J. M.; HUISMAN, J.; van LEEUWEEN, P. 1999 Apparent protein digestibility and recovery of endogenous nitrogen at the terminal ileum of pigs fed diets containing various soyabean products, peas or rapeseed hulls. *Animal Feed Science and Technology* 80: 231-245.

13. KIM, K.-I.; McMILLAN , I.; BAYLEY, H. S. (1983) Determination of amino acid requirements of young pigs using an indicator amino acid. *British Journal of Nutrition* 50: 369-382.
14. KNABE, D. A.; LaRUE, D. C.; GREGG, E. J.; MARTINEZ, G. M.; TANKSLEY Jr., T. D. 1989 Apparent digestibility of nitrogen and amino acids in protein feedstuffs by growing pigs. *J. Anim. Sci.* 67: 441-458.
15. NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC) (1998) Nutrient requirements of swine. Washington/DC: National Academic Press.
16. STEIN, H. H.; KIM, S. W.; NIELSEN, T. T.; EASTER, R. A. 2001 Standardized ileal protein and amino acid digestibility by growing pigs and sows. *J. Anim. Sci.* 79: 2113-2122.
17. TUITOEK, K.; YOUNG, L. G.; de LANGE X. F. M; KERR, B. J. (1997) The effect of reducing excess dietary amino acids on growing-finishing pig performance: an evaluation of the ideal protein concept. *J. Anim. Sci.* 75: 1575-1583.
18. YIN, Y. -L; HUANG, R. -L.; ZHANG, H. -Y; CHEN, C. -M; .I, T. -J; PAN, Y, - F. 1993 Nutritive value of feedstuffs and diets for pigs: I. Chemical composition, apparent ileal and faecal digestibilities. *Animal Feed Science and Technology* 44: 1-27.

## CONCLUSÕES GERAIS

1. A técnica de oxidação de aminoácido indicador (fenilalanina-<sup>14</sup>C), com a metodologia utilizada neste experimento, mostrou-se eficiente para se determinar a biodisponibilidade de lisina tanto para ervilha crua quanto para ervilha tostada; todavia, não se mostrou eficiente para se determinar a biodisponibilidade de lisina em ervilha tostada com a adição de lisina sintética.
2. Os valores de biodisponibilidade de lisina determinados pela técnica de oxidação de aminoácido indicador de canola, de cevada, de farelo de algodão e de soja foram, respectivamente, 65,4%, 69,6%, 66,4% e 74,8%.