

FERNANDO IVÁN LONDOÑO HERNÁNDEZ

AVALIAÇÃO DA DEGRADABILIDADE RUMINAL E DA DIGESTIBILIDADE
INTESTINAL DA PROTEÍNA DE ALIMENTOS ATRAVÉS DE TÉCNICAS *in vitro*

Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do programa de Pós-
Graduação em Zootenia, para
obtenção do título de "*Doctor
Scientiae*".

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
MARÇO -2001

FERNANDO IVÁN LONDOÑO HERNÁNDEZ

AVALIAÇÃO DA DEGRADABILIDADE RUMINAL E DA DIGESTIBILIDADE
INTESTINAL DA PROTEÍNA DE ALIMENTOS ATRAVÉS DE TÉCNICAS *in vitro*

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Zootenia, para obtenção do título de "*Doctor Scientiae*".

APROVADA: 21 de março de 2001

Prof. Antonio Bento Mancio
(Conselheiro)

Prof. Rogério de Paula Lana
(Conselheiro)

Prof. Mario Fonseca Paulino

Prof. Paulo Roberto Cecon

Prof. Sebastião de Campos Valadares Filho
(Orientador)

*Quando o caminho tiver pedras, retire-as,
se estiver obscuro, procure a luz,
se tiver obstáculos, sobreponha-os
mas, não deixe de lutar, não desista,
lute pelo seu sonho, acredite, você conseguirá
e ao final Deus proverá*

Fernando I. L. Hernández (Fercho)

À Deus pela sua bondade e misericórdia.

Aos meus Pais *In Memoriam* (Efigênia e Manuel).

À minha esposa, Marlize Hernández, pelo seu apoio, estímulo,
compreensão e carinho.

AGRADECIMENTO

Ao Departamento de Zootecnia (DZO) do Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal de Viçosa (UFV) pela oportunidade concedida para realização deste curso.

À CAPES, pela bolsa de estudo.

Ao professor Sebastião de Campos Valadares Filho, pela orientação segura e pelo apoio incansável.

Aos professores Rogério de Paula Lana, Antonio Bento Mancio, Mario Fonseca Paulino e Paulo Roberto Cecon pelas inúmeras sugestões valiosas.

Ao professor Augusto César de Queiroz, pela amizade e pelo apoio.

Aos colegas Flor Divina Mikami e José Humberto Vilar (Doutorandos do DZO) pelos incansáveis dias e noites de estudos, Jaime Cobucci (Doutorando do DZO), Leonardo (Doutorando da Bioquímica), Alberto e Bevaldo (Doutorandos do DZO), pela amizade.

Aos amigos Karla, Sandro, Carlos (Nicarágua), Gilson e Camila, pelo apoio na realização das análises laboratoriais.

Aos funcionários do Departamento de Zootecnia, Valdir, Monteiro, Fernando, Sérgio, Vera e Wellington pelo apoio na realização das análises laboratoriais.

À todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

FERNANDO IVÁN LONDOÑO HERNÁNDEZ, Engenheiro Zootecnista, MSc. em Zootecnia pela Universidade Patrício Lumumba, Moscou, em 1983, realizou também estudos de Mestrado na Universidade Federal de Santa Maria, RS (1993-1995). Em julho de 1997, iniciou o Curso de Doutorado em Zootecnia, pela UFV, concentrando estudos na área de Nutrição de Ruminantes, e em 21 de março de 2001, defendeu a presente tese.

Foi responsável pela Nutrição Animal na empresa genética leiteira "Chiltepe" de 1986 a 1989 (Nicarágua). Responsável técnico na empresa de bovinos de corte Roberto Alvarado de 1985 a 1986. Foi professor em Instalações e Equipamentos Agrícolas de 1983 a 1985 na Universidade Nacional Agrária (Nicarágua) e de 1990 a 1993 foi professor em Nutrição Animal na mesma universidade, sendo responsável pelo coletivo de Nutrição Animal e pelo Laboratório de Análises Bromatológicas.

Autor do livro Fundamentos de Alimentação Animal, 1993, texto básico (Espanhol), 182p, publicado pela Universidade Nacional Agrária e do livro Suplementação Mineral para Gado de Corte, Novas Estratégias (Português), 2001, 164p, publicado pela editora Aprenda Fácil.

CONTEÚDO

	Página
RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
INTRODUÇÃO	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	6
Determinação da Cinética Ruminal da Proteína de Vários Alimentos	
Utilizando o Método de Inibidores In Vitro (IIV) e o Sistema Kjeldahl ----	8
Resumo	8
Abstract	9
Introdução	10
Material e Métodos	11
Resultados e Discussão	15
Conclusões	24
Referências Bibliográficas	25
Determinação da Cinética Ruminal da Proteína de Vários Alimentos	
Utilizando o Método de Produção de Gás	28
Resumo	28
Abstract	29
Introdução	30
Material e Métodos	32

Resultados e Discussão -----	38
Conclusões -----	46
Referências Bibliográficas -----	47
Avaliação de Dois Métodos <i>in vitro</i> para Determinar a Cinética Ruminal e a Digestibilidade Intestinal da Proteína de Vários Alimentos -----	50
Resumo -----	50
Abstract -----	51
Introdução -----	52
Material e Métodos -----	53
Resultados e Discussão -----	59
Conclusões -----	72
Referências Bibliográficas -----	72
RESUMO E CONCLUSÕES -----	76
APÊNDICE -----	79

RESUMO

LONDOÑO HERNÁNDEZ, FERNANDO IVÁN, D.S. Universidade Federal de Viçosa, março de 2001. **Avaliação da degradabilidade ruminal e da digestibilidade intestinal da proteína de alimentos através de técnicas *in vitro***. Professor Orientador: Sebastião de Campos Valadares Filho. Professores Conselheiros: Antonio Bento Mancio e Rogério de Paula Lana

A presente tese foi conduzida com os objetivos de estimar os parâmetros cinéticos da degradação da proteína de vários alimentos utilizando o método dos inibidores; avaliar os parâmetros cinéticos da degradação da proteína por meio da técnica de produção de gás e determinar a degradabilidade ruminal e a digestibilidade intestinal da proteína de vários alimentos utilizando duas técnicas *in vitro*. Para isso, foram desenvolvidos três experimentos. No primeiro, foram estimadas as taxas de degradação dos compostos nitrogenados de 24 alimentos concentrados e 14 volumosos, utilizando o método de inibidores *in vitro*. As estimativas das taxas de degradação mostraram que os alimentos promil, caseína, grão de amendoim moído, cama de frango contendo casca de café e a raspa de mandioca possuem proteínas de rápida degradação,

sendo as mais lentas degradações observadas para o fubá de milho, a farinha de carne, a cama de frango contendo capim-elefante, a levedura de cana de açúcar e a farinha de penas. Concluiu-se que o método foi eficiente na avaliação da cinética ruminal da proteína dos alimentos concentrados e que as taxas de degradação de alguns alimentos volumosos foram subestimadas. No segundo experimento, realizaram-se determinações químicas e estudos sobre a cinética ruminal dos compostos nitrogenados de 24 alimentos concentrados e 10 volumosos, utilizando as medições das concentrações de nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético e a produção de gás. As estimativas de degradação, nos tempos 6 e 12 horas, mostraram que: promil, caseína, grão de amendoim moído, raspa de mandioca, silagem de sorgo com e sem inóculo, silagem de milho e o capim-gordura apresentaram proteínas de rápida degradação. A mais lenta degradação foi observada para os alimentos levedura de cana de açúcar, farinha de penas, farinha de peixe, cama de frango contendo cepilha de madeira e o capim-braquiária. Neste estudo, concluiu-se que as estimativas foram maiores às observadas previamente em alimentos volumosos com o método de inibidores. Sugere-se utilizar o tempo de 12 horas para avaliação dos alimentos concentrados e 6 horas para os volumosos. No terceiro experimento, foram avaliadas a degradabilidade ruminal e a digestibilidade intestinal de 19 alimentos concentrados, 6 rações comerciais e 4 alimentos volumosos, usando o método de inibidores com digestão intestinal, HCL-pepsina-pancreatina, e o método de três estágios. Concluiu-se que a digestibilidade intestinal da proteína não degradada no rúmen dos alimentos avaliados não foi constante. O método dos inibidores estimou melhor a degradabilidade ruminal da proteína e o método de três estágios prediz com eficiência a digestibilidade intestinal da proteína não degradada no rúmen. Sugerem-se mais pesquisas para recomendar a estimativa do $NDT_{(m)}$ dos alimentos através das equações do NRC (2001).

ABSTRACT

LONDOÑO HERNÁNDEZ, FERNANDO IVÁN, D.S., Universidade Federal de Viçosa, march of 2001. **Evaluation of ruminal degradation and intestinal digestibility of feedstuffs crude protein through *in vitro* methods.** Adviser: Sebastião de Campos Valadares Filho. Committee Members: Antonio Bento Mancio and Rogério de Paula Lana

The goals of this work were to evaluate the kinetics parameters of protein degradation for some feedstuffs using an inhibitor *in vitro* method, estimate the kinetics parameters of crude protein for feedstuffs through the gas production method and to evaluate the ruminal disappearance and intestinal digestibility of feedstuffs protein using an inhibitor *in vitro* with HCL-pepsin-pancreatin solutions and the three-step methods. Three experiments were carried out. In the first study, there were evaluated the kinetics parameters of protein degradation for twenty four concentrate feedstuffs and fourteen grasses with an inhibitor *in vitro* method. The data of degradation rates indicated that promil, casein, peanut grain dry grounded, broiler litter using as adsorbent coffee rind, and cassava rasp had the highest rates of protein degradation; the slowly

degradation rates were obtained by corn meal, meat meal, broiler litter using an elephant grass as adsorbent, sugar cane yeast and feather meal. It was concluded that this approach offered a rapid and efficient evaluation of nitrogen degradation kinetic for concentrate feedstuffs. Nitrogen degradation rates of some grasses were underestimated. In the second study, chemical determinations and kinetics studies of nitrogen compounds of twenty four concentrate feedstuffs and ten grasses were made using the concentrations of soluble nitrogen in TCA and gas production. The data of degradation rates indicated that promil, casein, peanut grain dry grounded, cassava rasp, sorghum silage with or without inoculum, corn silage and honey grass had the highest degradable proteins; the slowly degradation rates were obtained by sugar cane yeast, feather meal, fish meal, broiler litter using wood rind as adsorbent and signal grass. Estimates of degradation rates of grasses were higher than degradation rates estimated previously by an inhibitor method. It was suggested to use 12 h for incubation of concentrate feedstuffs and 6 h for grasses. On the third experiment, there were evaluated the ruminal disappearance and protein digestibility of nineteen concentrate feedstuffs, six commercial rations and four grasses, using an inhibitor *in vitro* with HCL-pepsin-pancreatin solutions and the three-step methods. It was concluded that intestinal digestibility of the undegradable rumen protein was not constant. The inhibitor method was more efficient to evaluate and predict kinetic parameters of ruminal degradation and the three-step method for intestinal digestibility of undegradable rumen protein. It was suggested more evaluations to recommend the method of estimation of $NDT_{(m)}$ by the NRC (2001) equations.

INTRODUÇÃO

Os métodos *in vitro* para avaliar a degradação ruminal da proteína são de elevada potencialidade, devido à rápida predição dos padrões da fermentação e da degradação ruminal *in vivo*. Entretanto, a quantificação da taxa e extensão da degradação, utilizando microrganismos ruminais apresenta desvantagens devido ao fato de os microrganismos utilizarem os produtos da degradação para crescimento, resultando em subestimativa da degradação. Estudos realizados por BRODERICK (1982) e MILLER (1982) encontraram uma recuperação incompleta dos produtos da degradação. Por outro lado, WARNER (1956) encontrou a existência de inibidores da desaminação que seriam responsáveis pela baixa produção de amônia em alimentos concentrados avaliados *in vitro*.

Numa ampla revisão sobre metodologias utilizadas para determinar a degradação da proteína, BRODERICK (1995) considerou que para determinar a contribuição da proteína não degradada no rúmen é necessário quantificar a taxa de degradação e de passagem da proteína e a digestibilidade intestinal da proteína não degradada no rúmen.

Esse mesmo autor mostrou que o período de latência, normalmente encontrado na degradação da fibra, não foi encontrado em estudos *in vitro*, assim como sua inclusão nos cálculos para degradação da proteína não melhorou o ajuste.

BORCHERS (1967) adicionou tolueno, inibidor da desaminação dos aminoácidos em estudos *in vitro*, para os microrganismos ruminais não utilizarem os produtos da degradação e quantificou a degradação protéica pela liberação de aminoácidos. Avaliando a degradação da proteína como resultado da recuperação de amônia e aminoácidos, BRODERICK (1987) demonstrou que a incorporação de inibidores do metabolismo protéico (hidrazina e cloranfenicol) através do método dos inibidores *in vitro* (IIV), aumentou a recuperação dos produtos da degradação protéica, permitindo assim uma inibição do uso dos produtos da degradação para síntese de microrganismos.

O método de inibidores *in vitro* possui certas desvantagens, entre elas está a relacionada com a proteína de lenta degradação apresentada com algumas forrageiras e leguminosas. As taxas de degradação determinadas para alimentos contendo níveis elevados de amônia e aminoácidos livres são menos acuradas, isso é devido a que a taxa de degradação é estimada através do lento desaparecimento de NH_3 e aminoácidos, resultando num acúmulo de amônia e deficiência de energia no meio fermentador para suportar o crescimento microbiano e uso do excesso de proteína degradável (BRODERICK, 1995).

De acordo com BRODERICK e CLAYTON (1992), o uso do método IIV com tempos de incubação de 2 horas e utilizando a equação desenvolvida por Michaelis-Menten, resultou em excelentes estimativas das taxas de degradação. Entretanto, o método precisa de inúmeras análises de amônia e aminoácidos o que pode limitar a utilização desse método na prática. Já NEUTZE et al. (1993), utilizando o método IIV,

avaliaram a degradação protéica como a liberação de N solúvel em ácido tricloroacético, tendo como vantagem a determinação pelo método Kjeldahl.

RAAB et al. (1983) avaliaram a degradação da proteína através da produção de gases e da concentração de amônia durante um período de incubação de 24 horas. A liberação de NH_3 ao nível zero de produção de gases foi utilizada para corrigir NH_3 e aminoácidos utilizados para crescimento microbiano; o tempo zero implicou na ausência de crescimento microbiano, quando o N não foi incorporado na proteína microbiana. Os autores não encontraram diferenças na produção de gás entre diferentes fontes de carboidratos, sendo que, a produção de gás foi maior nas primeiras 12 horas, quando a fonte de carboidratos foi o amido. Os resultados foram altamente correlacionados com os obtidos em estudos *in vivo*. Entretanto, de acordo com essa metodologia, o procedimento requer que a relação entre produção de gás e síntese de proteína microbiana seja linear. Uma das principais vantagens do método é apresentar uma maior degradação de proteínas de lenta degradação.

Para calcular a degradabilidade ruminal da proteína bruta, os sistemas americano (NRC, 1985), britânico (AFRC, 1993) e de Cornell (CNCPS) consideram diferentes frações protéicas. O NRC (1985) divide a proteína dos alimentos em três frações denominadas A, B e C cuja soma totaliza 100, sendo a fração A constituída de compostos nitrogenados não protéicos, B a fração potencialmente degradável a uma taxa de 2 a 7 %/h e C a fração completamente indisponível no trato digestivo.

Na sua última publicação, o AFRC (1993) considera quatro frações para a proteína, utilizando-se os mesmos parâmetros a, b e c da equação de ORSKOV e McDONALD (1979). O ARC (1984) considerou a digestibilidade intestinal do resíduo ruminal como valor constante de 85 % baseado nos resultados de Storm e Orskov e Salter e Smith que encontraram a digestibilidade verdadeira do nitrogênio microbiano

no intestino de 79 % e dos aminoácidos sulfurados de 85 %. Esses autores consideraram os mesmos resultados para digestibilidade intestinal da proteína dietética não degradada no rúmen.

O AFRC (1993), baseado no trabalho de Webster et al., adotou o valor de 90 % para a digestibilidade intestinal da proteína não degradada no rúmen após subtrair dessa o teor de PIDA. Já o sistema de Cornell, considera três grandes frações para a proteína: A- constituída de compostos nitrogenados não protéicos, B- fração que contem os compostos nitrogenados protéicos (dividida em B₁, rapidamente degradada no rúmen, B₂ fração de degradação intermediária e B₃ fração degradada lentamente no rúmen) e a fração C representada pelo PIDA. Sendo que, esse sistema adotou os seguintes valores para a digestibilidade intestinal de 100,100 e 80%, respectivamente, para as frações B₁, B₂ e B₃ não degradáveis.

Por outro lado, tanto o sistema americano como o britânico calculam as exigências protéicas em termos de proteína metabolizável. Assim, para atender elevadas exigências de proteína metabolizável em ruminantes há necessidade de maximizar a eficiência de síntese de proteína microbiana e que parte da proteína ingerida não seja degradada no rúmen. Segundo BRODERICK (1995), a degradação ruminal da proteína tem sido descrita geralmente por um modelo de primeira ordem. O modelo considera que as proteínas dos alimentos possuem frações de diferentes degradabilidades e que o desaparecimento da proteína é resultante de duas atividades simultâneas: degradação e passagem. Ao aumentar a contribuição da proteína dietética não degradada no rúmen, a sua digestibilidade intestinal torna-se importante. Conseqüentemente, a determinação da degradabilidade ruminal da proteína sem o conhecimento da digestibilidade intestinal da fração que escapa à degradação ruminal parece não ser adequada (VALADARES FILHO, 1995).

Uma maneira de avaliar a digestibilidade pós-ruminal da proteína não degradada no rúmen seria através da utilização da técnica de sacos de náilon móveis (NRC, 2001). Entretanto, os estudos utilizando animais fistulados são laboriosos, caros e requerem tratamento especial. Por outro lado, CALSAMIGLIA e STERN (1995) desenvolveram a técnica *in vitro* de três estágios para estimar a digestibilidade intestinal da proteína de vários alimentos. A técnica assume que a contaminação microbiana é mínima e mostrou-se sensível ao avaliar o efeito do processamento e presença do fator inibidor da tripsina dos alimentos e teve uma alta correlação com estudos *in vivo*. O NRC (2001) recomenda utilizar as técnicas do saco de náilon móveis ou de três estágios para medir a digestibilidade intestinal da proteína não degradada no rúmen.

Os objetivos do presente trabalho foram desenvolver uma metodologia rápida e eficiente para medir a degradação ruminal da proteína (PDR) e avaliar a digestibilidade intestinal da proteína não degradada no rúmen (DIPNDR) dos alimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRICULTURAL AND FOOD RESEARCH COUNCIL - AFRC. 1993. **Energy and protein requirements of ruminants**. Wallingford, UK. CAB International. 159p.
- AGRICULTURAL RESEARCH COUNCIL -ARC 1984. **Report of the protein group of the Agricultural Research Council Working party, on the nutrient requirement of ruminants**. London. Commonwealth Agricultural Bureaux. 45 p.
- BORCHERS, R. 1967 Proteolytic activity of rumen fluid in vitro. *J. Anim. Sci.* 24:1033-1038.
- BRODERICK, G. A. 1995. Methodology for the determining ruminal degradability of feed proteins In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE EXIGÊNCIAS NUTRICIONAIS DE RUMINANTES. Viçosa, MG 1995, *Anais...* Viçosa, 1995 139-176p.
- BRODERICK, 1994. Quantifying forage protein quality In G. C Fahey Jr. National conference of forage quality, evaluation, and utilization University of Nebraska, Lincoln. 200-228p.
- BRODERICK, G. A. 1982. Estimation of protein degradation using in situ and in vitro methods. p.72-80 In F. N Owens (ed) Protein requirements for cattle: Symposium. Oklahoma State Univ., Stillwater.
- BRODERICK, G. A. 1987. Determination of protein degradation rates using a rumen in vitro system containing inhibitors of microbial nitrogen metabolism. *British Journal of Nutrition* 58:463-475.
- BRODERICK, G. A., CLAYTON, M. K. 1992. Ruminal protein degradation rates estimated by nonlinear regression analysis of Michaelis-Menten in vitro data. *Br. J. Nutr.* 67:27-42
- CALSAMIGLIA, S., STERN, M. D. 1995. A three-step in vitro procedure for estimating intestinal digestion of protein in ruminants. *J. Anim. Sci.* 73:1459-1465.

- MILLER, E. L. 1982. Methods of assessing proteins for ruminants including laboratory methods *In* E. L. Miller Protein contribution of feedstuffs for ruminants p.18-32 Butterwords, Boston
- NEUTZE, S.A.; SMITH, R. L.; FORBES, W. A.1993. Application of an inhibitor in vitro method for estimating rumen degradation of feed protein. *Animal Feed Science and Technology*. 40:251-265.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. 1985. **Ruminant nitrogen usage**. Washington DC. 158 p.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. 2001. Nutrient requirements of dairy cattle. 7th revised ed. Washington, D. C. National Academic Press. 381p.
- ORSKOV, E. R.; McDONALD, I. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *J. Agric. Sci.* 29:449-453.
- RAAB, L.; CAFANTARIS, B.; JILG, T. et al. 1983. Rumen protein degradation and biosynthesis. *British Journal of Nutrition*. 50:569-582.
- VALADARES FILHO, S. C. 1995. *Eficiência de síntese de proteína microbiana, degradação ruminal e digestibilidade intestinal da proteína bruta, em bovinos*. In: SIMPOSIO INTERNACIONAL SOBRE EXIGÊNCIAS NUTRICIONAIS DE RUMINANTES. 1995, Viçosa. *Anais...* Minas Gerais:SBZ, p.355-388.
- WARNER. A. C. I.1956. Proteolysis by rumen microorganisms. *J. Gen. Microbiol.* 14:749-762.

Determinação da Cinética Ruminal da Proteína de Vários Alimentos Utilizando o Método de Inibidores In Vitro (IIV) e o Sistema Kjeldahl

RESUMO - Os objetivos do presente trabalho foram estimar os parâmetros cinéticos da degradação dos compostos nitrogenados de 24 alimentos concentrados e 14 volumosos através do método de inibidores *in vitro* com o uso do sistema Kjeldahl. Foi utilizado líquido ruminal oriundo de bovino recebendo dieta com 60% de volumoso e 40% de concentrado. Na preparação de 1000mL do meio fermentador, utilizou-se 800mL do inóculo, 2 g de NaHCO₃ em 50mL de H₂O destilada, 3,2 g de pectina em 100mL de solução McDougall, 0,234mL de mercaptoethanol, 0,195 g de sulfato de hidrazina em 25mL de solução McDougall e 0,045 g de cloranfenicol em 25mL de solução McDougall. Ao meio fermentador adicionou-se 3,2 g de amido, 3,2 g de xilose e 0,16mL de antiespumante (Antifoam 204, Sigma Chemical Co. A-6426) . Foi determinado o desaparecimento dos compostos nitrogenados dos alimentos nos tempos 0 e 2 horas, incubados na quantidade de aproximadamente 1,875 mg de N para cada tubo de ensaio. As estimativas referentes às taxas de degradação mostraram que os alimentos: promil, caseína, grão de amendoim moído, cama de frango contendo casca de café como material absorvente e raspa de mandioca possuem proteínas de rápida degradação e que as mais lentas taxas de degradação foram observadas para o fubá de milho, a farinha de carne e ossos, a cama de frango contendo capim-elefante como material absorvente, a levedura de cana de açúcar e a farinha de penas. De maneira geral, os parâmetros da degradação apresentaram resultados semelhantes aos reportados *in situ*. O método dos inibidores *in vitro* permitiu uma avaliação rápida e eficiente da cinética de degradação da proteína bruta dos alimentos concentrados. As taxas de degradação de alguns alimentos volumosos foram subestimadas.

Palavras-chave: cinética, degradabilidade, inibidor in vitro, nitrogênio

Determination of Ruminal Protein Kinetics of Feedstuffs Using an Inhibitor *in vitro* Method and Kjeldahl System

ABSTRACT - The goal of this work was to evaluate the kinetics parameters of protein degradation for twenty four concentrate feedstuffs and fourteen grasses through an inhibitor *in vitro* method using a kjeldahl system. Rumen fluid from steer fed a 60:40 forage to concentrate ratio was used. To prepare 1000 mL of inoculum, it was used a 800 mL of rumen fluid, 2 g of NaHCO₃ in 50 mL of distilled water, 3,2 g of pectin in 100mL of McDougall, 0.234 mL of mercaptoethanol and 0.195 g of hidrazine sulfate in 25mL of McDougall and 0,045 g of chloramphenicol in 25mL of McDougall. It was added 3.2 g of starch, xylose and 0.16mL of antifoam 204 (Sigma Chemical Co. A-6426) to the inoculum. The disappearance of nitrogen of feedstuffs was determined at 0 and 2 hours, in approximately 1.875 mg of N incubated on each vessel. The data of degradation rates indicated that promil, casein, peanut grain dry grounded, broiler litter using as adsorvent coffee rind, and cassava rasp had the highest rates of protein degradation and the slowly degradation rates were obtained by corn meal, meat meal, broiler litter using an elephant grass as adsorvent, sugar cane yeast and feather meal. The degradation parameters were alike as reported *in situ*. This approach offered a rapid and efficient evaluation of nitrogen degradation kinetic for concentrate feedstuffs. Nitrogen degradation rates of some grasses were underestimated.

Key Words: degradability, inhibitor *in vitro*, kinetic, nitrogen

Introdução

Os métodos *in vitro* para avaliar a degradação ruminal da proteína são de elevada potencialidade, devido à rápida predição dos padrões da fermentação e da degradação ruminal *in vivo*. Entretanto, a quantificação da taxa e extensão da degradação, utilizando microrganismos ruminais apresenta desvantagens devido ao fato de os microrganismos utilizarem os produtos da degradação para crescimento, resultando numa subestimativa da degradação. WARNER (1956) encontrou a existência de inibidores da desaminação que seriam responsáveis pela baixa produção de amônia em alimentos concentrados avaliados *in vitro*. BRODERICK (1982) e MILLER (1982) relataram uma recuperação incompleta dos produtos da degradação. BORCHERS (1967) adicionou tolueno, inibidor da desaminação dos aminoácidos em estudos *in vitro*, para os microrganismos ruminais não utilizarem os produtos da degradação e quantificou a degradação protéica pela liberação de aminoácidos. Avaliando a degradação da proteína como resultado da recuperação de amônia e aminoácidos, BRODERICK (1987) demonstrou que a incorporação de inibidores do metabolismo protéico (hidrazina e cloranfenicol) através do método dos inibidores *in vitro* aumentou a recuperação dos produtos da degradação, permitindo assim uma inibição do uso dos produtos da degradação para crescimento microbiano.

De acordo com BRODERICK e CLAYTON (1992), o uso do método IIV com tempos de incubação de 2 horas e utilizando a equação desenvolvida por Michaelis-Menten, resultou em excelentes estimativas das taxas de degradação. Entretanto o método precisa de inúmeras análises de amônia e aminoácidos o que pode limitar a sua utilização na prática. Já NEUTZE et al. (1993), utilizando o método IIV, avaliaram a degradação protéica como a liberação de nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético, tendo como vantagem a determinação pelo método Kjeldahl. O procedimento de

precipitação em ácido tricloroacético mede peptídeos numa maior extensão que N-amino. Existem evidências que mostraram peptídeos em elevadas concentrações no líquido ruminal *in vivo* (CHEN et al., 1987) e *in vitro* (BRODERICK e CRAIG, 1983; RUSSELL et al., 1983). RUSSELL et al. (1983) encontraram concentrações elevadas de peptídeos após 7 horas de incubação e BRODERICK e WALLACE (1988) reportaram em proteínas de rápida degradação como a caseína, aumentos da concentração de peptídeos em até 3 horas.

Os objetivos deste trabalho foram estimar os parâmetros cinéticos da degradação da proteína em vários alimentos produzidos no Brasil por meio da técnica dos inibidores *in vitro* (IIV), utilizando o sistema Kjeldahl.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido nas dependências do laboratório de Nutrição Animal, do Departamento de Zootecnia, da Universidade Federal de Viçosa. A dinâmica da degradação dos compostos nitrogenados foi avaliada pela incubação *In vitro* com o uso de inibidores. O método descrito por BRODERICK (1987) foi modificado, utilizando a determinação dos compostos nitrogenados recuperados através do método Kjeldahl, em vez de análises específicas de amônia e aminoácidos totais. Foi utilizado como inóculo, líquido ruminal oriundo de bovino recebendo dieta com 60% de volumoso e 40% de concentrado. Após a retirada do líquido, este foi filtrado inicialmente em camada dupla de gaze e, no laboratório, em camada quadrupla. Na elaboração de 1000mL (100 tubos) do meio fermentador utilizou-se 800mL do inóculo, 2 g de bicarbonato de sódio em 50mL de água destilada, 3,2 g de pectina em 100mL de solução McDougall, 0,195 g de sulfato de hidrazina em 25mL de solução McDougall e 0,045 g de cloranfenicol em 25mL de solução McDougall, infundiu-se, constantemente, CO₂ no meio. A solução McDougall com pectina foi preparada um dia antes da

incubação sendo infundido CO₂ e mantida na sala de incubação (39 °C) durante à noite, semelhante a uma solução de McDougall de 500mL, sem CO₂, utilizada para umedecer as amostras dos alimentos no dia da incubação.

Ao meio fermentador foi adicionado 3,2 g de amido, 3,2 g de xilose e 0,16mL de antiespumante (Antifoam 204, Sigma Chemical Co. A-6426) e posteriormente procedeu-se à pré-incubação do fermentador por três horas (sempre foi preparado 20% a mais de todas as soluções e reagentes). A cada hora foram feitas medições do pH e análises de NH₃. O pH foi controlado com uma solução 3N de NaOH.

Durante a pré-incubação as amostras dos alimentos foram colocadas em tubos de incubação de 50mL e umedecidas (5mL) com solução McDougall, submetidas ao agitador (150 rpm) durante 35 minutos. Após a pré-incubação adicionaram-se ao meio fermentador, primeiro, 0,234mL de mercaptoethanol, em seguida 25mL da solução contendo sulfato de hidrazina e depois 25mL da solução contendo cloranfenicol, agitando-se lentamente. Posteriormente, foi adicionado 10mL do meio fermentador aos tubos previamente umedecidos contendo amostra e 5 mL da solução de McDougall e procedeu-se à incubação.

Cada alimento foi incubado nos tempos 0 e 2 horas, na quantidade de 1,875 mg de N para cada tubo de incubação. Nos tubos correspondentes ao tempo zero hora foi colocado 1,25mL de ácido tricloroacético (TCA) 65%, sendo estes guardados na geladeira. Os tubos de 2 horas foram mantidos na sala de incubação sob um agitador de mesa a 150 rpm. Após o período de incubação foi colocado TCA na mesma proporção que para os tubos de zero hora, sendo também colocados na geladeira. Posteriormente todos os tubos (0 e 2 h) foram centrifugados a 15.300 g e 4 °C durante 15 minutos, sendo o sobrenadante guardado a 4 °C até a realização das análises correspondentes.

Foi utilizado o método Kjeldahl (AOAC, 1990) para determinar o teor de nitrogênio dos seguintes alimentos: caseína, fubá de milho, milho desintegrado com palha e sabugo (MDPS), quirera de milho, promil, glúten de milho, grão de sorgo moído, grão de milheto moído, grão de amendoim moído, raspa de mandioca, polpa cítrica, farelo de algodão contendo 30% de casca, farelo de soja, farelo de trigo e levedura de cana de açúcar. Foram também avaliadas as farinhas de peixe, de carne e ossos, de sangue, de penas, de vísceras de aves, mista de vísceras de aves e suínos, e as camas de frango contendo como material absorvente capim-elefante, casca de café e cepilha de madeira.

Foram também avaliados os volumosos: silagens de milho (*Zea mays*) e de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench), com ou sem inoculante microbiano, capim-braquiária (*Brachiaria decumbens* cv. Basiliski) (2º ano), coletado no início das águas, com idade de 45 dias, capim-braquiaraão (*Brachiaria brizantha* (Hochst) Stapf) coletado no início da seca, capim-andropogon (*Andropogon gayanus* K) e capim-tobiatã (*Panicum maximum* Sp) coletados no início das águas com 30 dias de rebrota, capim-gordura (*Melinis minutiflora* Beauv), capim-braquiária do brejo (*Brachiaria radicans* Napper), capim-elefante (*Pennisetum purpureum* cv. Napier), estylosantes guianensis (*Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw) cultivar mineirão coletado no início das águas, os fenos de capim-tifton (*Cynodon dactylon*) com cinco semanas de idade e de capim-coast-cross (*Cynodon dactylon* L. Pers).

Foram feitas determinações de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), matéria mineral (MM) e extrato etéreo (EE), seguindo os procedimentos descritos pelo AOAC (1990), além dos carboidratos totais (CHT) estimados pela equação (SNIFFEN et al., 1992): $CHT (MS) = 100 - (\%PB + \%EE + \%MM)$. A composição bromatológica dos

alimentos concentrados e volumosos avaliados encontra-se, respectivamente, nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1 - Teores médios de matéria seca (MS), matéria mineral (MM), matéria (MO), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE) e carboidratos totais (CHT) de vários alimentos concentrados, em porcentagem da matéria seca

Alimentos	MS (%)	MM ¹	MO ¹	PB ¹	EE ¹	CHT ¹
Caseína	89,19	2,06	97,94	97,95	0,00	0,00
Farelo de soja	87,77	8,56	91,44	46,81	1,62	43,01
Farelo de algodão 30% de casca	89,43	4,69	95,31	25,06	1,22	69,03
Glúten de milho	89,63	5,49	94,51	61,31	0,19	33,01
Fubá de milho	89,02	1,02	98,98	9,19	2,76	88,03
MDPS	87,00	1,55	98,45	7,90	2,15	88,30
Promil	87,74	10,33	89,67	18,31	4,17	67,19
Quirera de milho	87,61	1,60	98,40	9,81	3,96	85,63
Grão de milheto moído	88,18	6,00	94,00	15,94	5,36	72,70
Grão de sorgo moído	87,17	1,89	98,11	9,44	3,09	85,08
Grão de amendoim moído	91,90	9,48	90,52	15,94	2,20	72,38
Raspa de mandioca	87,94	3,65	96,35	2,56	0,42	93,37
Polpa cítrica	85,5	7,18	92,82	6,48	2,34	84,00
Farelo de trigo	83,10	5,47	94,53	14,25	3,53	77,75
Farinha de peixe	92,00	32,05	67,95	57,13	9,87	0,95
Farinha de sangue	91,00	2,98	97,02	81,00	0,15	15,87
Farinha de carne e ossos	94,00	43,05	56,95	37,81	8,75	10,39
Farinha de penas	95,00	2,53	97,47	77,00	3,31	17,16
Farinha de vísceras de aves	93,46	17,60	82,4	54,13	11,59	16,68
Farinha mista aves-suínos	94,30	16,50	83,95	49,94	9,66	23,90
Levedura de cana de açúcar	90,00	5,79	94,21	34,19	4,03	55,99
Cama de frango de casca de café	88,35	12,93	87,07	15,13	1,85	70,09
Cama de frango de capim-elefante	85,29	15,04	84,96	14,50	1,29	79,17
Cama de frango de cepilha de madeira	84,65	12,05	87,95	15,31	0,83	72,21

¹% na MS

As amostras foram moídas em moinho de bola e incubadas em duplicata em três dias diferentes, utilizando a caseína como alimento padrão.

Os cálculos da degradação foram realizados de acordo com as seguintes equações:

Taxa de degradação, Kd (/h) = - (LnFID_{2h} - LnFID_{oh})/2; onde

LnFID_{oh} = { 1 - [(Ninsolúvel TCA_{oh})/Nincubado]} e

$\text{LnFID}_{2h} = \{1 - [(\text{Ninsolúvel TCA}_{2h})/\text{Nincubado}]\}$, sendo

Ninsolúvel em TCA, para 0 e 2h = mg (Ninsolúvel TCA - Nbranco);

Fração B, $B (\%) = [\text{Exp}(\text{LnFID}_{0h}) \times 100]$ e a proteína de escape calculada como:

$\text{Pe} (\%) = B [Kp / (Kd + Kp)]$ assumindo-se uma taxa de passagem de 0,05/h.

Tabela 2 - Teores médios de matéria seca (MS), matéria mineral (MM), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE) e carboidratos totais (CHT) de alguns alimentos volumosos, em porcentagem da matéria seca

Alimentos	MS (%)	MM ¹	MO ¹	PB ¹	EE ¹	CHT ¹
Capim-braquiária	30,40	4,87	95,13	6,55	1,34	84,24
Capim-braquiarão	41,95	6,74	93,26	6,01	0,76	86,69
Capim-braquiária do brejo	26,35	3,50	96,50	7,35	0,65	88,20
Capim-elefante	22,09	10,14	89,86	5,52	1,23	83,11
Capim-tobiatã	48,18	ND	ND	3,29	ND	ND
Capim-andropogon	28,68	ND	ND	7,12	ND	ND
Capim-gordura	27,72	3,80	96,20	7,15	1,09	88,16
Silagem de milho	29,64	4,50	95,50	7,64	3,79	82,67
Silagem de milho Inóculado	28,89	4,01	95,99	8,61	3,49	83,69
Silagem de sorgo	26,35	4,73	95,27	6,25	2,19	86,83
Silagem de sorgo Inóculado	23,98	5,54	94,46	5,82	2,16	86,28
Feno de capim-tifton	88,19	4,65	95,35	19,06	1,35	74,94
Feno de capim-coast cross	88,88	5,03	94,97	7,55	1,34	86,08
Estilosantes guianensis	31,00	5,78	94,22	14,83	2,89	74,50

¹% na MS, ND não determinado

Os dados estimados sobre as taxas de degradação, frações B e proteína de escape nas diferentes incubações foram avaliados utilizando-se a estatística descritiva.

Resultados e Discussão

A principal alteração do método dos inibidores *in vitro* (IIV) foi a determinação dos compostos nitrogenados através do sistema Kjeldahl, quantificando o N-total, em lugar da soma do N-aminoácido e N-NH₃. Por outro lado, através do sistema Kjeldahl é possível também determinar a fração correspondente ao N-NH₃ e por diferença do N-

Total e N-NH₃ determinar o nitrogênio aminoácido (N-AA), porém, esta diferença não foi calculada neste trabalho.

Os valores médios estimados dos parâmetros da degradação da proteína dos alimentos concentrados estão apresentados na Tabela 3. As estimativas referentes às taxas de degradação mostraram que os alimentos concentrados: Promil, caseína, grão de amendoim moído, cama de frango contendo casca de café como material absorvente e raspa de mandioca possuem proteínas de rápida degradação. Observou-se também lentas taxas de degradação para o fubá de milho, farinha de carne e ossos, cama de frango contendo capim-elefante como material absorvente, levedura de cana de açúcar e farinha de penas.

Como era de se esperar, e é mostrado pelos resultados, a maior taxa de degradação resultou em menos proteína disponível para a digestão intestinal. Os valores médios estimados da proteína de escape dos alimentos que apresentaram elevadas taxas de degradação variaram de 2,0 para promil até 15,05% para caseína.

Do ponto de vista prático, mais proteína pode ser degradada que sintetizada e haverá por conseguinte perdas de N-protéico no rúmen na forma de amônia (NH₃), quando for oferecida aos ruminantes proteína de rápida degradação de tal forma que os microrganismos não podem utilizar todos os aminoácidos e NH₃ liberados. A caseína tem sido utilizada como alimento padrão nos estudos *in vitro* devido à sua composição aminoacídica e por ser praticamente toda degradada no rúmen, ou seja, ter uma rápida degradação. No presente trabalho também foi utilizada como padrão durante todas as avaliações.

Tabela 3 – Médias, número de observações (N) e desvio padrão (dp) para as taxas de degradação (Kd), fração B e proteína que escapa à degradação ruminal obtidas para alimentos concentrados, utilizando o método de inibidores *in vitro*

Alimentos	Kd (/h)		FraçãoB (%)		Proteína de escape (%)	
	Média ¹	dp	Média ¹	dp	Média ¹	dp
Caseína	0,261	0,008	93,92	1,67	15,05	0,41
Farelo de soja	0,154	0,002	84,13	0,36	20,83	0,41
Farelo de algodão 30% casca	0,063	0,002	75,65	0,23	33,50	0,55
Glúten de milho	0,042	0,003	86,32	2,93	46,83	3,37
Fubá de milho	0,022	0,0006	84,57	0,30	52,00	0,63
MDPS	0,181	0,004	71,73	0,68	15,33	0,52
Promil	0,527	0,002	22,18	0,09	2,0	0,01
Quirera de milho	0,067	0,003	78,35	1,79	33,50	1,05
Grão de milho moído	0,041	0,001	95,86	0,27	52,33	0,82
Grão de sorgo moído	0,043	0,002	85,92	0,75	46,50	0,84
Grão de amendoim moído	0,244	0,005	67,90	0,74	11,50	0,55
Raspa de mandioca	0,269	0,013	63,55	2,11	9,83	0,41
Polpa cítrica	0,049	0,001	41,63	0,21	21,17	0,41
Farelo de trigo	0,111	0,003	74,75	0,23	23,00	0,63
Farinha de peixe	0,043	0,002	83,62	0,20	45,00	0,89
Farinha de sangue	0,042	0,002	79,08	2,52	42,66	1,97
Farinha de carne e ossos	0,035	0,001	85,63	0,17	50,00	0,63
Farinha de penas	0,039	0,002	30,45	0,26	17,33	0,52
Farinha de vísceras de aves	0,073	0,007	52,15	0,42	23,16	0,55
Farinha mista aves-suínos	0,075	0,003	36,93	0,21	14,83	0,41
Levedura de cana de açúcar	0,037	0,001	92,52	0,34	53,00	0,86
Cama de frango de casca de café	0,269	0,018	36,95	1,10	5,67	0,52
Cama de frango de capim-elefante	0,033	0,002	39,68	0,82	23,67	0,52
Cama de frango de cepilha de madeira	0,061	0,006	45,17	0,41	20,50	1,05

¹Dados de 18 observações para caseína e 6 observações para os demais alimentos

A estimativa média das taxas de degradação (Kd) da caseína foi de 0,261. Comparando-se os valores obtidos com os da literatura, nota-se que os resultados de Kd e fração B foram semelhantes àqueles reportados por BRODERICK (1978, 1987, 1995) e CRAIG et al. (1984) utilizando o mesmo método e avaliando o desaparecimento através da recuperação de N-NH₃ e N-aminoácido. A proteína de escape foi semelhante

àquela obtida em estudos com animais fistulados no abomaso por McDONALD e HALL (1957) que foi de 13%, para uma taxa de passagem de $0,06 \text{ h}^{-1}$.

O farelo de soja tem sido considerado de degradabilidade intermediária e as estimativas médias para a taxa de degradação foram semelhantes às aquelas reportadas por BRODERICK (1987) de $0,159/\text{h}$, utilizando uma relação 60:40 volumoso:concentrado na alimentação dos bovinos doadores de líquido ruminal, e próximas às encontradas por BRODERICK e CLAYTON (1992) de $0,140/\text{h}$, BRODERICK et al. (1988) de $0,166/\text{h}$, BRODERICK (1995) de $0,166/\text{h}$ e ENGLAND et al. (1997) de $0,158/\text{h}$. Avaliando a degradabilidade através do método de inibidores e utilizando uma relação 50:50 na alimentação dos bovinos, NEUTZE et al. (1993) reportaram Kd para farelo de soja de 0,069 e 0,092 quando a relação foi 80:20. Por outro lado, as estimativas da fração B foram 7,8% menores que as reportadas pelos autores acima citados e a proteína de escape foi semelhante à obtida por BRODERICK e CLAYTON (1992) de 24%. Já o NRC (1989) adotou valores de 35% para a proteína de escape do farelo de soja. Uma explicação para a similaridade das estimativas encontradas na presente pesquisa com aquelas obtidas por outros autores é que o meio nutritivo utilizado revelou-se eficaz na manutenção dos valores de pH entre 6,7-7,0 para todos os alimentos avaliados. Valores inferiores a 6,2 no pH afeta o crescimento dos microrganismos ruminais especialmente os fibrolíticos (MERTENS e LOFTEN, 1980). Nota-se, portanto, que o sistema foi estável como pode ser observado pelos baixos valores do desvio padrão para as estimativas obtidas.

As estimativas médias para Kd do farelo de algodão foram próximas às encontradas por NEUTZE et al. (1993), utilizando uma dieta 50:50 para os bovinos doadores. A proteína da farinha de peixe é considerada resistente à degradação ruminal. Os resultados para Kd, B e para proteína de escape foram semelhantes aos encontrados

por BRODERICK et al. (1988) e por HRISTOV e BRODERICK (1994) avaliando farinha de peixe de alta solubilidade. O NRC (1989) considerou um valor de 60% para a proteína de escape da farinha de peixe e 49% para a farinha de carne e ossos. Os resultados da taxa de degradação da fração B e proteína de escape da farinha de carne e ossos foram semelhantes aos obtidos por BRODERICK (1987) e NRC (1989) para a proteína de escape (49%).

Avaliando dois tipos de farinha de sangue, ENGLAND et al. (1997) encontraram taxas de degradação muito mais lentas que as obtidas neste trabalho, 0,01/h e 0,04/h, respectivamente. Entretanto, os resultados para taxa de degradação da farinha de pena encontrados por esses autores, foram próximos aos obtidos na presente pesquisa.

As farinhas de vísceras de aves e mista de vísceras de aves e suínos resultaram em taxas de degradação próximas, já a fração B foi 29,18% maior na farinha de vísceras quando comparada com a mista de aves e suínos.

O fubá de milho, quirera de milho e o MDPS apresentaram teores de proteína (PB) próximos (Tabela 1). Por outro lado, as taxas de degradação e a proteína de escape desses três alimentos foram diferentes. A quirera e o fubá de milho apresentaram taxas de degradação lentas. Fica implícito que alimentos com teores de PB similares, mas com diferenças nas taxas de degradação e proteína de escape, resultarão em predições incorretas sobre a performance animal se na formulação das rações não for considerada a dinâmica ruminal e a proteína de escape. O MDPS apresentou uma taxa de degradação intermediária. O NRC (1989) adotou valores de 52% para a proteína de escape do milho, valores semelhantes aos encontrados nesta pesquisa. Já para o glúten de milho, os dados estimados para Kd de 0,042/h foram próximos aos reportados por HRISTOV e BRODERICK (1994), de 0,034/h.

Ao analisar as taxas de degradação dos grãos moídos observou-se que as estimativas de Kd para sorgo e milho foram semelhantes, e que o amendoim apresentou uma taxa de degradação rápida. As estimativas médias para a proteína de escape do sorgo grão moído foram semelhantes às reportadas pelo NRC (2001) de 49%.

Os valores da taxa de degradação para levedura de cana de açúcar e polpa cítrica foram semelhantes, entretanto, vale ressaltar que a proteína de escape da levedura de cana de açúcar (34,19% de PB) apresentou junto com o fubá de milho e o grão de milho moído o maior valor numérico, 53%, 52% e 52%, respectivamente, quando comparada com os outros alimentos avaliados.

A cama de frango tem sido utilizada como fonte de compostos nitrogenados protéicos e não protéicos e seu perfil nutricional é definido pelo material absorvente utilizado. O teor de proteína bruta da cama de frango, utilizando como material absorvente casca de café foi aproximadamente 4,16% maior que a contendo capim-elefante e semelhante àquela com cepilha de madeira. Neste caso, a taxa de degradação da cama de frango contendo casca de café foi 8,8 vezes maior (0,269/h) que a taxa de degradação da cama de frango a base de capim-elefante (0,033/h) e 4,4 vezes maior que a taxa de degradação da cama de frango a base de cepilha de madeira (0,061/h). Portanto, seu uso deve ser com uma fonte energética de rápida fermentação no rúmen para máxima eficiência microbiana. Avaliando a degradação ruminal da cama de frango utilizando como base capim-elefante através da técnica *in situ*, OLIVEIRA (1998) encontrou uma taxa de degradação de 0,04/h, próxima à encontrada no presente trabalho.

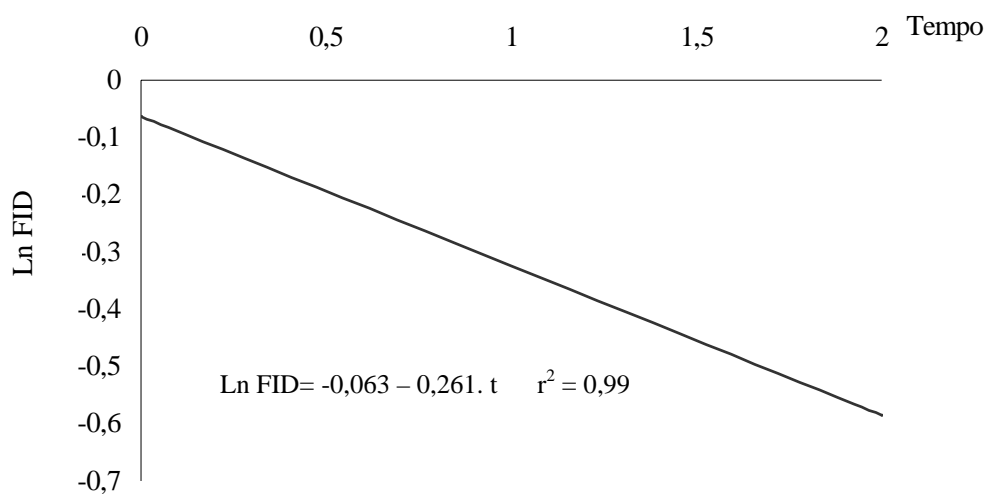


Figura 1 - Logaritmo natural da fração indegradável da caseína em função do tempo, utilizando o método dos inibidores *in vitro*

A Figura 1 mostra a cinética da degradação da caseína nas dezoito diferentes avaliações realizadas. Como pode-se observar, a regressão foi linear apresentando um coeficiente de regressão “b” de -0,261 e o coeficiente linear “a” próximo de zero, e apresentou um elevado coeficiente de determinação 0,99. A equação $\text{Ln FID} = a + K_d.t$ onde, $K_d = -(\text{Ln}_2 - \text{Ln}_0)/2$ mostra $K_d = 0,261$ o que significa que 26,1% do nitrogênio da caseína remanescente foi degradado por hora.

Normalmente tem sido feitas comparações da cinética da degradação entre os métodos *in situ* e *in vitro*, em virtude das estimativas pelo método *in situ* resultar, às vezes, em valores mais próximos de degradação dos valores encontrados *in vivo*. Entretanto, vale ressaltar que os objetivos de cada técnica são diferentes (MERTENS, 1993). Embora a comparação entre parâmetros cinéticos obtidos entre estas duas técnicas não seja aconselhada (MERTENS, 1993), os valores das taxas de degradação

para as incubações *in vitro* (IIV) foram semelhantes aos estimados *in situ* para farelo de trigo, fubá de milho, cama de frango contendo cepilha de madeira como material absorvente, farinha de peixe, farelo de algodão e grão moído de sorgo, conforme VALADARES FILHO et al. (1990), VALADARES FILHO et al. (1991) e VALADARES FILHO (1994) e para farelo de soja, segundo LONDOÑO HERNÁNDEZ (1995); polpa cítrica, (GOES et al., 2000a) e grão de sorgo moído (MARTINS et al. 1997). Vale lembrar que a comparação de alimentos pode ser feita sempre por técnicas *in vitro*, enquanto a comparação entre dietas deve ser feita por técnicas *in vivo* (MALAFAIA, 1997).

As estimativas médias dos parâmetros cinéticos da degradação da proteína dos alimentos volumosos são apresentadas na Tabela 4. Observou-se que as estimativas médias das taxas de degradação do feno de capim-tifton, capim-braquiário e do capim-andropogon foram elevadas indicando que esses alimentos possuem proteínas de rápida degradação. Entretanto, lentas taxas de degradação foram observadas para o capim braquiária e as silagens de sorgo com ou sem inoculante.

As proteínas das forragens são extensamente degradadas ao nível ruminal, sendo utilizadas para síntese protéica pelos microrganismos (BEEVER e SIDONS, 1986). De acordo com os resultados, não seriam esperadas elevadas proporções da proteína de escape.

De acordo com BRODERICK (1995), o método de inibidores *in vitro* possui certas desvantagens, entre elas está a relacionada com a proteína de lenta degradação apresentada com alguns volumosos. As taxas de degradação determinadas para alimentos contendo níveis elevados de amônia e aminoácidos livres são menos acuradas, devido à taxa de degradação ser estimada através do lento desaparecimento de NH₃ e aminoácidos, resultando num acúmulo de amônia e deficiência de energia no

meio fermentador para suportar o crescimento microbiano e uso do excesso de proteína degradável.

Tabela 4 – Médias, número de observações (N) e desvios padrão (dp) para as taxas de degradação (Kd), fração B e proteína que escapa à degradação ruminal obtidas para alimentos volumosos, utilizando o método de inibidores *in vitro*

Alimentos	Kd(h)		Fração B (%)		Proteína de escape (%)	
	Média ¹	dp	Média ¹	dp	Média ¹	dp
Capim-braquiária	0,005	0,0100	58,83	0,41	53,83	0,75
Capim-braquiaraão	0,102	0,0030	79,88	0,29	26,50	0,55
Capim-braquiária do brejo	0,021	0,0008	85,57	0,31	60,17	0,75
Capim-elefante	0,013	0,0007	97,90	0,29	78,16	0,84
Capim-Tobiatã	0,018	0,0008	90,91	0,35	66,50	0,83
Capim-Andropogon	0,080	0,0010	98,53	0,38	37,83	0,41
Capim-gordura	0,040	0,0008	95,97	0,51	53,00	0,63
Silagem milho	0,035	0,0040	63,15	0,34	37,00	1,67
Silagem milho inoculado	0,013	0,0008	41,70	0,32	33,00	0,63
Silagem sorgo	0,007	0,0004	72,28	0,43	62,67	0,52
Silagem sorgo inoculado	0,007	0,0006	74,25	0,26	65,00	0,63
Feno capim-tifton	0,148	0,0010	91,20	0,62	23,00	0,01
Feno capim-coast cross	0,029	0,0020	77,45	0,16	48,67	1,21
Estilosanthes guianensis	0,062	0,0170	88,96	0,25	39,67	0,52

¹Dados de 6 observações

As estimativas médias da taxa de degradação da silagem de sorgo foram semelhantes às reportadas por MARTINS et al. (1998), de 0,017/h, e para silagem de milho foram próximas às reportadas por VALADARES FILHO et al. (1990), de 0,035/h, e semelhantes às encontradas por BACKES et al. (2000), e GOES et al. (2000b), respectivamente 0,02 e 0,04/h, e para silagem de milho com inoculante (BACKES et al. (2000) de 0,016/h. Para VAN SOEST (1994), os aditivos tem duas principais vantagens na silagem: influenciar na fermentação favorecendo a preservação e alterar a composição melhorando o valor nutritivo. No presente trabalho não foi alterada a cinética ruminal da silagem de sorgo devido à inoculação microbiana, já para a silagem de milho a inoculação diminuiu a taxa de degradação dos compostos

nitrogenados. KEADY et al. (1994), estudando o efeito de inoculante microbiano na degradabilidade da silagem constataram que o tratamento com inoculante melhorou a digestibilidade das silagens e aumentou a degradabilidade ruminal dos compostos nitrogenados, aumentando o valor da fração solúvel. MORAIS (1995) não encontrou efeito da inoculação sobre a degradabilidade ruminal *in situ* da silagem de milho.

O feno de capim-coast-cross apresentou Kd próximo aos encontrados por OLIVEIRA et al. (1999), GOES et al. (2000b), ÍTAVO et al. (2000) e FRANZOLIN et al. (2000), respectivamente, 0,026, 0,034, 0,032, e 0,023 h⁻¹. Estimativas semelhantes para taxa de degradação do estylosantes foram encontradas por LADEIRA et al. (2000), de 0,096/h.

Avaliando a degradabilidade ruminal *in situ* de vários volumosos, MARTÍNEZ (1999) encontrou Kd para capim-braquiário de 0,069 e para o capim braquiária de 0,104. No presente trabalho as taxas de degradação foram de 0,005 e 0,102/h para os capins braquiária e braquiário, respectivamente.

As estimativas médias da taxa de degradação para os capins-tobiatã e feno de capim-tifton foram diferentes daquelas encontradas por PINTO et al. (1998) e ÍTAVO et al. (2000), respectivamente, 0,054 e 0,035 h⁻¹. Já para o capim-elefante, o resultado foi próximo do relatado por LONDOÑO HERNÁNDEZ (1995), de 0,018 h⁻¹ ao avaliar a degradabilidade ruminal do capim elefante seco a 55°C.

Conclusões

O uso do método dos inibidores *in vitro*, utilizando o sistema Kjeldahl, permitiu uma avaliação rápida e eficiente da cinética de degradação da proteína bruta dos alimentos concentrados. As taxas de degradação de alguns alimentos volumosos foram subestimadas.

Referências Bibliográficas

- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS- AOAC, 1990. *Official methods of analysis*. 15. ed Arlington; v.1. 117 p.
- BACKES, A. A, SANCHEZ, B. L. M., GONÇALVES, F. M. B., et al. 2000. Avaliação da degradabilidade ruminal “in situ” da matéria seca e proteína bruta de vários alimentos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 37, Viçosa, 2000. *Anais...* Minas Gerais: SBZ, 2000. p.336.
- BORCHERS, R. 1967. Proteolytic activity of rumen fluid *in vitro*. *J. Anim. Sci.* 24:1033-1038.
- BRODERICK, G. A. 1995. Methodology for the determining ruminal degradability of feed proteins In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE EXIGÊNCIAS NUTRICIONAIS DE RUMINANTES. Viçosa, MG 1995, *Anais...* Viçosa, 1995 139-176p.
- BRODERICK, G. A., CLAYTON, M. K 1992. Ruminal protein degradation rates estimated by nonlinear regression analysis of Michaelis-Menten *in vitro* data. *Br. J. Nutr.* 67:27-42.
- BRODERICK, G. A., WALLACE, R. J. 1988. Effects of dietary nitrogen source on concentrations of ammonia, free amino acids and fluorescamine reactive peptides in the sheep rumen. *J. Anim. Sci.* 66:2233-2238.
- BRODERICK, G. A. 1987. Determination of protein degradation rates using a rumen *in vitro* system containing inhibitors of microbial nitrogen metabolism. *British Journal of Nutrition* 58:463-475.
- BRODERICK, G. A., CRAIG, W. M. 1983. Mechanism of protein degradation by rumen microbes. *Fed. Proc.* 42:532 (Abstr.).
- BRODERICK, G. A. 1982. Estimation of protein degradation using *in situ* and *in vitro* methods. P 72-80 In F. N Owens (ed) Protein requirements for cattle: Symposium. Oklahoma State Univ., Stillwater.
- BRODERICK, G. A. 1978. *In vitro* procedures for estimating rates of ruminal protein degradation and proportions of protein escaping the rumen undegraded. *J. Nutrition.* 108:181-190.
- CRAIG, W. M., HONG, B. J., BRODERICK, G. A., BULA, R. J. 1984. *In vitro* inoculum enriched with particle-associated microorganisms for determining rates of fibre digestion and protein degradation. *J. Dairy. Sci.* 67:2902-2909.
- CHEN, G., SNIFFEN, C. J., RUSSELL, J. B. 1987. Concentration and estimated flow of peptides from the rumen of dairy cattle: Effects of protein quantity, protein solubility, and feeding frequency. *J. Dairy. Sci.* 70:983.
- ENGLAND, M. L., BRODERICK, G. A., SHAVER, R. D., COMBS, D. K. 1997. Comparison of *in situ* and *in vitro* techniques for measuring ruminal degradation of animal by-product proteins. *J. Dairy. Sci.* 80:2925-2931.
- FRANZOLIN, T. M. H., SILVEIRA, A. C., FRANZOLIN, R. 2000. Degradabilidade *in situ* com sacos de náilon, de dois tamanhos de poros, em bubalinos e bovinos sob dietas com níveis crescentes de fibra em detergente neutro. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 37, Viçosa, 2000. *Anais...* Viçosa: SBZ, 2000. p.377.
- GOES, B. T. H. R., TEIXEIRA, J. C., MANCIO, A. B., et al. 2000a. Degradação ruminal da matéria seca e proteína bruta de alguns alimentos em novilhos da raça

- nelore In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 37, Viçosa, 2000. *Anais...* Viçosa: SBZ, 2000. p.379.
- GOES, B. T. H.R., TEIXEIRA, J. C.; MANCIO, A. B., et al. 2000b. Digestão ruminal da matéria seca, proteína bruta e fibra em detergente neutro de diferentes volumosos em vacas nelore In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 37, Viçosa, 2000. *Anais...* Viçosa: SBZ, 2000. p.399.
- HRISTOV, A., BRODERICK, G. A. 1994. In vitro determination of ruminal protein degradability using ¹⁵N-ammonia to correct for microbial nitrogen uptake. *J. Anim. Sci.* 72:1344-1353.
- ÍTAVO, L. C. V, DA SILVA, F. F., CARDOSO, C. E., et al. 2000. Degradabilidade de fenos de gramíneas do gênero cynodon In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 37, Viçosa, 2000. *Anais...* Viçosa: SBZ, 2000. p.336
- KEADY, T. W., STEEN, R. W., KILPATRICK, D. J., MAYNE, C. S. 1994 Effects of inoculant treatment on silage fermentation, digestibility and intake by growing cattle. *Grass and Forage Science*, Oxford, A Younger, 49(3): 284-294. set. 1994.
- LADEIRA, M. M., RODRIGUEZ, M. N., GONÇALVES, L. C., et al. 2000. Avaliação nutricional do feno de stylosantes guianensis: 3 Degradabilidade ruminal e taxa de passagem. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 37, Viçosa, 2000. *Anais...* Viçosa: SBZ, 2000. p.349-350.
- LONDOÑO HERNÁNDEZ, F. I. 1995. Avaliação da técnica de saco de náilon móvel. Santa Maria, RS: UFSM, 1995, 127p. Dissertação (Mestrado em zootecnia)- Universidade Federal de Santa Maria, 1995.
- MALAFAIA, M. P. A. 1997. Taxas de digestão das frações protéicas e de carboidratos de alimentos por técnicas in situ, in vitro e de produção de gases. Viçosa, MG:UFV, 1997, 85p. Tese (Doutorado em Zootecnia)-Universidade Federal de Viçosa, 1997.
- MARTINS, S. A., ZEOULA, L. M., DO PRADO, I. N., et al. 1997 Degradabilidade in situ da matéria seca e proteína bruta de diferentes alimentos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 34, Juiz de Fora, 1997. *Anais...* Juiz de Fora: SBZ, 1997. p.79-81.
- MARTINS, S. A., ZEOULA, L. M., DO PRADO, I. N., et al. 1998. Degradação ruminal da matéria seca e proteína bruta de alguns alimentos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 35, Botucatu, 1998. *Anais...* São Paulo: SBZ, 1998. p.374-376.
- MARTÍNEZ, V. L. R. 1999. Composição química e degradabilidade in situ de volumosos e concentrados determinada em bubalinos e bovinos. Recife, PE, 1999, 59p. Dissertação (Mestrado em zootecnia)- Universidade Federal Rural de Pernambuco, 1999.
- McDONALD, I. W., HALL, R. J. 1957. *Biochemical Journal.* 67:400-405.
- MERTENS, D. R., LOFTEN, J. R. 1980. The effect of starch on forage fiber digestion in vitro. *J. Dairy. Sci.* 63(9):1437-1446.
- MERTENS, D. R. 1993. Rate and extent of digestion. Chap II. In: Forbes, J. M.; France, J. (eds) *Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism.* Commonwealth Agricultural Bureaux, Cambridge University Press, England. 1993, p.13-51.

- MILLER, E. L., 1982. Methods of assessing proteins for ruminants including laboratory methods *In* E. L. Miller Protein contribution of feedstuffs for ruminants pp 18-32 Butterwords, Boston.
- MORAIS, P. J. 1995. Avaliação do efeito de inoculante bacteriano sobre a qualidade de silagem e desempenho animal. Piracicaba, SP: ESALQ, 1995, 127p. Dissertação (Mestrado em Agronomia)- Universidade de São Paulo, 1995.
- NEUTZE, S.A., SMITH, R. L., FORBES, W. A.1993. Application of an inhibitor invitro method for estimating rumen degradation of feed protein. *Animal Feed Sci. and Technol.* 40:251-265.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC 1989. Nutrient requirements of dairy cattle. 6th revised edn (update 1989) Washington, D. C. National Academic Press. 157p.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. 2001. Nutrient requirements of dairy cattle. 7th revised ed. Washington, D. C. National Academic Press. 381p.
- OLIVEIRA, L. R.1998. Cinética digestiva em novilhos submetidos a dietas com diferentes níveis de cama de frango e de suplemento à base de microbiota ruminal. Viçosa, MG:UFV, 1998, 69p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)-Universidade Federal de Viçosa.
- OLIVEIRA, L. R., PEREIRA, J. C., SILVA, C. P. R. et al.1999. Degradabilidade ruminal da cama de frango e do feno de capim *Coast-cross* e avaliação de modelos matemáticos para estimativa da taxa de passagem de partículas. *R. Soc. Bras. Zootec.* 28(4):839-849.
- PINTO, A. A., LAVEZO, F. J., CECATO, U., et al. 1998. Degradabilidade in situ de cultivares do gênero *panicum maximum*. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 35, Botucatu, 1998. *Anais...* São Paulo: SBZ, 1998. p.38-40.
- RUSSELL, J. B., SNIFFEN, C. J., VAN SOEST, J. P.1983. Effect of carbohydrate limitation on degradation and utilization of casein by mixed rumen bacteria. *J. Dairy. Sci.* 66:763.
- SNIFFEN, C. J., O'CONNOR, J. D., VAN SOEST, P. J., FOX, D. G., RUSSELL:, J. B.1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. *J. Anim. Sci.* 70 (12):3562-3577.
- VALADARES FILHO, S. C. 1994. Utilização da técnica *in situ* para avaliação dos alimentos. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE PRODUÇÃO DE RUMINANTES. Maringá-PR. 1994, *Anais...*Maringá-PR SBZ,1994. P.95-118.
- VALADARES FILHO, S. C., SILVA, J. F. C., LEÃO, M. I.; et al. 1991. Degradabilidade in situ da matéria seca e proteína bruta de vários alimentos em vacas em lactação. *R. Soc.Bras. Zootec.* 19(6):512-522.
- VALADARES FILHO, S. C., SILVA, J. F. C., LEÃO, M. I. et al. 1990. Degradabilidade in situ da proteína bruta e matéria seca de alguns alimentos em vacas gestantes e lactantes. *R. Soc.Bras. Zootec.* 20(1):111-122.
- VAN SOEST, P. J. 1994. Nutritional ecology of the ruminant. New York: Cornell University press. 1994. p.278-279. 485p.
- WARNER. A. C. I.1956. Proteolysis by rumen microorganisms. *J. Gen. Microbiol.* 14:749-762.

Avaliação da Composição de Vários Alimentos e Determinação da Cinética Ruminal da Proteína, Utilizando o Método de Produção de Gás e Amônia *in vitro*

RESUMO - Realizaram-se determinações químicas e estudos sobre a cinética ruminal dos compostos nitrogenados de 24 alimentos concentrados e 10 volumosos utilizando as medições das concentrações de nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético e a produção de gás. Foram utilizados 200mL de líquido ruminal e 800mL do meio fermentador para a incubação de 100 tubos. Para 400mL do meio fermentador foi pesada 1,0 g de trypticase e adicionado 0,1mL de uma solução de microminerais. Para 200mL da solução tampão foram pesadas 0,8 g de bicarbonato de amônia e 7 g de bicarbonato de sódio e para preparar 200mL da solução macromineral foram pesadas 1,15 g de fosfato de sódio dibásico, 1,25 g de fosfato de potássio dibásico e 0,1 g de sulfato de magnésio. Foram preparados 100mL de solução redutora, pesando 0,64 g de cisteína-HCL, 0,64 g de sulfeto de sódio, adicionando 4mL de hidróxido de sódio 1N e água destilada. A degradação dos compostos nitrogenados dos alimentos foi determinada nos tempos 6 e 12h, incubando-se 1,875 mg de N com 0, 33, 67 e 100 mg de amido, 6mL do meio fermentador, 4mL da mistura líquido ruminal-meio fermentador e 0,1mL da solução redutora utilizando-se CO₂. As estimativas das taxas de degradação, nos tempos 6 e 12h, mostraram que: promil, caseína, grão moído de amendoim, raspa de mandioca, silagem de sorgo com e sem inóculo, silagem de milho e o capim-gordura apresentaram proteínas de rápida degradação. A mais lenta degradação foi observada para os alimentos: levedura de cana de açúcar, farinha de penas, farinha de peixe, cama de frango de cepilha de madeira e o capim-braquiária. As estimativas foram maiores do que as observadas previamente com o método de inibidores, para os alimentos volumosos. Recomenda-se utilizar o tempo de 12h para a avaliação dos concentrados e 6h para os volumosos.

Palavras-chave: cinética, compostos nitrogenados, produção de gás

Evaluation of Chemical Composition and Determination of Ruminant Protein Kinetics of Some Feedstuffs Using a Gas and Ammonia Production Method

ABSTRACT - Chemical determinations and kinetics studies of nitrogen compounds of twenty four concentrate feedstuffs and ten grasses were made using the concentrations of soluble nitrogen in TCA and gas production. 200mL of rumen fluid and 800mL of medium were used for 100 vessels. 1.0 g of trypticase and 0.1mL of macrominerals solution were used to prepare 400mL of medium. 0.8 g of ammonium bicarbonate were used to prepare 200mL of buffer solution and 7 g of sodium bicarbonate, for micromineral solution 1.15 g of Na₂HPO₄ anhydrous, 1.25 g of KH₂PO₄ anhydrous and 0.1 g of MgSO₄.7H₂O were weighted. Reducing solution was prepared with 0.64 g of cysteine-HCL, 0,64 g of sodium sulfide and 4 mL of 1N NaOH. The disappearance of nitrogen compounds of feedstuffs were determined at 6 and 12h, 1.875 mg of N was incubated with 0, 33, 67, 100 mg oh starch, 6mL of medium, 4mL of rumen fluid-medium mixture and 0,1mL of reducing solution using CO₂. The data of degradation rates indicated that promil, casein, dry grounded peanut grain, cassava rasp, sorghum silage with or without inoculum, corn silage and honey grass had the highest rates of protein degradation and the slowly degradation rates were obtained by sugar cane yeast, feather meal, fish meal, broiler litter using wood rind as adsorbent and signal grass. Estimatives of degradation rates of forage feedstuffs were higher than degradation rates estimated previously by an inhibitor method. It was recommended to use 12h for incubation of concentrate feedstuffs and 6h for grasses.

Key Words: gas production, kinetic, nitrogen compounds

Introdução

Uma das grandes vantagens do uso das técnicas *in vitro* reside na sua rapidez, na uniformidade de condições dentro do microambiente de fermentação e na conveniência de não se manter animais fistulados. Por outro lado, podem ser preditos mais rapidamente os padrões da fermentação e da degradação ruminal *in vivo*.

A maioria dos microrganismos ruminais não utiliza proteínas, lipídeos e ácidos graxos voláteis como fontes de energia para seu crescimento, sendo os carboidratos sua principal fonte de energia (NOCEK e RUSSELL, 1988). Os microrganismos que fermentam carboidratos estruturais (celulose, hemicelulose) apresentam lento crescimento e usam somente amônia como fonte de nitrogênio; já os microrganismos que utilizam carboidratos não-estruturais crescem mais rapidamente que os primeiros e podem utilizar amônia, peptídeos e aminoácidos como fonte de nitrogênio (N) para seu crescimento (RUSSELL et al., 1992).

Sabe-se que baixas taxas de crescimento microbiano podem reduzir a taxa de fermentação e o consumo em dietas baixas em energia (MAENG et al., 1975). De acordo com NOCEK e RUSSELL (1988), grandes quantidades de nitrogênio podem ser perdidas como amônia quando a fermentação dos carboidratos é menor que a da proteína, levando a uma redução da síntese de proteína microbiana.

RAAB et al. (1983) avaliaram a degradação da proteína através da produção de gases e da concentração de amônia durante um período de 24 horas, utilizando vários carboidratos como fonte de energia. Eles assumiram que ao utilizar carboidratos como fonte energética, a produção de gás torna-se uma medida da disponibilidade dessa energia para síntese de proteína, independentemente do tipo de carboidrato fermentado. Os autores não encontraram diferenças na produção de gás entre as diferentes fontes de carboidratos, sendo que, essa produção foi maior nas primeiras 12 horas, quando a fonte

de carboidratos foi o amido. Os resultados foram altamente correlacionados com os obtidos em estudos *in vivo*. Entretanto, de acordo com essa metodologia, o procedimento requer que a relação entre produção de gás e a concentração de N-NH₃ seja linear.

De acordo com BRODERICK (1995), a degradação protéica consiste na conversão da proteína dietética até amônia, com as bactérias atuando como os principais microrganismos envolvidos neste evento, seguidas de protozoários ciliados e uma pequena contribuição de fungos anaeróbicos. As determinações da degradação da proteína através da liberação de amônia tornam-se difíceis, devido ao fato de a degradação e a síntese da proteína microbiana serem processos que acontecem simultaneamente (CHAMBERLAIN e THOMAS, 1979). Por outro lado, existem evidências que mostraram peptídeos em elevadas concentrações no líquido ruminal *in vivo* (CHEN et al., 1987) e *in vitro* (BRODERICK e CRAIG, 1983; RUSSELL et al., 1983; BRODERICK e WALLACE, 1988).

Estudos realizados por KRISHNAMOORTHY et al. (1990), utilizando o método de Raab para avaliar a contribuição de aminoácidos e peptídeos nas estimativas da degradação da proteína, mostraram que ao avaliarem o pool de amônia só ou a soma de N-amino, N-peptídico e N-NH₃ não houve diferenças significativas entre os coeficientes de regressão obtidos para os alimentos avaliados.

Os objetivos deste trabalho foram estimar os parâmetros cinéticos da degradação da proteína em vários alimentos produzidos no Brasil por meio da técnica de produção de gás e a concentração de amônia *in vitro*.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido nas dependências do laboratório de Nutrição Animal, do Departamento de Zootecnia, da Universidade Federal de Viçosa. A dinâmica da degradação dos compostos nitrogenados foi avaliada pela incubação *in vitro* com a utilização do método de produção de gás. O método descrito por RAAB et al. (1983) foi modificado, utilizando as medições das concentrações de nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético e a produção de gás, em vez de análises de amônia. Foi utilizado como inóculo, líquido ruminal oriundo de bovino recebendo dieta com 60% de volumoso e 40% de concentrado.

Na incubação de 100 tubos de 50mL foram utilizados 200mL de líquido ruminal e 800mL do meio fermentador, sendo que, o meio fermentador foi preparado de acordo com o seguinte procedimento: para 400mL do meio fermentador foi pesada 1,0 g de trypticase e adicionado 0,1mL de uma solução de microminerais (pesar 8,0 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1,0 g de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10 g de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e 13,2 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ adicionando 100mL de H_2O destilada) elaborada de acordo com MENKE et al. (1979). Para preparar 200mL da solução tampão foram pesadas 0,8 g de bicarbonato de amônia e 7 g de bicarbonato de sódio e para preparar 200mL da solução macrominerais, foram pesadas 1,15 g de fosfato de sódio dibásico, 1,25 g de fosfato de potássio dibásico (KH_2PO_4) e 0,1 g de sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Também foram preparados 100mL de uma solução redutora, sendo pesados: 0,64 g de cisteína-HCL, 0,64 g de sulfeto de sódio ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$), adicionando 4 mL de hidróxido de sódio NaOH 1N e água destilada.

Após a retirada do líquido ruminal este foi filtrado, inicialmente em camada dupla de gaze e, na sala de incubação, em camada quádrupla. Aos 200mL do líquido ruminal foram adicionados 200mL do meio fermentador, infundindo-se CO_2 . Cada alimento foi

incubado nos tempos 6 e 12 horas, na quantidade de 1,875 mg de N, adicionando 0, 33, 67 e 100 mg de amido a cada tubo de incubação, além de, 6mL do meio fermentador, 4mL da mistura do líquido ruminal e do meio fermentador e 0,1mL da solução redutora, sempre sob aspersão com CO₂ para manter as condições anaeróbicas. Foram feitas medições do pH na mistura do líquido ruminal e meio fermentador e numa amostra dos tubos de incubação (frascos de 50 mL). Foram colocadas borrachas vedantes nos tubos e lacrados com tampas metálicas. As incubações foram realizadas na sala de incubação à 39°C, colocando os tubos em cima de uma mesa orbital com agitação de 38,6 rpm.

Após o vedamento dos tubos foi estimada a produção de gás através da medição da pressão, utilizando um voltímetro digital (FLUKE 8060A True RMS Multimeter acoplado à um conversor de 12v), sendo posteriormente adicionado 1,0mL de ácido tricloroacético (TCA) 55% e os frascos guardados em geladeira. Para descontar o volume de gás oriundo do líquido do rúmen e do meio fermentador, dois frascos para cada tempo de incubação foram incubados sem amostra (branco); dessa forma, para cada tempo de leitura, o volume de gás dos frascos com amostra foi subtraído do volume dos frascos sem amostra. Os tubos de 6 e 12 horas foram mantidos sob agitação na sala de incubação e após o período de incubação foi medida a produção de gás, colocado TCA na mesma proporção que para os tubos brancos e guardados em geladeira. Posteriormente todos os tubos (0, 6 e 12 h) foram centrifugados a 15.300g e 4°C durante 15 minutos e o sobrenadante foi conservado a 4°C até a realização das análises correspondentes.

Foi utilizado o método Kjeldahl (AOAC, 1990) para determinar o teor de nitrogênio dos seguintes alimentos: caseína, fubá de milho, milho desintegrado com palha e sabugo (MDPS), quirera de milho, glúten de milho, promil, grão de sorgo moído, grão de milheto moído, grão de amendoim moído, raspa de mandioca, polpa

cítrica, farelo de algodão contendo 30% de casca, farelo de soja, farelo de trigo, levedura de cana de açúcar. Foram também avaliadas as farinhas de peixe, de carne e ossos, de sangue, de penas, de vísceras de aves, mista de vísceras de aves e suínos, e as camas de frango contendo como material absorvente capim elefante, casca de café e cepilha de madeira.

Foram ainda avaliadas as silagens de milho (*Zea mays*) e de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) com ou sem inoculante microbiano, o capim-braquiária (*Brachiaria decumbens* cv. Basiliski) (2º ano) coletado no início das águas com idade de 45 dias, capim-braquiarião (*Brachiaria brizantha* (Hochst) Stapf) coletado no início da seca, capim-andropogon (*Andropogon gayanus* K) coletado no início das águas com 30 dias de rebrota, capim-gordura (*Melinis minutiflora* Beauv), capim-braquiária do brejo (*Brachiaria radicans* Napper), estilosantes guianensis (*Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw) cultivar mineirão coletado no início das águas e o feno de capim-tifton (*Cynodon dactylon*) com 5 semanas de idade.

Foram feitas determinações de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), matéria mineral (MM) e extrato etéreo (EE), seguindo os procedimentos do (AOAC, 1990), os carboidratos totais (CHT) foram calculados como $CHT (MS) = 100 - (\%PB + \%EE + \%MM)$, e carboidratos não fibrosos (CNF) obtidos pela fórmula $CNF = MO - (\%PB + \%EE + \%FDN_{cp})$, em que FDN_{cp} corresponde à fibra em detergente neutro isenta de cinzas e de proteínas (SNIFFEN et al., 1992). Foram determinadas, ainda, fibra em detergente neutro indigestível (FDN_I), fibra em detergente ácido indigestível (FDA_I) e lignina (VAN SOEST et al., 1991). O teor de fibra em detergente neutro indigestível (FDN_I) foi obtido por intermédio do resíduo indigestível, após 144 horas de incubação em líquido ruminal, o nitrogênio não protéico (NNP) determinado de acordo com LICITRA et al. (1996), a proteína insolúvel em detergente neutro

(PIDN) e em detergente ácido (PIDA) foi obtida pela multiplicação dos valores de NIDN e NIDA por 6,25. A composição bromatológica dos alimentos concentrados e volumosos encontra-se, respectivamente, nas Tabelas 1 e 2.

As amostras foram moídas em moinho de bola e incubadas em duplicata em três dias diferentes, utilizando a caseína como alimento padrão. Os cálculos da degradação da proteína dos alimentos avaliados foram realizados de acordo com as seguintes explicações:

Foram ajustadas equações de regressão linear simples entre as concentrações de nitrogênio N-solúvel em TCA (Y, mg/tubo) nos tubos contendo 0, 33, 67 e 100mg de amido dos diferentes alimentos incubados nos tempos 6 e 12 horas e sua produção de gás (X, mL/tubo). A conversão da voltagem em produção de gás foi realizada utilizando o fator "C" de 8,67 (PELL e SCHOFIELD, 1993). A intercepta b_0 representou a quantidade de N recuperado no momento em que não houve disponibilidade de carboidratos fermentáveis e conseqüentemente não houve síntese de proteína microbiana. A diferença entre o intercepto b_0 e a quantidade de N no branco representou a quantidade de N recuperado dos alimentos incubados: $N_{recuperado} = b_0 - N_{branco}$

Assim, as taxas de degradação foram calculadas através de:

$$Kd = \text{Ln} [1 - (b_0 - N_{branco})/N_{incubado}]/\text{tempo}$$

A proteína de escape foi calculada como: $Pe (\%) = [Kp/(Kd+Kp)]$, assumindo-se uma taxa de passagem de 0,05/h.

Os dados sobre as taxas de degradação para os tempos 6 e 12h dos diferentes alimentos foram comparados através do teste "t" para dados emparelhados, a 5% de probabilidade.

Tabela 1 - Teores de matéria seca (MS), matéria mineral (MM), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), carboidratos totais (CHT), carboidratos não fibrosos (CNF), fibra em detergente neutro (FDN), FDN corrigida para proteínas e cinzas (FDN_{cp}), FDN indigestível (FDNI), FDNI corrigida para proteína e cinzas (FDNI_{cp}), fibra em detergente ácido (FDA), lignina (Lig), celulose (Cel), proteína insolúvel em FDA (PIDA) e FDN (PIDN) e compostos nitrogenados não protéicos (NNP) obtidos para os alimentos concentrados

Alimentos	MS (%)	MM ¹	MO ¹	PB ¹	EE ¹	CHT ¹	CNF ¹	FDN ¹	FDN _{cp} ¹	FDNI ¹	FDNI _{cp} ¹	FDA ¹	Lig ¹	Cel ¹	PIDA ²	PIDN ²	NNP ²
Caseína	89,19	2,06	97,94	97,95	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18,42
Farelo de soja	87,77	8,56	91,44	46,81	1,62	43,01	30,73	15,57	12,28	0,00	0,00	8,31	1,10	7,03	2,55	5,92	20,76
Farelo de algodão 30% de casca	89,43	4,69	95,31	25,06	1,22	69,03	46,59	36,54	22,44	8,04	7,41	27,68	4,18	24,55	5,86	9,06	24,55
Glúten de milho	89,63	5,49	94,51	61,31	0,19	33,01	28,71	16,34	4,30	0,00	0,00	6,49	1,63	3,09	3,28	8,37	23,74
Fubá de milho	89,02	1,02	98,98	9,19	2,76	88,03	79,40	10,63	8,63	0,34	0,27	5,34	1,50	3,83	10,28	12,79	18,34
MDPS	87,00	1,55	98,45	7,90	2,15	88,30	61,59	31,51	26,71	2,86	2,70	14,22	1,17	12,96	14,76	16,20	16,42
Farelo de glúten de milho (Promil)	87,74	10,33	89,67	18,31	4,17	67,19	30,29	40,83	36,90	0,40	0,35	11,21	1,09	10,03	6,97	22,12	41,76
Quirera de milho	87,61	1,60	98,40	9,81	3,96	85,63	64,90	20,73	17,67	0,24	0,22	4,46	0,37	4,28	4,20	10,20	18,54
Grão de milheto moído	88,18	6,00	94,00	15,94	3,36	72,70	66,00	15,57	6,70	1,14	1,01	3,58	6,44	3,64	14,59	24,38	18,81
Grão de sorgo moído	87,17	1,89	98,11	9,44	3,09	85,08	67,62	24,11	16,07	0,009	0,008	4,43	0,36	4,36	18,67	21,84	23,20
Grão de amendoim moído	91,90	9,48	90,52	15,94	2,20	72,38	58,64	29,71	13,74	6,34	6,02	14,04	4,49	11,78	11,03	12,27	57,34
Raspa de mandioca	87,94	3,65	96,35	2,56	0,42	93,37	80,66	18,52	16,36	2,75	2,54	8,44	1,72	5,37	17,82	21,69	16,97
Polpa cítrica	85,5	7,18	92,82	6,48	2,34	84,00	49,35	40,98	34,65	0,60	0,56	15,62	4,43	21,53	11,70	20,46	19,37
Farelo de trigo	83,10	5,47	94,53	14,25	3,53	77,75	42,21	39,04	35,54	4,29	3,77	14,25	3,55	10,58	3,71	6,70	11,77
Farinha de peixe	92,00	32,05	67,95	57,13	9,87	0,95	0,00	6,12	5,18	4,63	2,57	6,10	0,62	3,45	0,77	1,47	1,15
Farinha de sangue	91,00	3,98	97,02	81,00	1,15	15,87	13,57	1,30	1,30	0,00	0,00	0,45	0,02	0,97	0,00	0,00	9,77
Farinha de carne e ossos	94,00	43,05	56,95	37,81	18,75	10,39	0,00	17,62	16,76	3,61	2,97	0,70	0,00	0,12	3,99	8,48	20,79
Farinha de penas	95,00	2,53	97,47	77,00	3,31	17,16	6,52	11,20	10,64	6,68	4,64	10,97	0,66	8,41	40,24	41,06	21,70
Farinha de vísceras de aves	93,46	17,60	82,4	54,13	11,59	16,68	0,00	12,00	11,18	3,73	3,05	2,12	0,61	2,03	0,83	3,81	18,48
Farinha mista de vísceras de aves e suínos	94,30	16,50	83,95	49,94	9,66	23,90	0,00	11,05	10,27	3,95	3,29	2,98	0,68	2,34	2,47	2,90	18,57
Levedura de cana de açúcar	90,00	5,79	94,21	34,19	4,03	55,99	36,61	25,51	19,38	0,13	0,11	0,62	0,01	0,94	4,23	14,12	38,90
Cama de frango de casca de café	88,35	12,93	87,07	15,13	1,85	70,09	28,64	47,85	41,45	5,80	5,33	24,74	1,80	16,63	14,28	18,56	15,59
Cama de frango de capim	85,29	15,04	84,96	14,50	1,29	79,17	31,47	52,78	47,70	5,74	5,42	29,60	3,72	25,11	7,19	34,78	38,86
Cama de frango de cepilha de madeira	84,65	12,05	87,95	15,31	0,83	72,21	22,20	58,47	50,01	11,74	11,01	32,08	6,69	26,97	10,70	46,02	13,66

¹% na MS; ²% da PB

Tabela 2 - Teores de matéria seca (MS), matéria mineral (MM), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), carboidratos totais (CHT), carboidratos não fibrosos (CNF), fibra em detergente neutro (FDN), FDN corrigida para proteínas e cinzas (FDN_{cp}), FDN indigestível (FDNI), FDNI corrigida para proteína e cinzas (FDNI_{cp}), fibra em detergente ácido (FDA), lignina (Lig), celulose (Cel), proteína insolúvel em FDA (PIDA) e FDN (PIDN) e compostos nitrogenados não protéicos (NNP) obtidos para os alimentos volumosos

Alimentos	MS (%)	MM ¹	MO ¹	PB ¹	EE ¹	CHT ¹	CNF ¹	FDN ¹	FDN _{cp} ¹	FDNI ¹	FDNI _{cp} ¹	FDA ¹	Lig ¹	Cel ¹	PIDA ²	PIDN ²	NNP ²
Capim-braquiária	30,40	4,87	95,13	6,55	1,34	84,24	13,16	73,82	71,59	8,00	7,47	35,25	1,17	31,37	4,53	11,00	28,51
Capim-braquiaraço	41,95	6,74	93,26	6,01	0,76	86,69	9,89	80,40	76,80	21,59	20,70	44,28	6,81	36,30	6,39	11,57	49,13
Capim-braquiária do brejo	26,35	3,50	96,50	7,35	0,65	88,20	31,05	67,23	57,15	17,75	16,18	33,58	3,24	30,21	11,11	21,11	25,47
Capim-gordura	27,72	3,80	96,20	7,15	1,09	88,16	28,41	64,52	59,75	3,07	2,44	29,53	2,26	27,17	12,92	15,81	58,63
Silagem milho	29,64	4,50	95,50	7,64	3,79	82,67	25,72	59,17	56,95	12,74	11,73	33,93	5,35	27,28	9,93	14,79	48,67
Silagem Milho com Inóculo	28,89	4,01	95,99	8,61	3,49	83,69	33,07	52,28	50,62	6,13	5,81	24,88	5,29	22,37	6,31	11,62	51,46
Silagem Sorgo	26,35	4,73	95,27	6,25	2,19	86,83	30,02	59,89	56,81	30,19	22,07	27,71	4,32	22,46	39,40	40,97	13,28
Silagem Sorgo com Inóculo	23,98	5,54	94,46	5,82	2,16	86,28	27,03	61,82	59,25	10,12	9,57	28,99	4,18	23,72	35,57	37,88	23,72
Feno de capim-tifton	88,19	4,65	95,35	19,06	1,35	74,94	8,08	70,38	66,86	14,76	14,70	35,15	3,92	29,67	2,24	30,49	29,63
Estilosantes guianensis	31,00	5,78	94,22	14,83	2,89	74,50	26,36	54,66	53,92	14,76	13,97	32,05	6,11	25,96	4,82	5,65	17,74

¹% na MS; ²% da PB

Resultados e Discussão

As estimativas das concentrações de N-solúvel em TCA (y) em função da produção de gás (x) obtidas após 12h de incubação para alimentos concentrados são mostradas na Tabela 3. Os interceptos foram bastante variados entre os alimentos avaliados, indicando diferenças nas degradabilidades.

Tabela 3 – Estimativas das concentrações de N-solúvel em TCA (y) em função da produção de gás (x) obtidas após 12h de incubação para os alimentos concentrados

Alimentos	Equações de regressão	r ²
Caseína	$\hat{y} = 5,445 - 0,130x$	0,93
Farelo de soja	$\hat{y} = 4,704 - 0,106x$	0,92
Farelo de algodão 30% casca	$\hat{y} = 4,619 - 0,114x$	0,99
Glúten de milho	$\hat{y} = 3,480 - 0,078x$	0,93
Fubá de milho	$\hat{y} = 4,923 - 0,128x$	0,94
MDPS	$\hat{y} = 2,100 - 0,033x$	0,96
Promil	$\hat{y} = 5,639 - 0,150x$	0,92
Quirera de milho	$\hat{y} = 4,910 - 0,138x$	0,90
Grão de milheto moído	$\hat{y} = 3,875 - 0,072x$	0,96
Grão de sorgo moído	$\hat{y} = 3,826 - 0,095x$	0,98
Grão de amendoim moído	$\hat{y} = 5,601 - 0,118x$	0,92
Raspa de mandioca	$\hat{y} = 5,662 - 0,168x$	0,91
Polpa cítrica	$\hat{y} = 4,824 - 0,117x$	0,95
Farelo de trigo	$\hat{y} = 5,047 - 0,112x$	0,98
Farinha de peixe	$\hat{y} = 4,219 - 0,114x$	0,96
Farinha de sangue	$\hat{y} = 4,802 - 0,103x$	0,96
Farinha de carne e ossos	$\hat{y} = 4,433 - 0,104x$	0,91
Farinha de sangue	$\hat{y} = 4,802 - 0,103x$	0,96
Farinha de penas	$\hat{y} = 4,201 - 0,132x$	0,98
Farinha de vísceras de aves	$\hat{y} = 4,748 - 0,135x$	0,98
Farinha mista aves e suínos	$\hat{y} = 4,630 - 0,163x$	0,94
Levedura de cana de açúcar	$\hat{y} = 4,208 - 0,087x$	0,97
Cama de frango de casca de café	$\hat{y} = 5,494 - 0,098x$	0,98
Cama de frango de capim-elefante	$\hat{y} = 4,569 - 0,085x$	0,98
Cama de frango de cepilha de madeira	$\hat{y} = 4,388 - 0,096x$	0,92

\hat{y} = mg/tubo

x = mL/tubo

Tabela 4 – Estimativas das concentrações de N-solúvel em TCA (Y) em função da produção de gás (X) obtidas após 6h de incubação para os alimentos volumosos

Alimentos	Equações de regressão	r ²
Capim-braquiária	$\hat{y} = 3,77 - 0,24x$	0,97
Capim-braquiarião	$\hat{y} = 3,98 - 0,42x$	0,99
Capim-braquiária do brejo	$\hat{y} = 3,99 - 0,14x$	0,97
Capim-Andropogon	$\hat{y} = 4,14 - 0,41x$	0,98
Capim-gordura	$\hat{y} = 4,17 - 0,25x$	0,99
Silagem milho	$\hat{y} = 4,33 - 0,29x$	0,97
Silagem milho inoculado	$\hat{y} = 4,06 - 0,17x$	0,99
Silagem sorgo	$\hat{y} = 4,59 - 0,45x$	0,91
Silagem sorgo inoculado	$\hat{y} = 4,49 - 0,20x$	0,95
Feno capim-tifton	$\hat{y} = 3,79 - 0,14x$	0,98
Estilosantes guianensis	$\hat{y} = 4,14 - 0,54x$	0,97

\hat{y} = mg/tubo
 x = mL/tubo

Foram observados interceptos próximos entre grupos de alimentos: farelo de soja (4,70) e farinha visceras de aves (4,74); caseína (5,44) e cama de frango contendo casca de café como material absorvente (5,49); fubá de milho (4,92) e quirera de milho (4,91) e entre promil (5,63), raspa de mandioca (5,66) e grão de amendoim moído (5,60), indicando que esses alimentos apresentaram degradabilidades semelhantes.

Foi encontrada também uma relação linear entre a produção de gás e a concentração de Nsolúvel em TCA para os volumosos avaliados, após 6 horas de incubação. Os interceptos foram diferentes para os volumosos avaliados, sendo esse valor maior para a silagem de sorgo (4,59) e menor para o capim-braquiária e o feno de capim-tifton, 3,77 e 3,79, respectivamente. Já os coeficientes da regressão foram semelhantes entre capim-braquiária do brejo, silagem de milho inoculado e feno de capim-tifton e próximos à 0,1. Também foram encontrados coeficientes semelhantes entre capim-braquiária, capim-gordura, silagem de milho e silagem de sorgo inoculado, 0,24, 0,25, 0,29, e 0,20, respectivamente, e o maior coeficiente foi encontrado para o estilosantes guianensis.

RUSSELL et al. (1983) demonstraram que a concentração de amônia foi inversamente proporcional à taxa de fermentação de carboidratos. Por outro lado, de acordo com MILLER (1982), a concentração de amônia é influenciada também pela quantidade de carboidratos fermentados.

Na Figura 2 é mostrada a relação entre a concentração de nitrogênio solúvel em TCA (y) e a concentração de amido para a caseína após 12h de incubação.

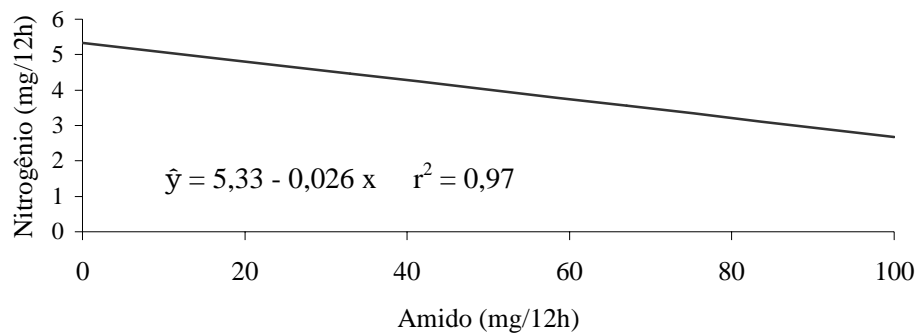


Figura 2 - Relação entre a concentração de N-solúvel (y) da caseína e a quantidade de amido (x) obtida após 12h de incubação

Os resultados apresentaram linearidade entre a concentração de nitrogênio solúvel em TCA e a quantidade de amido, assim como entre a concentração de N-NH₃ e a produção de gás. O coeficiente de regressão da caseína foi de 0,026, ou seja, 0,026 mg de nitrogênio foi consumido/mg de amido adicionado, sendo esse valor próximo ao obtido na pesquisa de RAAB et al. (1983) de 0,023 avaliando a degradabilidade *in vitro* da caseína utilizando até 200mg de amido e 24 horas de incubação.

As taxas de degradação da proteína (Kd) e a proteína de escape dos alimentos concentrados obtidas com 6 e 12h de incubação estão apresentadas na Tabela 5

Tabela 5 – Estimativas das taxas de degradação da proteína dos alimentos concentrados (Kd), desvios padrão (dp) e proteína de escape (PE) obtidas com 6 e 12h de incubação, utilizando o método de produção de gás

Alimentos	6 h			12 h			d
	Kd	dp	PE	Kd	dp	PE	
Caseína	0,242	0,0012	17,12	0,230	0,0006	17,85	0,0607*
Farelo de soja	0,384	0,0006	43,40	0,154	0,0006	24,50	0,2300*
Farelo de algodão 30% casca	0,236	0,0091	17,48	0,073	0,0006	40,65	0,1630*
Glúten de milho	0,102	0,0096	32,89	0,002	0,0000	96,15	0,0380*
Fubá de milho	0,116	0,0003	30,12	0,109	0,0006	31,44	0,0070*
MDPS	0,221	0,0010	18,45	0,055	0,0006	47,62	0,1656*
Promil	0,382	0,0006	11,57	0,225	0,0038	18,18	0,1570*
Quirera de milho	0,141	0,0007	26,17	0,111	0,0072	31,05	0,0300*
Grão de milheto moído	0,144	0,0029	25,77	0,013	0,0000	79,36	0,1310*
Grão de sorgo moído	0,155	0,0010	24,39	0,013	0,0006	79,36	0,1406*
Grão de amendoim moído	0,230	0,0012	17,85	0,203	0,0006	19,76	0,0270*
Raspa de mandioca	0,248	0,0010	16,77	0,245	0,0015	16,95	0,0026*
Polpa cítrica	0,294	0,0050	14,53	0,057	0,0057	46,73	0,2370*
Farelo de trigo	0,203	0,0038	19,76	0,137	0,0012	26,73	0,0656*
Farinha de peixe	0,084	0,0010	37,31	0,038	0,044	56,82	0,0460*
Farinha de sangue	0,128	0,0006	28,08	0,094	0,0023	34,72	0,0347*
Farinha de carne e ossos	0,185	0,0015	21,27	0,054	0,0040	48,07	0,1310*
Farinha de penas	0,033	0,0046	60,24	0,015	0,0010	76,92	0,0180*
Farinha vísceras de aves	0,122	0,0015	29,06	0,050	0,0012	50,00	0,0720*
Farinha mista de vísceras de aves e suínos	0,054	0,0045	48,07	0,041	0,0021	54,94	0,0130*
Levedura de cana de açúcar	0,040	0,0001	55,55	0,033	0,0002	60,24	0,0069*
Cama de frango de casca de café	0,231	0,0060	17,79	0,162	0,017	23,58	0,0680*
Cama de frango de capim-elefante	0,448	0,0180	10,04	0,037	0,0010	57,47	0,4110*
Cama de frango de cepilha de madeira	0,039	0,0030	56,18	0,025	0,0038	66,66	0,0137*

*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste de t.
d = $\Sigma di/n$ médias das diferenças

Ao comparar as taxas de degradação pelo teste "t" nos 2 tempos de incubação (6 e 12h) para os alimentos concentrados, foram encontradas diferenças significativas ($P < 0,05$).

As estimativas das taxas de degradação, nos tempos 6 e 12h, mostraram que os alimentos promil, caseína, grão de amendoim moído e raspa de mandioca apresentaram

proteínas de rápida degradação e que a mais lenta degradação foi observada para os alimentos levedura de cana de açúcar, farinha de penas, farinha de peixe e cama de frango contendo como material absorvente cepilha de madeira.

As estimativas médias das taxas de degradação do farelo de algodão com 30% de casca, após 12h de incubação, foram semelhantes às obtidas por NEUTZE et al. (1993) de 0,086/h, utilizando a técnica *In situ*. Já para o farelo de soja NEUTZE et al. (1993), VAN DER AAR et al. (1984) e ZINN et al. (1981), encontraram taxas de degradação semelhantes às encontradas nesta pesquisa. Com relação a proteína de escape do farelo de soja os resultados foram semelhantes aos relatados por STERN et al. (1994) e COZZI et al. (1995), respectivamente, 22 e 25,70%. O farelo de algodão com 30% de casca apresentou 1,35 vezes mais proteína indigerível (PIDA) que o farelo de trigo e 1,53 vezes mais do que o farelo de soja (Tabela 1), provavelmente devido à maior concentração de nitrogênio (N) associado à fibra, que neste alimento é considerável. No que diz respeito às características cinéticas, observou-se que o farelo de soja apresentou uma taxa de degradação 52% maior que à do farelo de algodão com 30% de casca e 11% maior que à do farelo de trigo. Taxas de degradação para farelo de trigo semelhantes às encontradas neste trabalho foram relatadas por NOCEK et al. (1979), HERRERA-SALDANA et al. (1986) e EHLE et al. (1982), respectivamente 0,121, 0,127 e 0,135/h .

No que diz respeito ao milho e seus derivados (fubá e quirera) que apresentaram teores de proteína semelhantes (Tabela 1), observou-se que a concentração de carboidratos totais foi próxima entre esses alimentos, entretanto, o fubá de milho apresentou uma concentração de carboidratos não fibrosos 14,40% maior que a quirera de milho e 31,25% maior que o MDPS. Já a concentração de FDN corrigida e FDN indigestível corrigida foi maior para o MDPS, 26,71% e 2,70%, quando comparado ao

fubá de milho e quirera de milho 8,63%, 0,27% e 17,67%, 0,22%, respectivamente. As taxas de degradação obtidas com 12h de incubação para o fubá de milho e a quirera de milho foram semelhantes, 0,109/h e 0,111/h, entretanto, o MDPS apresentou uma taxa de degradação muito lenta 0,055/h. Segundo MERTENS (1989), o FDN representa os constituintes de baixa degradação dos alimentos. ZERBINI e POLAN (1985), avaliando a degradabilidade ruminal da proteína através da técnica *in situ*, encontraram uma taxa de degradação do fubá de milho de 0,114/h semelhante à reportada neste trabalho.

No caso dos grãos moídos de milheto, sorgo e amendoim a concentração de carboidratos não fibrosos foi de 66, 69,01 e 51,61%. Essas concentrações poderiam, em parte, explicar a semelhança entre as taxas de degradação do sorgo e milheto. Por outro lado, de acordo com OLIVEIRA et al. (1992, 1993), os grãos de sorgo contém amido resistente à fermentação ruminal, diminuindo a degradabilidade ruminal da proteína.

As farinhas de vísceras de aves e mista de vísceras de aves e suínos apresentaram um elevado teor de proteína (Tabela 1), já a porcentagem de PIDA foi de 2,47% para a farinha mista de vísceras de aves e suínos e de 0,83% para a farinha de vísceras de aves. De acordo com GOERING e VAN SOEST (1970) e PICHARD e VAN SOEST (1977) essas fontes nitrogenadas no seu processo de fabricação formam compostos resistentes à ação dos microrganismos ruminais, sendo o PIDA a melhor forma de representar esses compostos. Os dados sobre a cinética ruminal para esses alimentos mostraram que a farinha mista de vísceras de aves e suínos apresentou uma menor taxa de degradação quando comparada com a farinha de vísceras de aves, respectivamente, 0,054, 0,041 e 0,122 , 0,050h⁻¹ para 6 e 12h.

BLASI et al. (1991) relataram que o processamento da farinha de penas influenciou na baixa degradabilidade ruminal desse alimento, devido a presença de ligações dissulfídicas. ADERIBIGBE e CHURCH (1983) encontraram uma taxa de

degradação de 0,013 para a farinha de penas, sendo esses resultados semelhantes aos reportados nesta pesquisa. MAIGA et al. (1996) avaliando a degradabilidade ruminal da proteína através da técnica *in situ* relataram taxas de degradação semelhantes às encontradas no presente trabalho para o glúten de milho e a farinha de carne e ossos. Os valores para a proteína de escape da farinha de carne e ossos (76,92) resultaram semelhantes aos relatados de 71% pelo NRC (1989).

LOERCH et al. (1983) encontraram, *in situ*, uma taxa de degradação de 0,066 para a farinha de sangue, resultados próximos aos observados neste experimento.

MUSTAFA et al. (1999), avaliando as taxas de degradação dos farelos de trigo e de soja, utilizando o método enzimático, encontraram valores semelhantes aos encontrados no presente estudo. VALADARES FILHO (1994) relataram taxas de degradação obtidas *in situ* de 0,133 para farelo de trigo e 0,049 para farinha de peixe, sendo esses resultados próximos aos encontrados no presente trabalho. Vale ressaltar que as estimativas para a proteína de escape do farelo de trigo e da farinha de peixe, obtidas após 12h de incubação foram próximas daquelas publicadas pelo NRC (1989). Uma análise geral dos dados apresentados na Tabela 5 sugere que as taxas de degradação e os percentuais de escape foram superestimados para 6 horas de incubação. Assim, deve-se ressaltar que para alimentos concentrados, o melhor tempo de incubação foi de 12h.

Tabela 6 – Estimativas das taxas de degradação da proteína dos alimentos volumosos (Kd), desvios padrão (dp) e proteína de escape (PE) obtidas com 6 e 12h de incubação, utilizando o método de produção de gás

Alimentos	6 h			12 h			
	Kd	dp	PE	Kd	dp	PE	d
Capim-braquiária	0,043	0,0001	53,76	0,042	0,0002	54,34	0,001 ^{NS}
Capim-braquiarão	0,071	0,0035	41,32	0,003	0,0000	94,33	0,0684*
Capim-braquiária do brejo	0,072	0,0020	40,98	0,016	0,0000	75,75	0,0560*
Capim-Andropogon	0,094	0,0044	34,72	0,003	0,0000	94,33	0,0910*
Capim-gordura	0,098	0,0006	33,78	0,024	0,0006	67,56	0,0730*
Silagem milho	0,126	0,0021	28,40	0,030	0,0006	62,50	0,0950*
Silagem milho inoculado	0,082	0,0000	37,87	0,080	0,0001	38,46	0,002 ^{NS}
Silagem sorgo	0,187	0,0006	21,09	0,164	0,0010	23,36	0,0230*
Silagem sorgo inoculado	0,159	0,0042	23,92	0,077	0,0021	39,37	0,0820*
Feno capim-tifton	0,046	0,0006	52,08	0,031	0,0000	61,73	0,0148*
Estilosantes guianensis	0,094	0,0029	34,72	0,013	0,0006	79,36	0,0801*

*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste de t

d = $\Sigma di/n$ médias das diferenças

NS - Não significativo

Avaliando as taxas de degradação dos volumosos (Tabela 6), no tempo 6h, observa-se que as silagens de sorgo sem e com inóculo, silagem de milho e o capim-gordura apresentaram proteínas de rápida degradação e que a mais lenta degradação foi encontrada para o capim-braquiária. Por outro lado, a maior proteína de escape, após 6 horas de incubação, foi encontrada nos capins braquiária e tifton, respectivamente 53,76 e 52,08% e a menor na silagem de sorgo sem inóculo, de 21,09%.

Com exceção das taxas de degradação encontradas para o capim-braquiária e a silagem de milho com inóculo, os valores obtidos com 6h de incubação foram maiores ($P < 0,05$) que os de 12h de incubação.

O capim-braquiarão coletado no início das secas apresentou uma redução da porcentagem de proteína bruta em 8%, dos carboidratos não fibrosos em 14% e ligeiro aumento dos carboidratos totais e da proteína indigestível em detergente ácido (PIDA) e teve a concentração de nitrogênio não protéico 41,97% maior que o capim-braquiária (Tabela 1). Essas diferenças na composição química, podem explicar a maior taxa de

degradação encontrada para o capim-braquiarião. MARTINEZ (1999) avaliando a degradabilidade ruminal de vários volumosos *in situ*, relataram uma taxa de degradação de 0,069/h para o capim-braquiarião, sendo esse resultado próximo ao encontrado no presente trabalho.

Foram encontradas taxas de degradação e proteínas de escape próximas para os capins andropogon e gordura e para o estilosantes, respectivamente 0,094, 0,098 e 0,094/h. LADEIRA et al. (2000) encontraram uma taxa de degradação (0,096/h) semelhante à encontrada na presente pesquisa para o estilosantes após 6h de incubação.

Com relação as estimativas da degradação das silagens de milho e sorgo, após 6h de incubação, observou-se que a inoculação das silagens diminuiu as taxas de degradação, 35 e 15%, respectivamente. Esses resultados mostraram que o método de produção de gás foi eficiente na determinação do efeito do inoculante microbiano na degradação ruminal desses alimentos. As estimativas da proteína não degradada no rúmen da silagem de milho, após 6h de incubação foi de 28,40%. Esses resultados foram próximos aos relatados pelo NRC (1989), de 31%.

As estimativas médias das taxas de degradação para os volumosos, após 6h de incubação, foram maiores que as encontradas por LONDOÑO HERNÁNDEZ et al. (primeiro artigo) para os seguintes volumosos: silagem de sorgo e milho com e sem inóculo e os capins braquiária do brejo e gordura, utilizando o método de inibidores *in vitro*.

Conclusões

As taxas de degradação foram maiores que as observadas com o método de inibidores. Recomenda-se usar o tempo de 12h para avaliar os alimentos concentrados e 6h para os volumosos.

Referências Bibliográficas

- ADERIBIGBE, A. O., CHURCH, D. C. 1983. Feather and hair meals for ruminants. III. Relationship between enzymatic or in vitro rumen digestibility and in vivo digestibility of diets containing feather and hair meals. *J. Anim. Sci.* 57(2):483-494.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS- AOAC, 1990. *Official methods of analysis*. 15. ed Arlington; v.1. 117 p.
- BLASI, D. A., KLOPFENSTEIN, T. J. DROUILLARD, J. S. et al. 1991. Hydrolysis time as a factor affecting the nutritive value of feather meal and feather meal-blood meal combinations for growing calves. *J. Anim. Sci.* 69:1272.
- BRODERICK, G. A. 1995. *Methodology for the determining ruminal degradability of feedproteins* In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE EXIGÊNCIAS NUTRICIONAIS DE RUMINANTES., Viçosa, MG 1995, *Anais...* Viçosa, 1995 139-176p.
- BRODERICK, G. A., WALLACE, R. J. 1988. Effects of dietary nitrogen source on concentrations of ammonia, free amino acids and fluorescamine reactive peptides in the sheep rumen. *J. Anim. Sci.* 66:2233-2238.
- BRODERICK, G. A., CRAIG, W. M. 1983. Mechanism of protein degradation by rumen microbes. *Fed. Proc.* 42:532 (Abstr.).
- CHAMBERLAIN, D. G., THOMAS, P. C. 1979. Prospective laboratory methods for estimating the susceptibility of feed proteins to microbial breakdown in the rumen. *Proc. Nutr. Soc.* 38:138A.
- CHEN, G., SNIFFEN, C. J., RUSSELL, J. B. 1987. Concentration and estimated flow of peptides from the rumen of dairy cattle: Effects of protein quantity, protein solubility, and feeding frequency. *J Dairy. Sci.* 70:983-992.
- COZZI, G., ANDRIOGHETTO, I., BERZAGHI, P, et al. 1995. In situ ruminal disappearance of essential amino acids in protein feedstuffs. *J. Dairy. Sci.* 78:161.
- EHLE, F. R., MURPHY, M. R., CLARK, J. H. 1982. In situ particle size reduction and the effect of particle size on degradation of crude protein and dry matter in the rumen of dairy cows. *J. Dairy. Sci.* 65(6):963-971.
- GOERING, H. K., VAN SOEST, P. J 1970. Forage fiber analyses (apparatus, reagents, procedures, and some applications) *Agric. Handbook 379*, ARS-USDA, Washington, DC.
- HATFIELD, R. D. 1989. *Structural polysaccharides in forages and their degradability.* *Agron. J.* 81:39-46.
- HERRERA-SALDANA, R., HUBER, J. T., SWINGLE, R. S. 1986. Protein and starch solubility and degradability of several common feedstuffs. *J. Dairy. Sci.* 69(Suppl.1):141. (Abstr).
- KRISHNAMOORTHY, U., STEINGASS, H., MENKE, K. H. 1990. The contribution of ammonia, amino acids and short peptides to estimates of protein degradability in vitro. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 63:135-141.
- LADEIRA, M. M., RODRIGUEZ, M. N., GONÇALVES, L. C., et al. 2000. Avaliação nutricional do feno de *stylosantes guianensis*: 3 Degradabilidade ruminal e taxa de passagem. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 37, Viçosa, 2000. *Anais...* Viçosa:SBZ, 2000. p349-350.
- LICITRA, G., HERNANDEZ, T. M., VAN SOEST, P. J. 1996. Standartization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 57:347-358.

- LOERCH, S. C., BERGER, L. L., GIANOLA, D., FAHEY, G. C. 1983. Effects of dietary protein source and energy level on in situ nitrogen disappearance of various protein sources. *J. Anim. Sci.* 56(1):206-216.
- MAENG, W. J., VAN NEVEL, C. J., BALDWIN, R. L., et al. 1975. Rumen microbial growth rates and yields: Effect of amino acids and protein. *J. Dairy. Sci.* 59(1):68-79.
- MAIGA, H. A., SCHINGOETHE, J. D., HENSON, J. E. 1996. Ruminal degradation, amino acid composition, and intestinal digestibility of the residual components of five protein supplements. *J. Dairy. Sci.* 79:1647-1653.
- MARTÍNEZ, V. L. R. 1999. Composição química e degradabilidade in situ de volumosos e concentrados determinada em bubalinos e bovinos. Recife, PE, 1999, 59p. Dissertação (Mestrado em zootecnia)- Universidade Federal Rural de Pernambuco, 1999.
- MENKE, K. H., RAAB, L. B., SALEWSKI, A., et al. 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminal feeding stuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. *J. Agric. Sci. (Camb.)*. 93:217.
- MERTENS, D. R. 1989. *Fiber analysis and its use in ration formulation*. In: ANNUAL PACIFIC NORTHWEST ANIMAL NUTRITION CONFERENCE, 24, Idaho. *Proceedings...*, Idaho:Riverside Boise, 1989. p.1-10.
- MILLER, E. L., 1982. Methods of assessing proteins for ruminants including laboratory methods In: PROTEIN CONTRIBUTION OF FEEDSTUFFS FOR RUMINANTS ed. Miller, E. L. pp 18-32 Butterwords, Boston.
- MUSTAFA, A. F., McKINNON, J. J., CHRISTENSEN, D. A. 1999. Chemical characterization and in vitro crude protein degradability of thin stillage derived from barley and wheat-based ethanol production. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 80:247-256.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. 1989. Nutrient requirements of dairy cattle. 6th revised edn (update 1989) National Academy Press, Washington, DC. 157p.
- NEUTZE, S.A., SMITH, R. L., FORBES, W. A. 1993. Application of an inhibitor in vitro method for estimating rumen degradation of feed protein. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 40:251-265.
- NOCEK, J. E., RUSSELL, J. B. 1988. Protein and energy as an integrated system. Relationship of ruminal protein and carbohydrate availability to microbial synthesis and milk production. *J. Dairy. Sci.* 71:2070-2107.
- NOCEK, J. E., CUMMINS, K. A., POLAN, C. E. 1979. Ruminal disappearance of crude protein and dry matter in feeds and combined effects in formulated rations. *J. Dairy. Sci.* 62:1587-1598.
- OLIVEIRA, J. S., HUBER, J. T., BEN-GHEDALIA, D., et al. 1993. Influence of sorghum grain processing on performance of lactating dairy cows. *J. Dairy. Sci.* 76:575.
- OLIVEIRA, J. S., HUBER, J. T. THEURER, C. B., et al. 1992. Effect of sorghum grain processing on site and extent of starch digestion in lactating dairy cows. *J. Dairy. Sci.* 75 (Suppl.1):296 (Abstr.).
- PELL, A. N., SCHOFIELD, P. 1993. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion in vitro. *J. Dairy. Sci.* 76:1063-1073.
- PICHARD, G. R., VAN SOEST, P. J. 1977. *Proceedings of the Cornell Nutrition Conference for feed manufactures*. p91.

- RAAB, L. B., CAFANTARIS, T. J., MENKE, K. H. 1983. Rumen protein degradation and biosynthesis. 1. A new method for determination of protein degradation in rumen fluid in vitro. *Br. J. Nutr.* 50:569.
- RUSSELL, J. B., SNIFFEN, C. J., VAN SOEST, J. P. 1983. Effect of carbohydrate limitation on degradation and utilization of casein by mixed rumen bacteria. *J. Dairy. Sci.* 66:763.
- RUSSELL, J. B., O'CONNOR, J. D., FOX, D. G., et al. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminal fermentation. *J. Anim. Sci.* 70:3551-3561.
- SNIFFEN, C. J., O'CONNOR, J. D., VAN SOEST, P. J., FOX, D. G., RUSSELL, J. B. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. *J. Anim. Sci.* 70 (12):3562-3577.
- STERN, M. D., VARGA, G. A., CLARK, J. H., FIRKINS, J. L., et al. 1994. Symposium: Metabolic relationships in supply of nutrients for milk protein synthesis. Evaluation of chemical and physical properties of feeds that affect protein metabolism in the rumen. *J. Dairy. Sci.* 77:2762-2786.
- VALADARES FILHO, S. C. 1994. Utilização da técnica *in situ* para avaliação dos alimentos. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE PRODUÇÃO DE RUMINANTES. Maringá-PR. 1994, *Anais...Maringá-PR SBZ*, 1994. P.95-118.
- VAN DER AAR, P. J., BERGER, L. L., FAHET, G. C., et al. 1984. Effect of alcohol treatments of soybean meal on ruminal escape of soybean meal protein. *J. Anim. Sci.* 59:483.
- VAN SOEST, P. J., ROBERTSON, J. B., LEWIS, B. A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy. Sci.* 74(10):3583-3597.
- ZERBINI, E., POLAN, C. E. 1985. Protein sources evaluated for ruminating holstein calves. *J. Dairy. Sci.* 68:1416-1424.
- ZINN, R. A., BULL, L. S., HEMKEN, R. W. 1981. Degradation of supplemental proteins in the rumen. *J. Anim. Sci.* 52(4):857-866.

Avaliação de Dois Métodos *in vitro* para Determinar a Cinética Ruminal e a Digestibilidade Intestinal da Proteína de Vários Alimentos

RESUMO - Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a degradabilidade ruminal e a digestibilidade intestinal dos compostos nitrogenados de 19 alimentos concentrados, 6 rações comerciais e 4 alimentos volumosos, utilizando o método de inibidores com digestão intestinal em HCL-pepsina-pancreatina e o método de três estágios. No método dos inibidores cada alimento foi incubado nos tempos 0 e 2 horas, na quantidade de 1,875 mg de N para três tubos de incubação, um deles foi deixado para avaliação da digestão intestinal. No segundo método, aproximadamente 5 g da amostra de cada alimento foram incubados durante 16 horas no rúmen de bovino recebendo dieta com 60% de volumoso e 40% de concentrado. Uma quantidade de 15 mg de N residual do rúmen de cada alimento foi colocada em tubos de digestão (frascos de 50 mL) para serem incubados em HCL-pepsina-pancreatina durante 25 horas. A digestibilidade intestinal da proteína não degradada no rúmen dos alimentos avaliados não foi constante. O método dos inibidores estimou melhor a degradação ruminal da proteína bruta e o método de três estágios prediz melhor a digestibilidade intestinal da proteína não degradada no rúmen. Sugerem-se mais pesquisas para recomendar a estimativa do $NDT_{(mt)}$ dos alimentos através das equações do NRC (2001).

Palavras-chave: degradabilidade, digestibilidade intestinal, proteína não degradada no rúmen

Application of Two *in vitro* Methods for Evaluation of Ruminal Disappearance and Intestinal Digestibility of Protein

ABSTRACT - The aim of this work was to evaluate the ruminal disappearance and intestinal digestibility of nitrogen nineteen concentrate feedstuffs, six commercial rations and four grasses, using an inhibitor *in vitro* with HCL-pepsin-pancreatin solutions and the three-step methods. The disappearance of nitrogen compounds of feedstuffs was determined at 0 and 2 hours using 1,875 mg of N incubated on three vessels. One of the vessel was submitted to intestinal digestion. On the second method, approximately 5 g of samples were incubated in the rumen during 16 hours of a steer fed a 60:40 forage concentrate ratio. After the incubation period, samples containing 15 mg of residual N were incubated in HCL-pepsin-pancreatin solutions during 25 hours. The data of intestinal digestibility of the undegradable rumen protein was not constant. The inhibitor method was more efficient to evaluate and predict kinetic parameters of ruminal degradation and the three-step method for intestinal digestibility of undegradable rumen protein. It was suggested more more evaluations to recommend the method of estimation of $NDT_{(mt)}$ by the NRC (2001) equations.

Key Words: digestibility, kinetic, undegradable rumen protein

Introdução

O inadequado suprimento de nutrientes na dieta dos animais é responsável pelo baixo desempenho, sendo que a proteína é, sem dúvida, um dos nutrientes de maior custo na ração. As exigências de proteína dos ruminantes são atendidas pela proteína microbiana sintetizada no rúmen, a partir da proteína dietética que escapa à degradação ruminal, e pela proteína endógena que é reciclada. As taxas de degradação são responsáveis pelo maior ou menor escape de compostos nitrogenados (N) do rúmen e pelo atendimento dos requerimentos de compostos nitrogenados dos microrganismos ruminais, conseqüentemente, a determinação da degradabilidade ruminal da proteína sem o conhecimento da digestibilidade intestinal da fração que escapa à degradação ruminal parece não ser adequada (VALADARES FILHO, 1995).

No que diz respeito à digestibilidade intestinal da proteína, ainda considera-se que esta seja constante. O ARC (1984) e o NRC (1985, 1989) adotaram, respectivamente, o valor de 85 e 80%, para a digestibilidade intestinal da proteína não degradada no rúmen. No AFRC (1992), foi assumido o valor de 90% para a digestibilidade da proteína no intestino delgado, que pode ser obtida pela seguinte expressão: $DPNDR$ (digestibilidade da proteína não-degradada no rúmen) = $0,9 [(PNDR) - 6,25 NIDA]$. No CNCPS, foram considerados diferentes valores para as três frações protéicas potencialmente digeríveis: 100% para as frações B₁ e B₂ e 80% para a fração B₃ (SNIFFEN et al., 1992).

Uma maneira de se avaliar a digestibilidade pós-ruminal da proteína não degradada no rúmen seria através da utilização da técnica de sacos de náilon móveis. Entretanto, os estudos utilizando animais fistulados são laboriosos, caros e requerem tratamento especial. Por outro lado, CALSAMIGLIA e STERN (1995) desenvolveram a técnica *in vitro* de três estágios para estimar a digestibilidade intestinal da proteína de vários alimentos. A técnica assume que a contaminação microbiana é mínima e

mostrou-se sensível ao avaliar o efeito do processamento e presença do fator inibidor da tripsina dos alimentos e teve uma alta correlação com estudos in vivo. O NRC (2001) recomenda utilizar as técnicas do saco de náilon móvel e da digestibilidade in vitro de três estágios para estimar a digestibilidade intestinal da PNDR. A técnica dos inibidores in vitro (IIV) de BRODERICK (1987) ainda não foi testada para estimar a digestibilidade intestinal da PNDR.

Os objetivos desta pesquisa foram determinar a degradabilidade ruminal e a digestibilidade intestinal da proteína de vários alimentos, utilizando duas técnicas in vitro: a de três estágios e a dos inibidores (IIV).

Material e Métodos

Este trabalho foi realizado nas dependências do laboratório de Nutrição Animal, do Departamento de Zootecnia, da Universidade Federal de Viçosa. Foram avaliados dois métodos in vitro. No primeiro, a dinâmica da degradação ruminal dos compostos nitrogenados dos alimentos foi avaliada pela incubação in vitro com o uso de inibidores (IIV) (BRODERICK, 1987, modificado por LONDOÑO HERNÁNDEZ et al., 2000).

Foi utilizado como inóculo líquido ruminal oriundo de bovino recebendo dieta com 60% de volumoso e 40% de concentrado. As amostras de cada alimento foram moídas em moinho de bola e incubadas em três dias diferentes. Cada alimento foi incubado nos tempos 0 e 2 horas, na quantidade de 1,875 mg de N para cada três tubos de incubação, sendo que um dos tubos de cada amostra foi deixado para avaliação da digestão intestinal de acordo com CALSAMIGLIA e STERN (1995).

Inicialmente, a cada tubo de digestão de 50mL foram adicionados 10mL de uma solução 0,1N de HCL contendo 1g/L de pepsina com pH de 1,9, incubando-o em banho maria a 38°C durante 1h. Posteriormente, foram adicionados 0,5 mL de uma solução de NaOH 1N e 13,5mL de uma solução de pancreatina (0,5M de fosfato de potássio

dibásico KH_2PO_4 com pH de 7,8 contendo 50ppm de thymol e 3 g/L de pancreatina), colocando o tubo, novamente, em banho maria a 38°C durante 24h sendo mexido lentamente a cada 8h.

Ao finalizar a digestão foram adicionados 3 mL de TCA (100%) em cada tubo para encerrar a ação enzimática e precipitar as proteínas não digeridas. Cada tubo foi deixado em repouso durante 15 minutos e posteriormente centrifugado a $10.000 \times g$ durante 15 minutos a 4°C , sendo o sobrenadante analisado para N.

No segundo método, a degradação ruminal e a digestibilidade intestinal foram avaliadas pelo método de três estágios de acordo com CALSAMIGLIA e STERN (1995). As amostras foram moídas em moinho com peneira com malha de 2 mm. Aproximadamente 5 g da amostra de cada alimento foram colocados nos sacos confeccionados com poliéster, tamanho 10x6 cm e incubados no rúmen por 16 horas. A seguir, os sacos foram lavados em água corrente, sem esfregar, até a mesma sair limpa, levados à estufa de ventilação forçada durante 48h a 55°C , pesados e determinados os teores de nitrogênio. Uma quantidade de amostra contendo aproximadamente 15 mg de nitrogênio residual do rúmen de cada alimento foi colocada em tubos de digestão para a realização da digestão intestinal como descrito anteriormente.

Foi utilizado o método Kjeldahl (AOAC, 1990) para determinar o teor dos compostos nitrogenados (N) dos seguintes alimentos: caseína, farelo de soja, farelo de trigo, fubá de milho, milho desintegrado com palha e sabugo (MDPS), quirera de milho, glúten de milho, grão de sorgo moído, grão de milho moído, grão de amendoim moído, polpa cítrica, promil. Foram também avaliadas as farinhas de peixe, de penas, de vísceras de aves, mista de vísceras de aves e suínos, e as camas de frango contendo como material absorvente capim-elefante, casca de café e cepilha de madeira. Foram ainda avaliados os volumosos: silagem de milho (*Zea mays*), capim-braquiária

(*Brachiaria decumbens* cv. Basiliski) (2^o ano) coletado no início das águas com idade de 45 dias, os fenos de capim-tifton (*Cynodon dactylon*) com 5 semanas de idade, a silagem pré-seca de tifton e as rações comerciais: leitel 20, vialac, ração 20, 20E, 25E e RRH.

Foram feitas determinações de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), matéria mineral (MM) e extrato etéreo (EE), seguindo os procedimentos descritos pelo (AOAC, 1990) além dos carboidratos totais (CHT) estimados pela equação (SNIFFEN et al., 1992): $CHT (MS) = 100 - (\%PB + \%EE + \%MM)$ e os compostos nitrogenados não protéicos (NNP) determinados de acordo com LICITRA et al. (1996). A composição bromatológica dos alimentos avaliados encontra-se nas Tabelas 1 e 2.

Os cálculos da degradação ruminal e digestibilidade intestinal pelo método de três estágios foram realizados de acordo com as seguintes equações: A degradabilidade ruminal foi calculada, $PDR = 100 \times \{[(\text{nitrogênio incubado} - \text{nitrogênio residual}) / \text{nitrogênio incubado}]\}$. A digestibilidade intestinal, em porcentagem, foi calculada como a quantidade de N digerido após incubação com HCL-Pepsina e pancreatina dividida pela quantidade incubada e multiplicada por 100 e a proteína não degradada no rúmen como: $PNDR = 100 - PDR$.

Os cálculos da degradação ruminal e digestibilidade intestinal pelo método de inibidores foram realizados de acordo com as seguintes equações: Taxa de degradação,

$K_d (/h) = - (\text{LnFID}_{2h} - \text{LnFID}_{0h}) / 2$; onde

$\text{LnFID}_{0h} = \{1 - [((\text{Ninsolúvel TCA}_{0h}) / \text{Nincubado})]\}$ e

$\text{LnFID}_{2h} = \{1 - [((\text{Ninsolúvel TCA}_{2h}) / \text{Nincubado})]\}$, sendo

Ninsolúvel em TCA, para 0 e 2h = mg(Ninsolúvel TCA - Nbranco);

Fração B, $B (\%) = [\text{Exp}(\text{LnFID}_{0h}) \times 100]$ e a proteína de escape calculada como:

$\text{PNDR} (\%) = [K_p / (K_d + K_p)]$ assumindo-se uma taxa de passagem de 0,05/h.

A degradabilidade ruminal foi calculada como: $PDR = 100 - PNDR$ e a digestibilidade intestinal como: $DIPNDR = \{[(Ninicial \times PNDR) - Ninsolúvel \text{ em TCA após rúmen e intestino}] / (Ninicial \times PNDR)\} \times 100$.

Foi estimado o valor energético $NDT_{(m)}$ para manutenção dos alimentos avaliados, utilizando as equações do NRC (2001), da seguinte forma:

Para proteínas de origem animal:

$$NDT_{(m)} (\%) = (PBD) + (EE-1) \times 2,25 + (0,98 \text{ CNF}) - 7;$$

$$\text{onde CNF} = 100 - (\%PB + \% \text{ Cinzas} + \% EE + \% FDN_{CP})$$

Para alimentos de origem vegetal:

$$NDT_{(m)} (\%) = CNFD + PBD + (EE-1) \times 2,25 + FDND - 7;$$

sendo PBD - proteína bruta digestível, EE - extrato etéreo, CNFD - carboidratos não fibrosos digestíveis e FDND - fibra em detergente neutro digestível;

$$\text{Onde, CNFD} = 0,98 \times [100 - (\% PB + \% \text{ Cinzas} + \% EE + \% FDN_{CP})],$$

$$PBD = \text{Exp}((-1,2 \times (PIDA/PB))) \times PB \text{ para as forragens e}$$

$$PBD = (1 - (0,4 \times (PIDA/PB))) \times PB \text{ para concentrados;}$$

$$GD = (EE - 1) \times 2,25; \text{ sendo GD - gordura digestível;}$$

$$FDND = (0,75 \times (FDN_{CP} - \text{Lig}) \times [1 - (\text{Lig}/FDN_{CP})^{0,667}])$$

Onde, FDN_{CP} - fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína e Lig é o valor da lignina expressa na matéria seca.

As estimativas médias das digestibilidades intestinais da proteína não degradada no rúmen, utilizando o método de inibidores e o método de três estágios foram comparadas através do teste "t", a 5% de probabilidade.

Tabela 1 - Teores de matéria seca (MS), matéria mineral (MM), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), carboidratos totais (CHT), carboidratos não fibrosos (CNF), fibra em detergente neutro (FDN), FDN corrigida para proteínas e cinzas (FDN_{cp}), FDN indigestível (FDNI), FDN corrigida para proteína e cinzas (FDNI_{cp}), fibra em detergente ácido (FDA), lignina (Lig), celulose (Cel), proteína insolúvel em FDA (PIDA) e FDN (PIDN) e compostos nitrogenados não protéicos (NNP) obtidos para os alimentos concentrados

Alimentos	MS (%)	MM ¹	MO ¹	PB ¹	EE ¹	CHT ¹	CNF ¹	FDN ¹	FDN _{cp} ¹	FDNI ¹	FDNI _{cp} ¹	FDA ¹	Lig ¹	Cel ¹	PIDA ²	PIDN ²	NNP ²
Caseína	89,19	2,06	97,94	97,95	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18,42
Farelo de soja	87,77	8,56	91,44	46,81	1,62	43,01	30,73	15,57	12,28	0,00	0,00	8,31	1,10	7,03	2,55	5,92	20,76
Glúten de milho	89,63	5,49	94,51	61,31	0,19	33,01	28,71	16,34	4,30	0,00	0,00	6,49	1,63	3,09	3,28	8,37	23,74
Fubá de milho	89,02	1,02	98,98	9,19	2,76	88,03	79,40	10,63	8,63	0,34	0,27	5,34	1,50	3,83	10,28	12,79	18,34
MDPS	87,00	1,55	98,45	7,90	2,15	88,30	61,59	31,51	26,71	2,86	2,70	14,22	1,17	12,96	14,76	36,20	16,42
Farelo de glúten de milho (Promil)	87,74	10,33	89,67	18,31	4,17	67,19	30,29	40,83	36,90	0,40	0,35	11,21	1,09	10,03	6,97	22,12	41,76
Grão de milho moído	88,18	6,00	94,00	15,94	3,36	72,70	66,00	15,57	6,70	1,14	1,01	3,58	1,48	3,64	14,59	24,38	18,81
Grão de sorgo moído	87,17	1,89	98,11	9,44	3,09	85,08	67,62	24,11	16,07	0,009	0,008	4,43	0,36	4,36	18,67	21,84	23,20
Grão de amendoim moído	91,90	9,48	90,52	15,94	2,20	72,38	58,64	29,71	13,74	6,34	6,02	14,04	2,12	11,78	11,03	12,27	57,34
Polpa cítrica	85,5	7,18	92,82	6,48	2,34	84,00	49,35	40,98	34,65	0,60	0,56	15,62	4,43	21,53	11,70	20,46	19,37
Farelo de trigo	83,10	5,47	94,53	14,25	3,53	77,75	42,21	39,04	35,54	4,29	3,77	14,25	3,55	10,58	3,71	6,70	11,77
Farinha de peixe	92,00	32,05	67,95	57,13	9,87	0,95	0,00	6,12	5,18	4,63	2,57	6,10	0,62	3,45	0,77	1,47	1,15
Farinha de penas	95,00	2,53	97,47	77,00	3,31	17,16	6,52	11,20	10,64	6,68	4,64	10,97	0,66	8,41	40,24	41,06	21,70
Farinha de vísceras de aves	93,46	17,60	82,4	54,13	11,59	16,68	0,00	12,00	11,18	3,73	3,05	2,12	0,61	2,03	0,83	3,81	18,48
Farinha mista de vísceras de aves e suínos	94,30	16,50	83,95	49,94	9,66	23,90	0,00	11,05	10,27	3,95	3,29	2,98	0,68	2,34	2,47	2,90	18,57
Ração RRH	87,65	4,98	95,02	16,69	3,54	73,79	48,81	27,80	24,98	2,69	2,53	8,40	0,83	7,01	5,85	12,62	26,08
Ração L20S	88,10	6,65	93,35	20,00	4,12	68,23	60,61	21,90	19,15	2,57	2,23	9,88	1,41	8,65	6,80	13,73	24,04
Ração 20E	88,62	7,32	92,68	20,06	4,48	67,14	56,56	28,68	26,06	0,30	0,28	12,02	1,34	11,04	2,70	13,07	19,28
Ração 25E	87,76	7,97	92,03	25,06	4,19	61,78	45,08	18,22	16,70	0,05	0,05	10,69	0,83	9,43	2,58	7,74	13,20
Ração 20	88,52	7,43	92,57	20,19	3,83	68,55	49,06	25,00	19,49	0,00	0,00	12,03	0,80	11,33	2,19	12,85	18,35
Ração Vialac	87,53	8,87	91,13	22,66	4,53	63,94	45,32	20,00	18,62	1,52	1,30	7,16	1,33	5,83	7,61	11,78	26,75

¹% na MS; ²% da PB

Tabela 2 - Teores de matéria seca (MS), matéria mineral (MM), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), carboidratos totais (CHT), carboidratos não fibrosos (CNF), fibra em detergente neutro (FDN), FDN corrigida para proteínas e cinzas (FDN_{cp}), FDN indigestível (FDNI), FDN corrigida para proteína e cinzas (FDNI_{cp}), fibra em detergente ácido (FDA), lignina (Lig), celulose (Cel), proteína insolúvel em FDA (PIDA) e FDN (PIDN) e compostos nitrogenados não protéicos (NNP) obtidos para os alimentos volumosos

Alimentos	MS (%)	MM ¹	MO ¹	PB ¹	EE ¹	CHT ¹	CNF ¹	FDN ¹	FDN _{cp} ¹	FDNI ¹	FDNI _{cp} ¹	FDA ¹	Lig ¹	Cel ¹	PIDA ²	PIDN ²	NNP ²
Capim-braquiária	30,40	4,87	95,13	6,55	1,34	84,24	13,16	73,82	71,59	8,00	7,47	35,25	1,17	31,37	4,53	11,00	28,51
Silagem de milho	29,64	4,50	95,50	7,64	3,79	82,67	25,72	59,17	56,95	12,74	11,73	33,93	5,35	27,28	9,93	14,79	48,67
Silagem Pré-seca de Tifton	49,74	8,51	91,49	17,63	2,44	71,42	13,52	64,33	57,90	7,80	7,32	31,09	2,84	27,80	5,67	36,33	27,80
Feno de capim-Tifton	88,19	4,65	95,35	19,06	1,35	74,94	8,08	70,38	66,86	14,76	14,70	35,15	3,92	29,67	2,24	30,49	29,63
Cama de frango de casca de café	88,35	12,93	87,07	15,13	1,85	70,09	28,64	47,85	41,45	5,80	5,33	24,74	1,80	16,63	14,28	18,56	15,59
Cama de frango de capim	85,29	15,04	84,96	14,50	1,29	79,17	31,47	52,78	47,70	5,74	5,42	29,60	3,72	25,11	7,19	34,78	38,86
Cama de frango de cepilha de madeira	84,65	12,05	87,95	15,31	0,83	72,21	24,20	58,47	50,01	11,74	11,01	32,08	6,69	26,97	10,70	46,02	13,66

¹% na MS; ²% da PB

Resultados e Discussão

Os valores médios estimados da proteína degradada (PDR), não degradada no rúmen (PNDR) e a digestibilidade intestinal da proteína não degradada no rúmen (DIPNDR) dos alimentos concentrados avaliados através da técnica de três estágios são apresentados na Tabela 3. As pressuposições feitas nas avaliações realizadas foram: que a proteína que escapa à degradação ruminal e sua digestibilidade no intestino não são constantes, o que foi comprovado pelos resultados obtidos, sendo que a proteína não degradada no rúmen dos alimentos concentrados avaliados variou de 6,85% a 84,26% para caseína e farinha de peixe, respectivamente. Já a digestibilidade intestinal alcançou valores que variaram de 32,22% a 93,33% para a polpa cítrica e a caseína, respectivamente.

Este estudo confirmou os resultados de DE BOER et al. (1987), VAN STRAALLEN e TAMMINGA. (1990), KENDALL et al. (1991), CASTILLO (1992), HVELPLUND et al. (1992), RAMOS et al. (1995), VALADARES FILHO (1995) e LONDOÑO HERNÁNDEZ et al. (1998) onde a digestibilidade intestinal da PNDR não foi constante.

Como pode ser observado, a caseína avaliada através do método de três estágios teve uma alta degradação ruminal e a proteína que escapou à degradação ruminal foi baixa (6,85%). Entretanto, esse resultado foi 63,95% menor que o preconizado pelo NRC (1989) de 19%. Por outro lado, a digestibilidade intestinal da proteína não degradada no rúmen foi elevada, indicando que provavelmente essa fração seria amplamente digerida. Na literatura não foram encontrados dados sobre a digestibilidade intestinal da proteína que escapa à degradação ruminal da caseína.

O farelo de soja tem sido utilizado como suplemento protéico de alta qualidade, sendo degradado no rúmen em maior extensão que proteínas de origem animal. Os resultados mostraram que metade da proteína desse alimento foi degradada após 16 horas de incubação no rúmen. Entretanto, foi encontrada uma grande variação nos resultados da proteína degradada no rúmen: DE BOER et al. (1987), 86,10%; MASOERO et al. (1994), 80,24%; STERN et al. (1997), 80,6%; LONDOÑO HERNÁNDEZ et al. (1998), 72,36%, utilizando a técnica do saco de náilon móvel.

Tabela 3 – Estimativas do percentual da proteína degradada no rúmen (PDR), que escapa à degradação ruminal (PNDR) e digestibilidade intestinal da proteína (DIPNDR) obtidas para alimentos concentrados, utilizando o método de três estágios

Alimentos	PDR	PNDR	DIPNDR (%)
	(% PB)		
Caseína	93,15	6,85	93,33
Farelo de soja	50,78	49,22	84,67
Glúten de milho	18,38	81,62	84,00
Fubá de milho	31,81	68,19	60,00
MDPS	45,24	54,76	66,67
Promil	85,21	14,79	53,33
Grão de milheto moído	30,20	69,80	66,67
Grão de sorgo moído	36,42	63,58	66,67
Grão de amendoim moído	81,29	18,71	33,33
Polpa cítrica	39,81	60,19	32,22
Farelo de trigo	76,61	23,39	46,47
Farinha de peixe	15,74	84,26	79,76
Farinha de penas	25,60	74,40	73,33
Farinha de vísceras de aves	47,44	52,56	66,67
Farinha mista de vísceras aves-suínos	48,60	51,40	60,00
Ração Leitel 20	65,64	34,36	60,00
Ração Vialac	75,87	24,13	53,33
Ração 20	66,56	33,44	53,29
Ração 20E	29,60	70,40	53,24
Ração 25E	69,68	30,32	60,00
Ração RRH	35,68	64,32	40,00

Baseado em estudos *in vivo*, o NRC (1985) considerou em 72% a degradação ruminal do farelo de soja. Com relação à proteína não degradada no rúmen (PNDR), o farelo de soja apresentou valor de 49,22%. Entretanto, STERN et al. (1983) relataram variações para a PNDR de 22 a 29% e MERCHEN et al. (1997) relataram valores de 35 a 93%. Por outro lado, o NRC (1989) considerou valores de 14 a 82% para a PNDR do farelo de soja dependendo do tipo de tratamento. A digestibilidade intestinal foi de 84,67%, semelhante ao encontrado por MAIGA et al. (1996), 88%; CABRAL (1999), 82,68% e CALSAMIGLIA e STERN (1995), 89,8%, utilizando a técnica de três estágios.

O glúten de milho teve a segunda maior fração da proteína não degradada no rúmen com valor de 81,62% e sua digestibilidade intestinal foi semelhante à do farelo de soja, com valor de 84%. Os resultados obtidos no presente trabalho foram semelhantes aos encontrados por MAIGA et al. (1996), 13,9; 86,10 e 84,0% e CABRAL (1999), 18,0; 82,0 e 83,25% para a PDR, PNDR e digestibilidade intestinal da PNDR, respectivamente. A digestibilidade intestinal também foi semelhante à obtida por CALSAMIGLIA e STERN (1995), de 87,60. CLARK et al. (1987) e POOS-FLOYD et al. (1985), relataram valores de 55 e 57,9% para o teor da PNDR; já o NRC (1989) publicou valores para a PNDR do glúten de milho de 22 a 55%, dependendo do tipo de processamento. Avaliando o glúten de milho, num estudo *in vivo*, TITGEMEYER et al. (1989) encontraram uma digestibilidade intestinal de 69%, resultado aproximadamente 17,86% menor que o encontrado nesta pesquisa.

Com relação ao fubá de milho, as estimativas médias mostraram que esse alimento foi 42,21% (31,81%) mais degradado no rúmen que o glúten de milho (18,38%), sendo por tanto a proteína de escape 16,5% menor (68,19%) que a do glúten (81,62%) e a digestibilidade intestinal da PNDR 28,57% menor, 60% e 84%,

respectivamente. Os resultados obtidos foram próximos aos encontrados por CABRAL (1999) de 30,0, 70 e 56,19% para a PDR, PNDR e digestibilidade intestinal da PNDR, respectivamente. Resultados semelhantes aos encontrados no presente trabalho foram relatados em um estudo *in vivo* por KUNG et al. (1992) que encontraram uma degradabilidade ruminal do fubá de milho de 31,1% e RAMOS et al. (1995) relataram uma degradabilidade de 33,5%, utilizando a técnica de saco de náilon móvel. A estimativa média para a digestibilidade da PNDR foi de 60%.

Considerando o MDPS, as estimativas médias da proteína degradada no rúmen foram 59,37% maiores (45,24%) que a do glúten de milho (18,38%) e 29,69% maiores que a do fubá de milho (31,81%). Entretanto a digestibilidade intestinal foi semelhante à do fubá de milho (66,67%), o que parece ser contraditório, já que o MDPS apresenta uma maior fração ligada a parede celular indigestível (Tabela 1). Os resultados médios da proteína degradada no rúmen do promil mostraram que esse alimento foi o segundo mais degradado (85,21%).

Ao analisar os grãos moídos, observou-se que as estimativas médias para PDR, PNDR e para a digestibilidade intestinal da PNDR foram semelhantes entre o milheto e o sorgo, 30,46%, 36,42%; 69,80%, 63,58% e 66,67%, 66,67%, respectivamente. De acordo com o NRC (1989), a PNDR do sorgo foi de 54%, sendo esse valor 15,07% menor que o encontrado no presente trabalho. Por outro lado, o grão de amendoim moído resultou numa alta degradação ruminal (81,29%) e baixa digestibilidade intestinal (33,33%). O contrário aconteceu com a polpa cítrica que teve uma baixa degradação ruminal (39,81%).

As estimativas médias para o farelo de trigo mostraram uma alta degradação ruminal (76,61%) e baixa PNDR (23,39%), sendo a digestibilidade intestinal da PNDR de 46,47%. Esses resultados foram semelhantes aos encontrados por CABRAL (1999)

(76,95%, 23,05% e 38,18%). O NRC (1989) relatou valor de 22% para a PNDR do farelo de trigo, sendo esse valor semelhante ao encontrado nesta pesquisa.

No que diz respeito aos alimentos de origem animal, observou-se que a menor degradação ruminal foi obtida pela farinha de peixe (15,74%), seguida pela farinha de penas (25,60%), farinha de vísceras de aves (47,44%) e por último da farinha mista de vísceras de aves e suínos (48,60%). Os resultados da degradabilidade ruminal (15,74%), PNDR (84,26%) e digestibilidade intestinal (79,76%) da farinha de peixe foram próximos aos encontrados por CABRAL (1999): 11,07%, 88,93% e 73,37%, respectivamente. CALSAMIGLIA e STERN (1995) encontraram uma digestibilidade intestinal de 85,4%, sendo esse resultado 6,6% maior que o encontrado neste estudo. Entretanto, num estudo *in vivo*, ZERBINI e POLAN (1985) encontraram uma degradabilidade ruminal da farinha de peixe de 42,7%. Também *in vivo*, McCARTHY et al. (1989) relataram uma digestibilidade intestinal de 72,3% para esse mesmo alimento. Já o NRC (1989) considerou o valor de 60% para a PNDR da farinha de peixe.

Com relação às rações comerciais, a maior proteína degradada no rúmen foi encontrada na ração vialac (75,87%), seguida das rações 25E (69,68%), ração 20 (66,56%), leitel 20 (65,64), RRH (35,68%) e por último a ração 20E (29,60%). Por outro lado, foram encontradas digestibilidades intestinais da PNDR baixas e semelhantes entre as rações leitel 20 (60%), 25E (60%) e entre as rações vialac, ração 20 e 20E, 53,33, 53,29 e 53,24%, respectivamente. Por outro lado, a ração RRH apresentou uma digestibilidade intestinal da PNDR de 40%, sendo esse resultado semelhante ao encontrado pelo farelo de trigo, podendo ser explicado pelo elevado teor do farelo de trigo nessa ração que foi de 75% .

Os valores médios da PDR, PNDR e digestibilidade intestinal da PNDR dos volumosos e das camas de frango são apresentados na Tabela 4. Foram encontrados resultados semelhantes para a proteína degradada no rúmen do capim-braquiária (48,84%) e do feno de capim-tifton (49,07%), assim como para suas digestibilidades intestinais (46,67%). Esses resultados não são consistentes devido ao fato do capim-braquiária ser coletado no início das águas e o tifton ser sido previamente submetido a secagem. O que de acordo com VAN SOEST e SNIFFEN (1984) e McDONALD et al. (1988) pode incrementar a quantidade de nitrogênio ligado à componentes da fibra reduzindo a sua disponibilidade ruminal.

Tabela 4 – Estimativas do percentual de proteína degradada no rúmen (PDR), que escapa à degradação ruminal (PNDR) e digestibilidade intestinal da PNDR obtidas para alimentos volumosos e camas de frango, utilizando o método de três estágios

Alimentos	PDR	PNDR	DIPNDR (%)
	(% PB)		
Capim-braquiária	48,84	51,16	46,67
Silagem milho	17,44	82,56	60,00
Silagem pré-seca de capim-tifton	57,45	42,55	53,33
Feno capim-tifton	49,07	50,93	46,67
Cama de frango de casca de café	83,20	16,80	73,33
Cama de frango de capim-elefante	37,04	62,96	60,00
Cama de frango de cepilha de madeira	52,38	47,62	53,33

Das forragens avaliadas, a maior digestibilidade intestinal da PNDR foi encontrada para a silagem de milho (60%), sendo esse valor 19,58% maior que o encontrado por FRYDRYCH (1992) que foi de 48,25% e 14,28% menor que o relatado por RAE e SMITHARD (1985) que foi de 70%. Avaliando a digestibilidade intestinal da silagem pré-seca de gramíneas, utilizando a técnica do saco de náilon móvel, FRYDRYCH (1992) encontrou resultados semelhantes (55,43%) aos obtidos nesta pesquisa (53,33%).

As estimativas médias para a degradabilidade ruminal das camas de frango, mostraram que a cama de frango contendo como material absorvente casca de café teve uma maior proteína degradada no rúmen (83,20%), seguida da cama de frango de cepilha de madeira (52,38%) e por último da cama de frango de capim-elefante (37,04%), assim como uma maior digestibilidade intestinal da PNDR (73,33%).

As estimativas médias dos parâmetros cinéticos da degradação dos alimentos concentrados avaliados pela técnica dos inibidores *in vitro* são apresentadas na Tabela 5. As estimativas da digestibilidade intestinal da PNDR tanto para os concentrados quanto para os volumosos não foram apresentadas devido aos resultados não serem consistentes.

De acordo com BHAGAVAN (1977), o cloranfenicol interfere nas etapas de formação de peptídeos e nos organismos suscetíveis, impedindo o alongamento da cadeia peptídica. Acredita-se, portanto, que o cloranfenicol além de participar como inibidor da síntese de proteína, participou na sua digestão, inibindo a formação de polipeptídeos.

Tabela 5 – Estimativas das taxas de degradação (Kd), fração B, percentual de proteína degradada no rúmen (PDR), percentual da proteína que escapa à degradação ruminal (PNDR) obtidas para alimentos concentrados, utilizando o método de inibidores *in vitro*

Alimentos	Kd	B (%)	PDR (%)	PNDR (%)
Caseína	0,265	92,50	84,15	15,85
Farelo de soja	0,155	80,30	75,58	24,42
Glúten de milho	0,041	81,76	45,35	54,65
Fubá de milho	0,016	88,97	24,58	75,42
MDPS	0,181	71,70	78,41	21,59
Promil	0,522	11,43	91,25	8,75
Grão de milho moído	0,040	92,26	44,23	55,77
Grão de sorgo moído	0,041	85,40	45,22	54,78
Grão de amendoim moído	0,244	68,20	83,01	16,99
Polpa cítrica	0,050	46,20	50,05	49,95
Farelo de trigo	0,112	65,23	69,29	30,71
Farinha de peixe	0,041	94,86	45,18	54,82
Farinha de penas	0,038	30,13	42,74	57,26
Farinha vísceras de aves	0,073	55,27	58,93	41,07
Farinha mista aves-suínos	0,077	37,10	60,67	39,33
Ração Leitol 20	0,062	96,53	55,54	44,46
Ração Vialac	0,146	80,20	74,44	25,56
Ração 20	0,071	91,73	58,82	41,18
Ração 20E	0,006	89,13	9,78	90,22
Ração 25E	0,039	92,20	44,08	55,92
Ração RRH	0,104	86,40	67,62	32,38

Como pode-se observar o método de inibidores *in vitro* considera nas suas estimativas a taxa e extensão da degradação, assim como a taxa de passagem da proteína dos alimentos. Sabe-se que a taxa e extensão da degradação da proteína no rúmen afetam a síntese da proteína microbiana e determinam a quantidade da proteína não degradada (PNDR) que alcança o intestino (PICHARD e VAN SOEST, 1977; STERN et al., 1994). Proteínas resistentes à degradação ruminal têm sido utilizadas na prática nutricional para aumentar a proteína dietética que chega ao intestino para sua digestão e absorção.

Ao analisar as taxas de degradação dos alimentos concentrados avaliados, as estimativas mostraram as categorias de proteína, dividindo-as em rápida degradação (promil, caseína, grão de amendoim moído, cama de frango de casca de café), degradação intermediária (farelo de soja, MDPS, farelo de trigo, farinha de vísceras de aves e ração vialac) e lenta degradação (fubá de milho, glúten de milho, grão de milheto moído, grão de sorgo moído, polpa cítrica, farinha de peixe, farinha de penas, farinha mista de vísceras de aves e suínos, cama de frango de capim-elefante, cama de frango de cepilha de madeira e as rações comerciais leitel 20, ração 20, ração 25E e ração RRH. Foi também encontrada uma taxa de degradação muito lenta correspondente à ração comercial 20E, resultado este não esperado.

A caseína vem sendo utilizada como alimento padrão nos estudos *in vitro* devido à sua composição aminoacídica e por possuir uma rápida degradação ruminal (RAAB et al., 1983; BRODERICK, 1987; NEUTZE et al., 1993). No presente estudo também foi utilizada como alimento padrão durante todas as avaliações. As estimativas médias para a PNDR da caseína (15,85%) foram próximas às relatadas pelo NRC (1989) e semelhantes às encontradas por McDONALD e HALL (1957) de 13% com animais fistulados no abomaso.

As estimativas médias dos percentuais de proteína não degradada no rúmen do farelo de soja (24,42%) foram semelhantes às encontradas por STERN et al. (1994), (22 a 29%); COZZI et al. (1995), 25,70%; CLARK et al. (1987), 28%; e ENGLAND et al. (1997), 28,60%. O NRC (1989) preconizou 35% para a PNDR do farelo de soja, variando de 14 a 82% dependendo do processamento do alimento.

Os resultados obtidos para a proteína não degradada no rúmen do glúten de milho, 54,65%, foram próximos daqueles relatados *in vivo* por POOS-FLOYD et al. (1985), 57,90%, e CLARK et al. (1987), 55,00%. Os resultados encontram-se próximos

daqueles publicados pelo NRC (1989), de 22% a 55%, para esse alimento. Com relação ao fubá de milho, as estimativas para a PNDR, de 75,42%, foram próximos daqueles do NRC (1989), de 52%, variando de 24% a 68% devido ao processamento.

Ao analisar os grãos moídos, observou-se que o grão de milho e o sorgo apresentaram resultados próximos para a PNDR, 55,77% e 54,78%, respectivamente; já a PNDR do amendoim moído foi de 16,99%. Os resultados para PNDR do grão de sorgo moído foram semelhantes aos preconizados pelo NRC (1989), de 49%. As estimativas da PNDR do farelo de trigo foram próximas daquelas citadas pelo NRC (1989).

No que diz respeito aos alimentos de origem animal, notou-se que a farinha de penas obteve-se a maior PNDR (57,26%), seguida da farinha de peixe (54,82%), vísceras de aves (41,07%) e da farinha mista de vísceras de aves e suínos (39,33%). Resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho para a proteína não degradada no rúmen da farinha de peixe foram relatados por STERN et al. (1983) avaliando a digestibilidade da farinha de peixe *in vivo* (59% a 73%), ENGLAND et al. (1997) (52,90% e 59,60%) ao comparar a técnica *in situ* com a de inibidores, e próximos aos relatados por HARRIS et al. (1992) (60%) avaliada *in vivo*. O NRC (1989) adotou 60% para a proteína não degradada no rúmen da farinha de peixe.

As rações comerciais avaliadas apresentaram diferentes valores para a PNDR, sendo que o maior valor encontrado foi para a ração comercial 20E (90,22%) seguido da ração 25E (55,92%), leitel 20 (44,46%), ração 20 (41,18%), ração RRH (32,38%) e por último da ração vialac de (25,56%). Vale ressaltar que a menor PNDR (25,56%) da ração comercial vialac significaria uma menor disponibilidade de aminoácidos para serem digeridos no intestino, influenciando diretamente na produção bovina.

As estimativas médias dos parâmetros cinéticos da degradação da proteína dos alimentos volumosos e das camas de frango são apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6 – Estimativas das taxas de degradação, fração B, percentual de proteína que escapa à degradação ruminal e digestibilidade intestinal obtidas para alimentos volumosos e camas de frango, utilizando o método de inibidores *in vitro*

Alimentos	Kd	B (%)	PDR (%)	PNDR (%)
Capim-braquiária	0,005	59,00	9,56	90,44
Silagem milho	0,036	62,90	41,56	58,44
Silagem pré-seca de capim-tifton	0,044	80,33	47,21	52,79
Feno capim-tifton	0,145	90,63	74,31	25,69
Cama de frango de casca de café	0,269	36,57	84,35	15,65
Cama de frango de capim-elefante	0,034	39,83	40,40	59,60
Cama de frango de cepilha de madeira	0,059	45,17	54,06	45,94

O resultado para a proteína não degradada no rúmen da silagem de milho (58,44%) foi maior que o do NRC (1989), de 31%.

Com relação aos parâmetros cinéticos da degradação da proteína das camas de frango, observou-se que a menor PNDR foi obtida pela cama de frango de casca de café (15,65%) e a maior pela cama de frango de capim-elefante (59,60%).

Na sua recente publicação, o Conselho Nacional de Pesquisa Americano NRC (2001), considerou que o valor energético para manutenção dos alimentos não foi determinado, mas estimado. No presente estudo foram estimados os valores para o NDT de manutenção para os alimentos avaliados (Tabelas 7 e 8), considerando a composição dos alimentos mostrada nas Tabelas 1 e 2 do segundo e terceiro experimentos.

Entre os concentrados avaliados, os valores estimados de NDT variaram de 65,95% até 86,67% para a polpa cítrica e farinha de sangue, respectivamente. Os alimentos glúten de milho, fubá de milho, quirera de milho, grão de sorgo moído,

levedura de cana de açúcar, farinha de sangue e ração comercial 25E, apresentaram valores iguais o maiores à 80% para o NDT.

Os resultados para o NDT do farelo de soja, farelo de algodão com 30% de casca e fubá de milho foram próximos aos relatados pelo NRC (2001) e CAPPELLE (2000) de 80,00%, 66,4%, 85,00% e 81,00%, 63,91% e 85,12% respectivamente. Com relação ao MDPS, CAPELLE (2000) reportou valores de 66,62%, sendo esses resultados 16,24% menores aos encontrados no presente trabalho.

Já para o glúten de milho, o NRC (2001) relatou valor de 84,70% próximo ao encontrado neste trabalho. O NRC (2001) considerou valor de 71,50% para o NDT do farelo de trigo, sendo esse semelhante ao encontrado neste estudo. Entretanto, CAPPELLE (2000) relatou 59,52% para o NDT do farelo de trigo, resultado esse 16,40% menor ao encontrado nesta pesquisa.

Com relação aos alimentos de origem animal, observou-se que os resultados para o NDT da farinha de sangue e da farinha de carne e ossos foram 11,84% e 11,74% aos relatados pelo NRC (2001) de 76,40% e 61,90%, respectivamente.

Tabela 7 – Estimativas do percentual da proteína bruta digestível (PBD), ácidos graxos digestíveis (AGD), carboidratos não fibrosos digestíveis (CNFD), fibra em detergente neutro digestível (FDND) e nutrientes digestíveis totais (NDT) obtidas para alimentos concentrados, em porcentagem da matéria seca

Alimentos	PBD	AGD	CNFD	FDND	NDT _(m) *
Caseína	97,95	---	----	---	---
Farelo de soja	46,34	1,40	29,60	7,07	77,40
Farelo de algodão 30% de casca	24,47	0,50	34,07	17,02	69,05
Glúten de milho	60,51	0,00	21,36	5,20	80,07
Fubá de milho	8,81	3,96	76,02	4,22	86,01
MDPS	7,58	2,59	57,24	19,13	79,54
Promil	17,80	7,13	29,80	24,21	71,94
Quirera de milho	9,65	6,66	63,60	13,50	86,40
Grão de milheto moído	15,01	5,31	61,76	1,29	76,37
Grão de sorgo moído	8,73	4,70	62,26	15,22	83,92
Grão de amendoim moído	15,23	2,70	43,74	12,28	66,95
Polpa cítrica	6,17	3,02	43,47	20,29	65,95
Farelo de trigo	14,04	5,69	37,89	20,58	71,20
Levedura de cana de açúcar	33,61	6,82	34,60	15,38	83,41
Farinha de peixe	56,95	19,96	0,00	----	69,91
Farinha de sangue	81,00	0,34	12,32	----	86,67
Farinha de carne e ossos	37,21	39,94	0,00	----	70,14
Farinha de penas	64,61	5,20	6,39	----	69,19
Farinha vísceras de aves	53,95	23,83	6,61	----	77,39
Farinha mista aves-suínos	49,45	19,49	14,01	----	75,94
Ração Leitel 20	16,30	5,72	48,12	16,76	79,89
Ração Vialac	21,97	7,94	45,68	9,84	78,43
Ração 20	20,01	6,37	45,22	14,45	79,05
Ração 20E	19,85	7,83	41,24	15,98	77,89
Ração 25E	24,80	7,18	45,57	10,00	80,54
Ração RRH	16,30	5,72	48,12	16,76	79,89

*NDT_(m) = PBD + 2,25 AGD + CNFD + FDND - 7

Na Tabela 8 são apresentadas as estimativas do percentual de NDT para os alimentos volumosos e para as camas de frango.

Tabela 8 – Estimativas do percentual da proteína bruta digestível (PBD), ácidos graxos digestíveis (AGD), carboidratos não fibrosos digestíveis (CNFD), fibra em detergente neutro digestível (FDND) e nutrientes digestíveis totais (NDT) obtidas para alimentos volumosos, em porcentagem da matéria seca

Alimentos	PBD	AGD	CNFD	FDND	NDT _(m) *
Capim-braquiária	6,21	0,77	13,85	50,53	64,35
Capim-braquiaraão	5,56	0,00	6,65	44,07	49,29
Capim-braquiária do brejo	6,43	0,00	22,37	40,54	62,33
Capim-gordura	6,12	0,20	24,08	40,89	64,29
Silagem de milho	6,78	6,28	25,51	31,46	63,03
Silagem de milho com inóculo	7,06	5,60	25,18	32,35	63,19
Silagem de sorgo	5,68	2,68	27,00	34,03	62,39
Silagem de sorgo com inóculo	5,33	2,61	24,68	35,69	61,32
Silagem pré-seca de capim-tifton	16,47	3,24	13,23	35,79	61,72
Feno capim-tifton	18,56	0,79	10,16	38,47	60,97
Cama de frango de casca de café	12,75	1,91	24,55	28,64	60,85
Cama de frango de capim-elefante	13,30	0,65	21,00	26,99	54,95
Cama de frango de cepilha de madeira	13,47	0,00	19,98	24,94	51,39

*NDT_(m) = PBD + 2,25 AGD + CNFD + FDND - 7

Observou-se que os valores de NDT variaram de 49,29% até 64,35% para o capim-braquiaraão e braquiária, respectivamente. Os resultados do NDT para o capim-gordura foram próximos aos relatados por CAPPELLE (2000) de 60,20%.

As estimativas do NDT para a silagem de milho foram próximas às relatadas pelo NRC (2001) e CAPPELLE (2000) de 65% e 63,03%, respectivamente. Com relação a silagem de sorgo e o feno de capim-tifton os resultados foram próximos aos relatados pelo NRC (2001) de 56,7% e 55,30%. CAPPELLE (2000) relatou 61% para as estimativas do NDT das camas de frango, resultados semelhantes foram encontrados neste estudo.

Conclusões

A digestibilidade intestinal da proteína não degradada no rúmen dos alimentos avaliados não foi constante. O método dos inibidores estimou melhor a PDR e o método de três estágios prediz com eficiência a digestibilidade intestinal da proteína não

degradada no rúmen. Sugerem-se mais pesquisas para recomendar a estimativa do $NDT_{(m)}$ dos alimentos através das equações do NRC (2001).

Referências Bibliográficas

- AGRICULTURAL AND FOOD RESEARCH COUNCIL - AFRC. 1992. Nutritive requirements of ruminant animals: protein. *Nut. Abst. Rev. B.*, 62(12):787-817.
- AGRICULTURAL RESEARCH COUNCIL - ARC. 1984. Report of the protein group of the Agricultural Research Council working party on the nutrient requirements of ruminants. Supplement. 1. Survey: The Gresham Press. 45p.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS- AOAC, 1990. *Official methods of analysis*. 15. ed Arlington; v.1. 117 p.
- BHAGAVAN, N. V. 1977. *Bioquímica*. 1.ed. Rio de Janeiro, Brasil. Ed. Interamericana. 817p.
- BRODERICK, G. A. 1987. Determination of protein degradation rates using a ruminal in vitro system containing inhibitors of microbial nitrogen metabolism. *Br. J. Nutr.* 58:463.
- CABRAL, L. S. 1999. *Cinética ruminal das frações de carboidratos e proteínas e digestão intestinal da proteína de alimentos por intermédio de técnicas in vitro*. Viçosa: UFV, 1999. 80p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) Universidade Federal de Viçosa.
- CALSAMIGLIA e STERN. 1995. A three-step in vitro procedure for estimating intestinal digestion of protein in ruminants. *J. Anim. Sci.* 73:1459-1465.
- CASTILLO, A. M. A. 1992. *Avaliação da degradabilidade ruminal e da digestibilidade intestinal de vários alimentos, utilizando-se a técnica do saco de náilon móvel*. Viçosa: UFV, 1992. 108 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) Universidade Federal de Viçosa.
- CLARK, J. H., MURPHY, M. R., CROOKER, B.A. 1987. Supplying the protein needs of dairy cattle from by-products feeds. *J. Dairy. Sci.* 70:1092.
- COZZI, G., ANDRIOGHETTO, I., BERZAGHI, P, et al. 1995. In situ ruminal disappearance of essential amino acids in protein feedstuffs. *J. Dairy. Sci.* 78:161.
- DE BOER, G., MURPHY, J. J., KENNELLY, J. J. 1987. Mobile nylon bag for estimating intestinal availability of rumen undegradable protein. *J. Dairy. Sci.* 70:977-982.
- ENGLAND, M. L., BRODERICK, G. A., SHAVER, R. D., et al. 1997. Comparison of in situ and in vitro techniques for measuring ruminal degradation of animal by-product proteins. *J. Dairy. Sci.* 80:2925-2931.
- FRYDRYCH, Z. 1992. Intestinal digestibility of rumen undegraded protein of various feeds as estimated by the mobile bag technique. *Anim. Feed Sci. Technol.* 37:161-172.
- HARRIS, B. Jr., DORMINEY, D. E., SMITH, W. A., et al. 1992. Effects of feather meal at two protein concentrations and yeast culture on production parameters in lactating dairy cows. *J. Dairy. Sci.* 75:3524-3530.
- HVELPLUND, T., WEISBJERG, M. R., ANDERSON, L. S. 1992. Estimation of the true digestibility of rumen undegraded dietary protein in the small intestine of ruminants by the mobile bag technique. *Acta. Agric. Scand. Sect. A Anim. Sci.* 42:34

- KENDALL, E. M., INGALLS, J. R., BOILA, J. R. 1991. Variability in the rumen degradability and postruminal digestion of the dry matter, nitrogen and amino acids of canola meal. *Can. J. anim. Sci.* 71:739.
- KUNG, L. Jr., TUNG, R. S., CARMEAN, B. R. 1992. Rumen fermentation and nutrient digestion in cattle fed diets varying in forage and energy source. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 39:1-12
- LICITRA, G., HERNANDEZ, T. M., VAN SOEST, P. J. 1996. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 57:347-358.
- LONDOÑO HERNÁNDEZ, F. I., BONECARRERE, S. L. M., VIEIRA, R. A., et al. 1998. Desaparecimento ruminal e digestibilidade intestinal e total da matéria seca e proteína bruta de alguns suplementos concentrados. *R. Bras. Zootec.* 27(4):777-782.
- LONDOÑO HERNÁNDEZ, VALADARES FILHO, S. C., MANCIO, A. B., et al. 2000. Validação do método de inibidores in vitro para estimação da degradação da proteína de alimentos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 37, 2000, Viçosa. *Anais...* Minas Gerais:SBZ, 2000, p.498.
- MAIGA, H. A., SCHINGOETHE, J. D., HENSON, J. E. 1996. Ruminal degradation, amino acid composition, and intestinal digestibility of the residual components of five protein supplements. *J. Dairy Sci.* 79:1647-1653.
- MASOERO, F., FIORENTINI, L., ROSSI, F. et al. 1994. Determination of nitrogen intestinal digestibility in ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 48(3,4):237-264.
- MCCARTHY, R. D., KLUSMEYER, T. H., VICINI, J. L., et al. 1989. Effects of source of protein and carbohydrate on ruminal fermentation and passage of nutrients to the small intestine of lactating cows. *J. Dairy. Sci.* 72:2002-2016.
- MCDONALD, P., EDWARDS, R. A., GREENHALGH, J. F. D. 1988 *Animal nutrition* 4th edn. Longman. New York, 543p.
- MCDONALD, I. W., HALL, R. J. 1957 *Biochemical Journal.* 67:400-405.
- MERCHEN, N. R., ELIZALDE, J. C., DRACKLEY, J. K. 1997. Current perspective on assessing site of digestion in ruminants. *J. Anim. Sci.* 75:2223-2234.
- NEUTZE, S. A., SMITH, R. L., FORBES, W. A. 1993. Application of an inhibitor in vitro method for estimating rumen degradation of feed protein. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 40:251-265.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. 2001. Nutrient requirements of dairy cattle. 7th revised ed. Washington, D. C. National Academic Press. 381p.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. 1985. Ruminant nitrogen usage. National Academy Press, Washington, DC. 138p.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. 1984. Nutrient requirements of beef cattle. 6 ed. Washington, DC. 90p.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. 1988. Nutrient requirements of dairy cattle. 6th edn. National Academy Press, Washington, DC.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. 1989. Nutrient requirements of dairy cattle. 6th revised edn (update 1989) National Academy Press, Washington, DC. 157p.
- PICHARD, G., VAN SOEST, P. J. 1977. Protein solubility of ruminant feeds. Page 11 In: PROC. CORNELL NUTR. CONF.
- POOS-FLOYD, M., KLOPFENSTEIN, T., BRITTON, R. A. 1985. Evaluation of laboratory techniques for predicting ruminal protein degradation. *J. Dairy. Sci.* 68:829-839.

- RAAB, L., CAFANTARIS, B., JILG, T., MENKE, K. H. 1983. Rumen protein degradation and biosynthesis. 1. A new method for determination of protein degradation in rumen fluid in vitro. *Br. J. Nutr.* 50:569-582.
- RAMOS, S. M., VALADARES FILHO, S. C., COELHO DA SILVA, J. F., et al. 1995. Digestibilidade intestinal dos alimentos com a técnica de saco de náilon móvel em novilhos cecocolotomizados. In: REUNIÃO ANUAL DA SBZ, 32, 1995, Brasília-DF, *Anais...*Brasília:SBZ p.247-249.
- RAE, R. C., SMITHARD, R. R. 1985. Estimation of true nitrogen digestibility in cattle by a modified nylon bag technique. *Proc. Nutr. Soc.* 44:116A.
- STERN, M. D., ORTEGA, M. E., SATTER, L. D.1983. Retention time in rumen and degradation of protein supplements fed to lactating dairy cattle. *J. Dairy. Sci.* 66:1264.
- STERN, M. D., CALSAMIGLIA, S., ENDRES, M. I. 1994. Dynamics of ruminal nitrogen metabolism and their impact on intestinal protein supply. In: PROCEEDINGS. CORNELL NUTRITION CONFERENCE FOR FEED MANUFACTURES. 1994. Ithaca. *Proceedings...* Ithaca: Cornell University, p105-116.
- STERN, M. D., BACH, A., CALSAMIGLIA, S.1997. Alternative techniques for measuring nutrient digestion in ruminants. *J. Anim. Sci.* 75:2256-2276.
- SNIFFEN, C. J., O'CONNOR, J. D., VAN SOEST, P. J., et al. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II Carbohydrate and protein availability. *J. Anim. Sci.* 70:3562-3577
- TITGEMEYER, E. C., MERCHEN, N. R., BERGER, L. L. 1989. Evaluation of soybean meal, corn gluten meal, blood meal and fish meal as sources of nitrogen and amino acids disappearing from the small intestine of steers. *J. Anim. Sci.* 67:262-275
- VALADARES FILHO, S. C. 1995. *Eficiência de síntese de proteína microbiana, degradação ruminal e digestibilidade intestinal da proteína bruta, em bovinos.* In: SIMPOSIO INTERNACIONAL SOBRE EXIGÊNCIAS NUTRICIONAIS DE RUMINANTES. 1995, Viçosa. *Anais...* Minas Gerais:SBZ, p.355-388.
- VAN SOEST, P. J., SNIFFEN, C. J.1984. Nitrogen fractions in NDF and ADF. *Distiller's Feed Conf.*, Cincinnati, OH, 39:72-82.
- VAN STRAALLEN, W. M., TAMMINGA, S. 1990. *Feedstuffs evaluation.* J. Wiseman., D. J. A. Cole, ed. Butterworths, 105p London, England.
- ZERBINI, E., POLAN, C.1985. Protein sources evaluated for ruminating holstein calves. *J. Dairy. Sci.* 68:1416-1424.

RESUMO E CONCLUSÕES

Os objetivos desta tese foram: estimar os parâmetros cinéticos da degradação da proteína de vários alimentos utilizando o método dos inibidores; avaliar os parâmetros cinéticos da degradação da proteína por meio da técnica de produção de gás e amônia e determinar a degradabilidade ruminal e a digestibilidade intestinal de vários alimentos utilizando duas técnicas *in vitro*.

No primeiro experimento, foram estimadas as taxas de degradação dos compostos nitrogenados de 24 alimentos concentrados e 14 volumosos, utilizando o método de inibidores *in vitro*. Foi determinado o desaparecimento dos compostos nitrogenados dos alimentos nos tempos de 0 e 2 horas, incubados na quantidade de 1,875 mg de N para cada tubo de ensaio. As estimativas das taxas de degradação variaram de 0,035/h até 0,527/h para os concentrados e de 0,005/h até 0,148/h para os volumosos e mostraram que os alimentos promil, caseína, grão de amendoim moído, cama de frango contendo casca de café e a raspa de mandioca possuem proteínas de rápida degradação, sendo as mais lentas degradações observadas para o fubá de milho, a farinha de carne, a cama de

frango de capim-elefante, a levedura de cana de açúcar e a farinha de penas. Concluiu-se que o método foi eficiente na avaliação da cinética ruminal da proteína dos alimentos concentrados e que as taxas de degradação de alguns alimentos volumosos foram subestimadas.

No segundo experimento, realizaram-se determinações químicas e estudos sobre a cinética ruminal dos compostos nitrogenados de 24 alimentos concentrados e 10 volumosos, utilizando as medições das concentrações de nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético e a produção de gás. A degradação dos compostos nitrogenados dos alimentos foi determinada nos tempos 6 e 12h, incubando-se 1,875 mg de N com 0, 33, 67 e 100 mg de amido. As estimativas de degradação, nos tempos 6 e 12 horas, mostraram que: promil, caseína, grão de amendoim moído, raspa de mandioca, silagem de sorgo com e sem inóculo, silagem de milho e o capim-gordura apresentaram proteínas de rápida degradação. A mais lenta degradação foi observada para os alimentos levedura de cana de açúcar, farinha de penas, farinha de peixe, cama de frango contendo cepilha de madeira e o capim-braquiária. Neste estudo, concluiu-se que as estimativas foram maiores às observadas previamente em alimentos volumosos com o método de inibidores, sugerindo-se utilizar o tempo de 12 horas para avaliação dos alimentos concentrados e 6 horas para os volumosos.

No terceiro experimento, foram avaliadas a degradabilidade ruminal e a digestibilidade intestinal de 19 alimentos concentrados, 6 rações comerciais e 4 alimentos volumosos, usando o método de inibidores com digestão intestinal, (HCL-pepsina-pancreatina), e o método de três estágios. No método dos inibidores cada alimento foi incubado nos tempos 0 e 2 horas, na quantidade de 1,875 mg de N para três tubos de incubação, sendo um deles deixado para avaliação da digestão intestinal. No segundo método, aproximadamente 5 g da amostra de cada alimento foram incubados

durante 16 horas no rúmen de bovino recebendo dieta com 60% de volumoso e 40% de concentrado. Uma quantidade de 15 mg de N residual do rúmen de cada alimento foi colocada em tubos de digestão (frascos de 50 mL) para serem incubados em HCL-pepsina-pancreatina durante 25 horas. Concluiu-se que a digestibilidade intestinal da proteína não degradada no rúmen dos alimentos avaliados não foi constante. O método dos inibidores estimou melhor a PDR e o método de três estágios prediz com eficiência a digestibilidade intestinal da proteína não degradada no rúmen. Sugerem-se mais pesquisas para recomendar a estimativa do $NDT_{(m)}$ dos alimentos através das equações do NRC (2001).

APÉNDICE

APÊNDICE

APÊNDICE 1A - Cálculos para determinação da cinética ruminal pelo método dos inibidores de acordo com a planilha do excel

Cálculo do nitrogênio após incubação:

N-solúvel em TCA para 0 e 2h.

$$\text{N- no tubo (mg)} = \frac{V \times N \times F \times 14}{X_1} \text{ :mg de N----- 2mL}$$

X₁ -----16,25 mL no tubo

$$X_1 = \text{mg de N no tubo}$$

$$\text{N - no branco (mg)} = \frac{V \times N \times F \times 14 \times 100}{X_2} \text{ :mg de N----- 2mL}$$

X₂ -----16,25 mL

$$X_2 = \text{mg de N no branco}$$

onde V= volume do HCL da titulação e N= normalidade do HCL

$$\text{N total solúvel em TCA, corrigido (mg)} = X_1 - X_2$$

$$\text{LnFID}_{0h} = \text{Ln}(1 - ((\text{Ncorrigido } 0h)) / 1,875);$$

$$\text{LnFID}_{2h} = \text{Ln}(1 - ((\text{Ncorrigido } 2h)) / 1,875);$$

$$\text{Taxa de degradação Kd (/h), (X)}_{Kd} = - (\text{LnFID}_{2h} - \text{LnFID}_{0h}) / 2$$

$$(Y)_{Kd} = \text{média das observações de Kd};$$

$$\text{Corrigido (corrected)} = (\text{LnFID}_{2h} + \text{LnFID}_{0h}) * Kd;$$

$$\text{Fração B ou intercepto (\%)} = \text{Exp}(\text{LnFID}_{0h}) * 100;$$

$$\text{Escape estimado Pe (\%), (X)}_{Pe} = B * (0,05 / (Kd + 0,05))$$

$$(Y)_{Pe} = \text{média das observações de Pe};$$

Para calcular a soma dos quadrados dos desvios se procede da seguinte forma:

se estabelece $\sum (Y_{Kd} - Y_{m\u00e9dia})^2$ e $\sum (Y_{estimada} - Y_{m\u00e9dia})^2$

P/cada observa\u00e7\u00e3o, $(Y \text{ de } Kd - X \text{ m\u00e9dia de } Kd)^2$ e $(\text{Corrigido} - Y \text{ m\u00e9dia de } Kd)^2$

ap\u00f3s, fazemos a soma **SQD_{Kd}** e **SQD corrigidos**

onde, SQD \u00e9 a soma dos quadrados dos desvios;

uma vez feitas as somas procedemos a calcular os valores de a e b da equa\u00e7\u00e3o

$$a = \{ \text{PROJ. LIN}(\sum P_e Y); (\sum P_e X) \}$$

$$b = \{ \text{PROJ. LIN}(\sum Y \text{ da } Kd); (\sum X \text{ de } Kd) \}$$

e por \u00faltimo procedemos a calcular o $r^2 = (\text{SQD de } Kd / \text{SQD Corrigidos})$, atrav\u00e9s dele saberemos o ajuste dos dados.

APÊNDICE 2A - Cálculos para determinação da cinética ruminal pelo método de produção de gás de acordo com a planilha do excel

Calculamos o nitrogênio após incubações de 6 e 12h:

N-solúvel em TCA para 6 e 12h.

$$\text{N- no tubo (mg)} = V \times N \times F \times 14 \text{ -----:mg de N----- 2mL}$$

$$X_1 \text{ -----11,1 mL no tubo}$$

$$X_1 = \text{mg de N no tubo após 6 ou 12h}$$

medimos a pressão do gás após 6 e 12h;

$$\text{Pressão} = (V - B - b) \times 8,67; \text{ onde, } V = \text{valor do gás em Amper}$$

$$B = \text{marca no aparelho sem medição}$$

$$b = \text{resultado de N no tubo branco (sem amostra)}$$

$$8,67 \text{ calculado de acordo com PELL e SCHOFIELD (1993)}$$

Esses resultados serão colocados na planilha do excel, assim:

Amido	Tempo	N(mg)	Gás(mL)
0	6	x	x
33	6	x	x
67	6	x	x
100	6	x	x

Procedemos à fazer os cálculos para as equações de regressão para 6 e 12h:

$$\text{sendo } r^2 = (\text{CORREL}(\Sigma \text{ N mg}; \Sigma \text{ gás mL}))^2$$

$$\text{Coeficiente de regressão} = \text{INCLINAÇÃO } (\Sigma \text{ N}; \Sigma \text{ gás});$$

$$\text{Intercepto} = \text{INTERCEPÇÃO } ((\Sigma \text{ N}; \Sigma \text{ gás});$$

$$\text{N líquido ou N-NH}_3 \text{ líquido} = (\text{valor do INTERCEPTO} - \Sigma \text{ dos brancos});$$

$$\text{N adicionado} = 1,875 \text{ mg};$$

$$\text{Taxa de degradação, Kd (/h)} = \text{LN}(1 - \text{N líquido/ N adicionado}) / \text{tempo}$$

O procedimento para calcular a taxa de degradação às 12h é igual ao citado anteriormente.

Para incubar 100 tubos

Deve-se proceder da seguinte forma:

Um dia antes deverão ser preparadas as soluções e pesados os reagentes, os tubos de incubação deverão ser pesados, numerados e deixados na sala de incubação com os alimentos.

Preparar 650mL de solução McDougall pesando os seguintes componentes:

NaHCO₃ - 6,37 g

Na₂HPO₄ - 4,55 g

NaCL - 0,3055 g

KCL - 0,3705 g

CaCL₂ - 0,0325 g

MgSO₄ - 0,078 g;

Preparar 50mL de NaHCO₃ em água destilada (2 g/50mL);

100mL de solução McDougall com pectina (3,2 g/100mL), deverá ser deixada à noite na sala de incubação à 38 graus;

25mL de solução McDougall com sulfato de hidrazina (0,195 g/25mL);

25mL de solução McDougall com cloranfenicol (0,045 g/25mL);

Da solução de McDougall (650mL) serão utilizados 500mL para umedecer os alimentos (5mL por tubo). Isso deverá ser feito no dia da incubação durante 45 minutos;

Preparar TCA a 65% (65 g/100mL)

Preparar uma solução de NaOH 3N (3g em 25mL) para manter o pH do meio entre 6,7 e 6,9

Dia da Incubação:

Coletar 800mL de líquido ruminal em garrafa térmica limpa e morna, filtrando em 2 camadas de gaze;

Adicionar a solução com pectina, o amido (3,2 g), xilose (3,2 g), maltose (6,4 g) e antiespumante (0,16mL), depois coloque a solução de NaHCO₃. Faça a pré-incubação e logo adicione, primeiro cloranfenicol, depois o sulfato de hidrazina e por último o mercaptoethanol (0,234mL). Ao finalizar coloque o TCA e leve os tubos à geladeira.

APÊNDICE 4 A - Preparo de soluções para o método de produção de gás

Para incubar 100 tubos:

Coletar 200mL de líquido ruminal em têrmica limpa e morna, filtrando em 2 camadas de gaze;

Preparar 800mL do meio fermentador da seguinte forma:

400mL - pesar 1 g de trypticase, colocar 0,1 mL da solução de microminerais e adicionar água destilada;

200mL de solução tampão - pesar 0,8 g de bicarbonato de amônia e 7 g de bicarbonato de sódio;

200mL de solução de macrominerais - pesar 1,15 g de fosfato de sódio, 1,25 g de KH_2PO_4 e 0,1 g de sulfato de magnésio;

Preparar uma solução redutora com: 0,64 g de cisteina-HCL, 0,64 g de sulfeto de sódio $\text{Na}_2\text{S}_9\text{H}_2\text{O}$ adicionando 4mL de NaOH 1N.

A solução de microminerais deverá ser feita de acordo com MENKE et al. (1979), pesar 8,0 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1,0 g de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10 g de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e 13,2 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ adicionando 100mL de H_2O destilada.

APÊNDICE 5 A - Preparo de soluções para o método de três estágios

Preparar as seguintes soluções

1 - Solução HCL-Pepsina

Num becker de 500mL colocar 4,16mL de HCL, estabilizar o pH até 1,9 e logo adicionar 0,5 g de pepsina;

2 - Solução 1N de NaOH (1 g/25mL)

3 - Solução de pancreatina

Num becker de 1000mL colocar 87,09 g de KH_2PO_4 , adicionar 50 mg de thymol e 3 g de pancreatina

4 - Solução de TCA 100% (100 g/100mL)