

LEIDIMARA FEREGUETI COSTA

**DETERMINAÇÃO DAS PERDAS ENDÓGENAS E DIGESTIBILIDADE ILEAL
DOS AMINOÁCIDOS COM SUÍNOS UTILIZANDO DUAS TÉCNICAS**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2005

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

T

C837d
2005

Costa, Leidimara Feregueti, 1976-

Determinação das perdas endógenas e digestibilidade ileal dos aminoácidos com suínos utilizando duas técnicas / Leidimara Feregueti Costa. – Viçosa : UFV, 2005. viii, 36f. : il. ; 29cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Darci Clementino Lopes.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 28-31.

1. Suíno - Alimentação e rações. 2. Suíno - Nutrição.
3. Rúmen - Fermentação. 4. Proteínas - Metabolismo.
5. Aminoácidos - Metabolismo. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.


CDD 22.ed. 636.4085

LEIDIMARA FEREGUETI COSTA

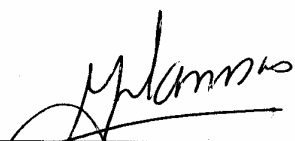
**DETERMINAÇÃO DAS PERDAS ENDÓGENAS E DIGESTIBILIDADE ILEAL
DOS AMINOÁCIDOS COM SUÍNOS UTILIZANDO DUAS TÉCNICAS**

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

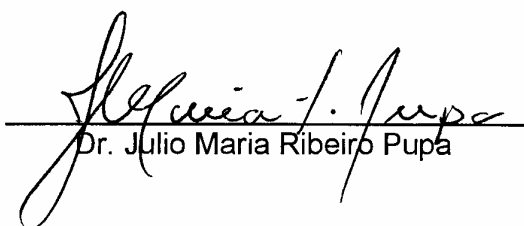
APROVADA: 24 de fevereiro de 2005.



Prof. Horacio Santiago Hostagno
(Conselheiro)



Dr.ª Melissa Izabel Hannas
(Conselheiro)



Dr. Julio Maria Ribeiro Pupa



Prof. Luiz Fernando T. Albino



Prof. Darci Clementino Lopes
(Orientador)

Aos meus pais, Edimar e Lenir.
Aos meus irmãos, Cima, Jú e Néia,
pelo carinho, pelo apoio e pela compreensão para
que eu pudesse atingir mais um objetivo.

*Sem sonhos, as perdas se tornam insuportáveis,
as pedras dos caminhos se tornam montanhas, os
fracassos se transformam em golpes fatais,
Mas se você tiver grandes sonhos...
Seus erros produzirão crescimento, seus
desafios produzirão oportunidades, seus
medos produzirão coragem.*

Augusto Cury

AGRADECIMENTO

A Deus, pela força e por me fazer seguir adiante.

À minha mãe, pelas preocupações, pelos conselhos e pelo incentivo em todos os momentos.

Ao meu pai, pela certeza de poder contar sempre com a sua ajuda e pelos ensinamentos de força e trabalho.

Aos meus irmãos, pela presença em minha vida, pela confiança, amizade e compreensão.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Zootecnia, por tornar possível a realização deste curso.

Ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão da bolsa de estudos.

À “família” Allnutri, em especial ao Dr. Júlio Maria Ribeiro Pupa e à Dr^a Melissa Izabel Hannas, pela valiosa contribuição, pelas sugestões para realização deste trabalho, pela participação da banca de defesa de tese, pelo convívio, pelo exemplo profissional e pela oportunidade de aprendizado.

Ao meu orientador, Prof. Darci Clementino Lopes, que foi sempre um paião, pela orientação, confiança e amizade.

Aos demais professores do Departamento de Zootecnia, principalmente aos professores Horácio Santiago Rostagno e Luis Fernando Albino, pelas sugestões e pela participação da banca examinadora.

Aos amigos e estagiários, Mariana, Serginho, Guilherme, Rafael e Mosquito, entre outros, pela fiel amizade e pela ajuda na realização das pesquisas.

Ao amigo Anderson Corassa, pela dedicada convivência, pelo apoio e pelos conselhos.

Às minhas amigas (em ordem alfabética), Cibele Minafra, Jane, Larisa, Brum, Marcela e Patrícia Bhering, pela paciência e por se tornar meu ponto de apoio em Viçosa, pelo carinho e, principalmente, pela confiança e amizade verdadeira. Tenho certeza de que seremos amigas pra sempre.

Aos amigos da Zôo 98, Alex, Bruno, Fabrício, Fred, Lídson, Fefê e Mario Chizzotti, Rafa, Vini, Wil e aos demais amigos do DZO, pelos bons papos e pela amizade.

Aos funcionários do DZO/UFV, em particular a Adilson, Celeste, Márcia, Rosana e Venâncio, Monteiro, Vera, Valdir, Fernando e Fernanda, pelo auxílio e pela amizade.

Aos funcionários do Setor de suinocultura e avicultura/DZO, em especial ao Dedeco, pela valiosa colaboração para realização das pesquisas, pela amizade e pela paciência.

BIOGRAFIA

LEIDIMARA FEREGUETI COSTA, filha de Edimar dos Santos Costa e Lenir Feregueti Costa, natural de Colatina, Espírito Santo, nasceu em 10 de dezembro de 1976.

Em setembro de 2002, formou-se em Zootecnia pela Universidade Federal de Viçosa.

Em fevereiro de 2003, iniciou o Programa de Pós-Graduação do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, em nível de Mestrado, concentrando seus estudos na área de Nutrição de Monogástrico.

Em 24 de fevereiro de 2005, submeteu-se ao exame final de defesa de tese, para obtenção do título de *Magister Scientiae*, também na Universidade Federal de Viçosa.

CONTEÚDO

	Página
RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Técnica de determinação de digestibilidade de proteína e de aminoácidos.....	4
2.2. Fatores que influenciam a digestibilidade de proteínas e aminoácidos.....	5
2.3. Digestibilidade ileal aparente <i>versus</i> verdadeira	6
2.4. Técnica para determinação das perdas endógenas de proteínas e de aminoácidos em suínos.....	7
2.5. Fatores que influenciam as perdas endógenas de proteínas e aminoácidos.....	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
5. CONCLUSÕES	27
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28
APÊNDICE	32

RESUMO

COSTA, Leidimara Feregueti, M.S., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro, 2005. **Determinação das perdas endógenas e digestibilidade ileal dos aminoácidos com suínos utilizando duas técnicas.** Orientador: Darci Clementino Lopes. Conselheiros: Horacio Santiago Rostagno e Melissa Izabel Hannas.

Conduziu-se um experimento com o objetivo de determinar os coeficientes de digestibilidade ileal verdadeiro da proteína e dos aminoácidos digestíveis de um concentrado protéico, utilizando duas técnicas: dieta isenta de proteína (DIP) e dieta com caseína hidrolisada enzimaticamente (*Casein Hydrolysed Enzymatically* - CHE), para determinação das perdas endógenas de proteína, de aminoácidos e de nitrogênio, Foram utilizados 12 suínos mestiços, machos, castrados, com o peso médio de 35 kg, submetidos previamente à cirurgia para implantação da cânula "T" simples. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com três tratamentos, quatro repetições e um animal por unidade experimental. Os tratamentos foram constituídos por: tratamento 1. dieta com CHE, tratamento 2; dieta isenta de proteína e tratamento; e 3. dieta com 23% do concentrado protéico teste. Comparando as duas técnicas a utilização da CHE proporcionou aumento dos valores estatísticos das perdas endógenas para proteína bruta de 4,57% e para os aminoácidos glutamina, serina e cistina ($P < 0,01$) e para os aminoácidos arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina,

valina, alanina, ácido aspártico e tirosina ($P < 0,05$); no entanto para os aminoácidos triptofano, glicina e prolina não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$). Os coeficientes de digestibilidade ileal verdadeiro dos aminoácidos metionina, treonina, triptofano e serina que foram determinados pelas perdas endógenas com dieta contendo CHE foram superiores estatisticamente àqueles em que se utilizaram as perdas endógenas com DIP. As quantidades das secreções protéicas e de aminoácidos obtidas pela técnica da CHE foram superiores às obtidas pela técnica da DIP. Os coeficientes de digestibilidade verdadeira da proteína foram inferiores, e os dos aminoácidos, superiores, quando determinados pelo método da CHE.

ABSTRACT

COSTA, Leidimara Feregueti, M.S., Universidade Federal de Viçosa, February 2005. **Different techniques to estimate endogenous protein and aminoacid losses and determination of true ileal digestibility coefficients of aminoacids for swines.** Adviser: Darci Clementino Lopes. Committee members: Horacio Santiago Rostagno and Melissa Izabel Hannas.

The objective of this study was to compare two endogenous losses determination techniques for protein, aminoacid and nitrogen, the diet without protein (DIP) and enzyme-hydrolysed casein (CHE) techniques, to evaluate the true digestibility coefficients of proteins and digestible aminoacid of the protean nucleus tested. Twelve half-breed male swine were used, castrated at 35 kg of weight, previously submitted to a surgery for implantation of the simple "T" stem. The experimental delineation was entirely random with 3 treatments, 4 repetitions and one animal as experimental unit. The treatments were constituted of: treatment 1 containing diet with enzyme-hydrolysed casein (CHE), treatment 2, diet without protein (DIP) and treatment 3 diet containing 23% of the protean nucleus tested. The real digestibility coefficient values of the brute protein were higher when determined through the DIP technique. However there were significant statistical differences for the aminoacids glutamine, serine and cystine ($P < 0.01$) and for arginine, hystidin, isoleucin, leucin, lysine, metyonine, phenylalanine, threonyne, valin, alanine, aspartic acid and tyrosine ($P < 0.05$). For tryptofan, glycin, and proline there were no significant differences ($P > 0.05$). The amounts of protein and amino acids secretions obtained by the CHE technique were superior to obtained by the DIP technique the coefficients of real protein digestibility were inferiors and the coefficients of real amino acid digestibility were superiors.

1. INTRODUÇÃO

O mercado mundial de rações está em constante crescimento e, dessa forma, desafiando o nutricionista a elaborar rações com alimentos diversificados e que forneçam, a um custo mínimo, a quantidade adequada de nutrientes essenciais à *performance* ótima do animal. Em razão disso, o estudo da composição química e biológica dos ingredientes é fundamental para a melhoria da qualidade das rações. No entanto, os ingredientes usados na alimentação animal, têm mudado constantemente, tanto do ponto de vista genético como por ações deletérias de micotoxina, originadas na fase de pós-colheita dos grãos, fatores antinutricionais ou, ainda, pelas técnicas de processamento de ingredientes, modificando a qualidade/digestibilidade dos nutrientes dos ingredientes.

É essencial o conhecimento do valor nutritivo dos alimentos para que seu uso seja otimizado, propiciando formulações de rações de máxima eficiência. A composição química dos alimentos, obtida nas análises laboratoriais, apesar de fornecer subsídios preciosos para a nutrição, descreve apenas o valor potencial dos alimentos, sendo necessário, ainda, o conhecimento da digestibilidade, que expressa a porção dos nutrientes absorvida pelo animal.

Os suínos demandam não só proteína bruta, mas como também aminoácidos contidos em estruturas protéicas, os quais são classificados em

essenciais e não-essenciais, conforme a capacidade de serem produzidos ou não metabolicamente no organismo animal. Contudo, os aminoácidos fornecidos na dieta e quantificados quimicamente nem sempre são utilizados metabolicamente pelo animal, podendo variar desde o processamento ao qual o alimento foi submetido até as diferentes metodologias para estimar os coeficientes de digestibilidade dos nutrientes.

Há uma diversificação quanto ao número de métodos usados na determinação da qualidade das proteínas, o que inclui a via da digestibilidade e disponibilidade dos aminoácidos. A digestibilidade aparente dos aminoácidos é definida como a porção do nutriente do alimento fornecido que “desaparece” no trato digestivo. Quando se consideram as perdas endógenas e metabólicas, são estimados os valores de digestibilidade verdadeira dos aminoácidos. Já a disponibilidade é a porção de um aminoácido no alimento que é digerida, absorvida e utilizada para a síntese de proteínas.

Normalmente, as rações usadas na determinação das perdas endógenas de proteínas e aminoácidos é a dieta isenta de proteína, considerando que todo aminoácido encontrado na digesta é referente ao aminoácido de origem endógena. No entanto, o organismo animal não está no seu estado metabólico normal, principalmente nas exigências protéicas, ocorrendo dessa forma mobilização de proteína corpórea e de enzimas, o que será quantificado como perdas endógenas, implicando no aumento dos aminoácidos circulantes, subestimando os coeficientes de digestibilidade dos alimentos.

Uma outra técnica mais moderna é o uso de uma dieta cuja única fonte protéica é a caseína enzimaticamente hidrolisada, é utilizada na determinação das perdas endógenas. Esta é composta de aminoácidos livres e pequenos peptídeos, com peso molecular inferior a 5.000 Da. A técnica presume que o consumo de dieta contendo proteína possibilita o funcionamento fisiológico normal do organismo animal e que todo nitrogênio componente da proteína endógena possua peso molecular maior que 10.000 Da, podendo ser separado através de centrifugação e ultrafiltração da fração não absorvida dos aminoácidos da dieta com caseína.

Diante da necessidade de determinar com maior precisão a digestibilidade verdadeira dos aminoácidos presentes nos alimentos, este

trabalho foi realizado com o objetivo de comparar duas técnicas de determinação das perdas de proteína, aminoácidos e nitrogênio endógenos, a dieta isenta de proteína (DIP) e a caseína hidrolisada *enzimaticamente* (*Casein Hydrolysed Enzyme – CHE*), a fim de avaliar os coeficientes de digestibilidade verdadeira da proteína e dos aminoácidos digestíveis de um alimento concentrado protéico testado em suínos na fase de crescimento.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Técnica de determinação de digestibilidade de proteína e de aminoácidos

Os procedimentos mais utilizados para determinar a digestibilidade *in vitro* das proteínas e dos aminoácidos nos alimentos são: método químico, digestibilidade em pepsina, técnica multienzimática, solubilidade em hidróxido de potássio (KOH) e reflectância no infravermelho próximo (NIR). Entretanto, essas técnicas não são usadas freqüentemente, não apresentando valores correlacionados com os determinados *in vivo* segundo PARSONS (1985), a crítica feita às técnicas *in vitro*, é o fato de não possuírem condições dinâmicas e complexas do organismo animal e, normalmente, apresentarem metodologias com procedimentos de difícil aplicação, dificultando sua utilização.

Para determinação da digestibilidade ileal *in vivo* em suínos, as técnicas mais utilizadas são: método do sacrifício ou abate, cânula T simples, cânula pós-valvular em T (PVTC), cânulas reentrantes e anastomose íleo-retal. Na determinação da digestibilidade ileal é utilizado o fator de indigestibilidade, em que se faz necessário o uso de indicador, sendo normalmente usado o óxido crômico, relacionando o cromo adicionado à dieta com o determinado na digesta ileal. No caso da técnica de anastomose íleo-retal, em que se faz a coleta total de excretas, não é necessário o uso de indicador, sendo obtida a digestibilidade dos aminoácidos por intermédio da diferença entre ingerido e o excretado.

A digestibilidade ileal considera a absorção que ocorre até o final do íleo, próximo à válvula íleo-cecal, a qual elimina o efeito da ação do microrganismo da microflora do intestino grosso, onde ocorre modificação no perfil aminoacídico dos alimentos pela atividade microbiológica. A técnica se tornou conhecida e aceita para determinar a absorção aparente dos aminoácidos, porque as observações iniciais permitiram estabelecer que os aminoácidos que alcançam o intestino grosso têm pouco ou nenhum valor para satisfazer as exigências dos suínos. A proteína solúvel residual, os peptídeos e os aminoácidos que passam pelo intestino delgado no íleo são quebrados ou desanimados pela população microbiana do intestino grosso e absorvidos como amônia, aminas ou amidas (FAN et al., 1995), as quais são inúteis para a síntese protéica. O nitrogênio residual da absorção ileal, absorvido no intestino grosso, é dependente da fonte protéica (FAN et al., 1995), podendo variar entre 7 e 24% do nitrogênio total, como foi citado por BELLAVER (2003), sendo posteriormente excretado na urina.

2.2. Fatores que influenciam a digestibilidade de proteínas e aminoácidos

BELLAVER (2003), afirmou que a variabilidade nos dados sobre digestibilidade ileal é originada por fatores inerentes aos alimentos, como: inibidores de proteases, fito-hemo-aglutininas, fibra, oligossacarídeos, enzimas, tanino, tamanho da partícula e processamento.

Avaliando a utilização de metionina digestível ileal para suínos em crescimento, BATTERHAM et al. (1993) constataram maior resposta de crescimento e menor retenção ileal nos animais que receberam farelo de soja em comparação ao farelo de algodão. Esses resultados indicam que a metionina digestível do farelo de algodão foi ineficientemente utilizada e que os valores para digestibilidade ileal de metionina em concentrados protéicos que sofreram danos térmicos durante o tratamento são impróprios para formulação de dietas. Posteriormente, BATTERHAM et al. (1994a,b), estudando o uso de triptofano e isoleucina digestíveis, respectivamente, para suínos em crescimento, observaram diferenças na resposta dos animais alimentados com dietas formuladas para níveis similares de triptofano digestível ileal e que a isoleucina é menos susceptível aos efeitos do calor que outros aminoácidos

como lisina, treonina, metionina e triptofano; observaram também que a digestibilidade ileal da isoleucina pareceu mais apropriada que a de outros aminoácidos para a formulação de dietas com ingredientes que passaram por processamento térmico.

Valores de digestibilidade ileal são apropriados para estimar a digestibilidade de cereais, contudo, em alimentos como a farinha de carne que passa por tratamento térmico, existe diferença entre a digestibilidade e a disponibilidade de lisina, metionina, treonina e triptofano (WILLIANS, 1995).

2.3. Digestibilidade ileal aparente *versus* verdadeira

A digestibilidade aparente estima a quantidade de nutriente absorvido por comparação entre o consumido na dieta e o excretado e não leva em consideração as perdas endógenas de aminoácidos. Esses aminoácidos endógenos são derivados de proteínas não-digeridas, secreções digestivas e células intestinais. Já na digestibilidade verdadeira é incluída a correção para perdas endógenas; portanto, seus valores são maiores que os da digestibilidade aparente.

Foi constatado por DONKOH e MOUGHAN (1994) que a digestibilidade ileal aparente é influenciada pelo nível protéico da dieta, mas não quando se trata da digestibilidade ileal verdadeira, que oscilou de 76,9 a 78,2%, com dietas à base de farinha de carne e ossos contendo 25 a 20% de proteína. Assim, mesmo em quantidades diferentes de proteína na dieta, os ingredientes podem ser comparados, se usada a digestibilidade ileal verdadeira; e isso foi observado também por FAN e SAUER (1995), usando cevada como alimento de baixo teor protéico e farelo de canola como alimento de alto teor protéico. Estes autores concluíram que, para alimentos com alto teor de proteína, tanto a técnica de digestibilidade ileal como a de regressão podem ser usadas para estimar os teores de aminoácido. Para alimentos com baixo teor protéico, o método mais adequado foi o de regressão.

A digestibilidade aparente é afetada pelo nível da proteína bruta da dieta. Com dietas de baixo nível de proteína, os aminoácidos de origem endógena aparecem em maior proporção no total de aminoácidos próximos ao íleo terminal. Com a elevação do nível de proteína bruta, a proporção de

aminoácidos da fonte endógena diminui e a digestibilidade aparente da dieta aumenta. Assim, a digestibilidade aparente da dieta é subestimada se a dieta for de baixa proteína.

Estudando o efeito de diferentes níveis de proteína na utilização de lisina, com base na soma da digestibilidade ileal aparente da lisina, DE LANGER e FULLER (1996) observaram que, com o aumento do nível de proteína bruta na dieta de 100 para 300 g/kg os valores das digestibilidades ileal e fecal aparente do N foram aumentados, provavelmente devido à alta proporção de N endógeno nas digestas de dietas com baixa proteína.

2.4. Técnica para determinação das perdas endógenas de proteínas e de aminoácidos em suínos

Um dos maiores impedimentos para a avaliação da qualidade da proteína e dos aminoácidos nos alimentos é quantificar a contribuição endógena no total da proteína da digesta ileal, para medição da proteína ileal verdadeira e digestibilidade de aminoácidos.

As fontes de proteína e aminoácidos endógenos consistem principalmente de enzimas digestivas, mucoproteínas, descamação da parede da mucosa, albumina, peptídeos, aminoácidos livres, aminas e uréia (MOUGHAN e SCHUTTER, 1991). De acordo com MOUGHAN (2003), as quantidades de nitrogênio total do corpo secretadas no trato digestivo em suínos na fase de crescimento, com média de 30 a 80 kg, variam em torno de 16 a 33 g por 24 horas, dos quais 75%, em média são hidrolisados e reabsorvidos antes de alcançarem o íleo distal, sendo os 25% restantes encaminhados para o intestino grosso, esse processo é denominado de reciclagem de proteína e aminoácidos endógenos (GRALA, 1998).

As técnicas mais utilizadas para determinar as perdas endógenas de proteína e aminoácidos em suínos são: uso de uma dieta isenta de proteína; uso de dieta com alimentos altamente digestíveis, como a da caseína láctea e do glúten de trigo; método de regressão; a caseína hidrolisada enzimaticamente; dieta livre de proteína com infusão de N-livre intravenosa. Há também a técnica de diluição de isótopos (MOUGHAN, 2003).

Na prática, segundo LAPLACE (1996), o uso de dietas isenta de proteína (DIP) para estimar o balanço de digestibilidade verdadeira é mais interessante, devido à maior facilidade e ao menor tempo gasto para a realização do experimento. O mensuramento da quantidade excretada quando é ingerida uma DIP fornece uma estimativa da quantidade de substâncias endógenas não-reabsorvidas. Assumindo que essa fração endógena excretada seja constante, o valor para a excreta no balanço aparente pode ser corrigido para calcular a digestibilidade verdadeira. No entanto, o não fornecimento de uma dieta o qual não está sendo fornecida nenhuma fonte de proteína proporciona um comportamento fisiológico do organismo animal, tanto na síntese enzimática como na protéica, diferente daquele de animais que consomem uma dieta com alguma fonte protéica.

HODGKINSON (2003) afirma que, em suínos que consomem uma DIP com a finalidade de determinar a excreção endógena de aminoácidos, há redução das secreções digestivas, gástricas e pancreáticas, diminuindo a síntese protéica e enzimática, tanto do intestino como a corpórea. Dessa forma, a diminuição na digestão e reabsorção da proteína e dos aminoácidos endógeno, acumulando esses componentes no íleo, resulta numa subestimação dos coeficientes de digestibilidade verdadeira das proteínas e dos aminoácidos dos alimentos.

De acordo com JANSMAN (2002), em animais alimentados com DIP por período prolongado observa-se aumento do nível de prolina na digesta, contribuindo, em alguns casos, com mais de 30% dos aminoácidos totais; isso pode ser considerado uma indicação de que o animal não se encontra em seu estado fisiológico normal.

O aumento do nível de prolina pode ser explicado, em parte, pela mobilização a proteína muscular, que é rica em glutamina, para atender às exigências de proteína e aminoácidos de manutenção (LANGE et al., 1989b). A glutamina é levada aos enterócitos no intestino delgado, sendo grande parte dela metabolizada e o nitrogênio é transportado para o fígado como citrulina, alanina, prolina e glutamato, para eventual síntese protéica.

Com o estresse fisiológico, ocorre aumento da produção de prolina. Nessas condições, há estímulo para produção de cortisol, aumentando a

degradação protéica. O cortisol é liberado na corrente sanguínea e pode aumentar a síntese da enzima pirrolina-5-carboxilato sintetase (P5C sintetase), produzindo pirrolina-5-carboxilato, dando origem à prolina. MARISCAL–LANDIM et al. (1995) sugerem que a atividade da enzima P5C sintetase é mais alta quando se comparada com da enzima que degrada a prolina.

Há evidências de que prolina, glicina, treonina, serina, ácido aspártico e glutamina são mais lentamente reabsorvidos na região ileal, o que pode explicar os altos valores desses aminoácidos nas secreções endógenas ileais (STEIN et al. 1999). JANSMAN et al. (2002) revisando sobre a utilização das técnicas da caseína hidrolisada enzimaticamente (CHE) e da DIP, observaram valores superiores na composição de aminoácidos da digesta ileal para isoleucina, treonina, valina, histidina, alanina, aspártico, serina e glutamina para a primeira técnica, destacando-se o aminoácido glutamina, com aumento de 8,40%, encontrado em digesta ileal de animais que consumiram CHE. Para os demais aminoácidos analisados, leucina, lisina, cistina, fenilalanina, tirosina, arginina, glicina e prolina, as perdas endógenas foram maiores na técnica DIP.

HODGKINSON et al. (2000) observaram redução do nível de cistina e de glicina em animais que consumiram DIP durante oito dias quando comparados àqueles que consumiram a dieta por um dia apenas. Ocorrem decréscimo na secreção de proteína ou de proteína ricas nos aminoácidos cistina e glicina, ou também aumento na reabsorção deste aminoácido na área digestiva, outra hipótese e que pode haver a combinação dos dois fatores, mas não foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos para esses dois aminoácidos.

Utilizando dietas com fontes de proteína altamente digestíveis, como a caseína láctea ou glúten de trigo, JANSMAN et al. (2002) assumiram que a digestibilidade verdadeira da proteína bruta e dos aminoácidos constituintes da matéria prima é de 99%, sendo este valor determinado pelo método de diluição 15N, por GRALA (1997).

OTTO et al. (2003) comparando as perdas endógenas utilizando um alimento altamente digestível, a caseína, com a DIP, observaram que os valores absolutos dos aminoácidos das perdas endógenas foram superiores para a DIP, com exceção dos aminoácidos não-essenciais glutamina e serina.

Os valores das perdas endógenas quando se utiliza a DIP estão de acordo com os de STEIN et al. (1999). Valores encontrados das perdas endógenas determinadas com dietas à base de caseína estão abaixo daqueles obtidos por BUTTS et al. (1993) e TRAYLOR et al. (2001), porém, no que se referem aos aminoácidos não foram observadas diferenças estatísticas entre as duas técnicas, exceto para os aminoácidos arginina, alanina e tirosina ($P < 0,05$).

A dieta com CHE é fornecida aos animais como única fonte protéica, sendo composta de aproximadamente 56% de aminoácidos livres e 41% de di e tripeptídeos com peso molecular inferior 5.000 Da. A técnica parte do pressuposto de que todo nitrogênio que compõe a proteína endógena possui peso molecular maior que 10.000 Da e que o consumo de dieta com proteína aproxima o funcionamento fisiológico normal do organismo animal. A técnica constitui-se de etapas de centrifugação e ultrafiltração permitindo que toda proteína, aminoácidos e pequenos peptídeos fornecidos na alimentação que não foram absorvidos, sejam eliminados do material que posteriormente será analisado.

Segundo DONKOH e MOUGHAN (1999), há diferença significativa ($P < 0,01$) para as perdas endógenas ileais dos aminoácidos entre as técnicas de regressão, DIP e CHE. No entanto estes autores obtiveram valores superiores para uma dieta contendo CHE, não subestimando o nível de excreção de aminoácidos endógenos, o que acontece quando se usa a DIP.

Ressaltando os fatores negativos da técnica da CHE, além dos aminoácidos dietéticos não absorvidos, pequenos peptídeos e aminoácidos livres de origem endógena com peso molecular menor que 10.000 Da podem ser descartados na prática de ultrafiltração, acarretando superestimação dos coeficientes de digestibilidade verdadeira dos aminoácidos, além de ser esta uma técnica mais complexa, exigindo equipamentos mais sofisticados, em relação às demais.

HODGKINSON (2003), estudando as perdas endógenas em ratos, averiguou a diferença do volume de exclusão na célula de ultrafiltração com 3.000 Da e 10.000 Da, na tentativa de eliminar os erros cometidos na prática de ultrafiltração, tornando mais precisa a técnica da CHE. Esse autor constatou aumento de 17% de nitrogênio e 12% de aminoácidos totais para a

ultrafiltração de 3.000 Da, comprovando que a técnica da CHE utilizando célula de ultrafiltração com volume de exclusão de 10.000 Da subestima as perdas endógenas e que as perdas endógenas totais podem ser maiores quando se contabilizam os aminoácidos livres e peptídeos menores que 3.000 Da. A fração ultrafiltrada da membrana de 10.000 Da era rica em aminoácidos livres: arginina, fenilalanina, serina, glutamina e isoleucina, e em peptídeos ricos em aminoácidos: ácido aspártico, treonina, metionina, tirosina e fenilalanina. Entretanto, é desconhecido se o tamanho dos peptídeos dietéticos e o grau de hidrólise enzimática da caseína podem afetar a composição do fluido endógeno. É importante ressaltar que a escolha do volume de exclusão da membrana para ultrafiltração deve estar relacionada com o tamanho da proteína, dos peptídeos e dos aminoácidos contidos na dieta.

O aumento da proteína endógena de 17,15%, pela técnica da CHE, contra 10,53%, obtidos pelo método da DIP e de alguns aminoácidos, pode estar relacionado à presença de pequenos peptídeos na digesta dos animais que consumiram dieta com CHE, provocando efeito estimulante para secreção de proteína na área digestiva (STEIN, 1996).

A técnica de regressão tem sido comumente adotada para determinar a perda de aminoácidos endógenos, assumindo que os valores obtidos refletem o que ocorreria no trato digestivo do animal quando este consome uma dieta com proteína (DONKOT e MOUGHAN, 1999). A técnica baseia-se em regressão as quantidades de aminoácidos e proteínas coletadas no íleo em função da quantidade de matéria seca ingerida, extrapolando para zero o consumo de proteína bruta, usando uma fonte de alta digestibilidade protéica na dieta (JANSMAN et al., 2002).

De modo geral, os valores obtidos pelos métodos convencionais, DIP e o da regressão são similares e normalmente subestimam os valores do nitrogênio de origem endógena. DONKOT e MOUGHAN (1999), compararam, as técnicas da DIP, da dieta com CHE e a de regressão, para determinação da perda endógena de nitrogênio com suínos submetidos a implantação da cânula T simples. Os autores observaram que as perdas endógenas de aminoácidos utilizando a regressão e a DIP foram similares entre si, porém inferiores às obtidas pela técnica da CHE.

Em trabalhos realizados com o propósito de investigar aspectos da técnica de diluição de isótopos, os quais poderiam interferir na exata determinação da proteína endógena recuperada no íleo distal de suínos, alimentados com dietas contendo proteínas e avaliar o potencial de uso dessa técnica, LIEN et al. (1997a) concluíram que a técnica de diluição de isótopos ^{15}N parece ser útil para estudar a recuperação endógena, mas que provavelmente os resultados seriam superestimados. LIEN et al. (1997b) sugerem modificações que incluam uma tentativa mais rigorosa de levar os animais ao equilíbrio isotópico, como entre e dentro dos períodos de alimentação, e uma determinação mais direta dos enriquecimentos nos precursores para nitrogênio endógeno e secreções de aminoácidos no plasma.

De acordo BATTERHAM (1994), a diferença entre a digestibilidade verdadeira e a aparente reflete o custo endógeno da digestão protéica, que pode variar entre fontes protéicas, dependendo do grau de dificuldade em hidrolisar a fonte protéica.

É necessário o conhecimento preciso das quantidades das perdas endógenas, porém cada método possui suas limitações, importante é conhecer os efeitos negativos e positivos das metodologias sobre os coeficientes de digestibilidade verdadeiros dos alimentos, para melhor aplicação nas formulações de dietas práticas.

2.5. Fatores que influenciam as perdas endógenas de proteínas e aminoácidos

Alguns fatores como o tipo e nível de fibra utilizado na dieta, podem influenciar a determinação das perdas endógenas (LOW, 1982), de modo que o valor conseguido pode não refletir a verdadeira excreção endógena. POZZA (2003) estudou o efeito dos níveis de fibra sobre as perdas endógenas de aminoácidos e concluiu que o aumento do tipo e do nível de fibra, proveniente da inclusão da casca de arroz na dieta isenta de proteína (DIP), resultou em aumento da perda endógena dos aminoácidos, com exceção da glicina. Portanto, a fibra pode ser responsável pelo aumento da secreção endógena de aminoácido, tanto pela descamação das células epiteliais, devido à sua natureza física, quanto pela adsorção de peptídeos, aminoácidos e enzimas

digestivas, reduzindo então a sua digestão e absorção, apesar de não haver evidências claras na literatura de qual dos dois é mais importante (POZZA et al., 2003). Dessa forma, na determinação da perda endógena ileal de aminoácidos, ao utilizar uma dieta isenta de proteína, devem-se levar em consideração não só as quantidades de fibra adicionadas, como também o tipo de fibra a ser utilizada.

Buscando determinar o efeito da fibra em detergente neutro purificada (FDN_p) sobre digestibilidade ileal e fecal, fluxo portal de nitrogênio e aminoácidos e na utilização de nitrogênio em machos castrados em crescimento, LENIS et al. (1996) observaram que a adição de FDN_p aumentou o fluxo da matéria seca e nitrogênio no íleo terminal e diminuiu suas digestibilidades ileal e fecal. Isso, segundo os autores, pode ser devido a uma baixa digestibilidade verdadeira do nitrogênio da FDN, a um efeito negativo da fibra em detergente neutro na digestibilidade verdadeira da dieta basal e a um aumento nas perdas endógenas.

Para NYACHOTI et al. (1997), além da fibra, o consumo de matéria seca, o conteúdo de fatores antinutricionais e o nível de proteína na dieta também afetam as perdas endógenas de nitrogênio. Há evidência segundo HODGKINSON et al. (2000), de que a eficiência da absorção de prolina seja dependente do nível de fornecimento adequado de proteína na dieta.

Estudo feito por HODGKINSON et al. (2000) mostrou que a duração da ingestão da dieta isenta de proteína pode alterar a quantidade das perdas endógenas de nitrogênio e aminoácidos, em suínos na fase de crescimento. Esses autores obtiveram menores valores das perdas endógenas de aminoácidos em animais que consumiram a DIP por oito dias, quando comparado aos que consumiram por um dia, com exceção dos aminoácidos lisina, arginina, prolina, alanina e triptofano, porém os valores dos aminoácidos prolina e glicina foram relativamente altos nos dois estudos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Setor de Suinocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa - UFV, no mês de junho de 2004.

Foi avaliada a digestibilidade dos aminoácidos de um concentrado protéico usando a técnica de digestibilidade ileal com a determinação das perdas endógenas. Foram utilizados 12 animais machos, castrados, mestiços (Landrace x Large White), adquiridos no setor de melhoramento genético da UFV, com peso médio inicial de 35 kg. Os animais receberam uma cânula T simples, segundo a técnica adaptada de DONKOH et al. (1994), implantada no íleo distal a 20 cm da válvula íleo-cecal. Os animais ficaram em jejum por 24 horas, para minimizar a contaminação por digesta durante a cirurgia. Posteriormente foram anestesiados e deitados lateralmente, sendo a área da cirurgia totalmente desinfetada. Foi feita uma incisão vertical de 5-6 cm na parede do corpo, 3-4 cm atrás da última costela, na linha mediana. O intestino delgado foi exteriorizado. Uma incisão de 2-2,5 cm foi feita ao longo do lado antimesentérico do intestino delgado, 10-15 cm antes da junção íleo-cecal. Uma sutura foi feita ao redor da incisão e a cânula inserida. A cânula foi exteriorizada por um corte de aproximadamente 1 cm de diâmetro, 3 a 4 cm antes da incisão inicial. O intestino foi fixado ao peritônio com suturas descontínuas. A incisão inicial foi fechada com suturas contínuas na camada muscular profunda e no peritônio, suturas descontínuas no músculo subcutâneo e suturas descontínuas na pele.

Durante três a cinco dias após a cirurgia, os animais receberam níveis terapêuticos de antibióticos e vermífugos, como medida profilática. As suturas foram removidas após 10 dias da cirurgia, sendo os animais alimentados com uma dieta especial em pequenas quantidades, aumentando gradativamente até o estabelecimento do consumo normal.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três tratamentos, quatro repetições cada e um animal por unidade experimental. Os tratamentos foram constituídos por: tratamento 1, dieta com caseína hidrolisada enzimaticamente (CHE); tratamento 2, dieta isenta de proteína; e tratamento 3, dieta com 23% do concentrado protéico teste.

As dietas apresentadas na Tabela 1 foram formuladas à base de amido de milho, óleo de soja, celulose purificada, açúcar, minerais e vitaminas a fim de atender às exigências nutricionais dos animais de acordo com ROSTAGNO et al. (2000). As dietas tiveram o balanço eletrolítico corrigido para os minerais, potássio, sódio, magnésio, cálcio e fósforo.

A dieta com caseína hidrolisada e aquela isenta de proteína foram utilizadas para determinação da excreção endógena de proteínas e aminoácidos. Às dietas experimentais foi adicionado 0,5% de óxido crômico (Cr_2O_3), utilizado como indicador na determinação da digestibilidade.

A duração do ensaio de digestibilidade foi de sete dias, sendo três dias de adaptação, dois dias de regularização do fluxo intestinal e dois dias de coleta de digesta. A quantidade de ração fornecida a cada animal durante o controle do fluxo foi calculada com base no peso metabólico ($\text{kg}^{0,75}$). Nos dias da coleta, a dieta foi fornecida duas vezes ao dia, no período de três horas (8 e 11 horas) utilizando 10% do peso metabólico para cada animal nos tratamentos com caseína e alimento-teste; para a DIP, a quantidade fornecida foi com base no consumo metabólico determinado no período do controle do fluxo. Para evitar perdas e facilitar a ingestão, as rações foram umedecidas com água na proporção de 1:1. Durante o período de adaptação e de controle do fluxo os animais foram alimentados duas vezes ao dia (8 e 11 horas).

As coletas das digestas começaram logo após a alimentação, estendendo-se por 10 horas. As amostras foram coletadas em sacos de polietileno, presos à cânula, e posteriormente colocados em sacos plásticos, identificados e armazenados em congelador (-5°C) até o final do período de

Tabela 1 – Composição centesimal das dietas experimentais

Ingredientes	CHE⁵	DIP⁴	Concentrado protéico
Caseína ³	10,000	-	-
Núcleo protéico	-	-	23,000
Amido	69,855	79,855	59,390
Açúcar	8,000	8,000	8,000
Óleo de soja refinado	2,000	2,000	2,000
Celulose purificada	3,000	3,000	3,000
Sal	0,400	0,400	0,040
Fosfato bicálcico	1,960	1,960	1,460
Calcário	0,760	0,760	1,000
Sulfato de magnésio	1,180	1,180	0,470
Cloreto de potássio	0,570	0,570	0,970
Carbonato de potássio	0,900	0,900	0,080
Carbonato de sódio	0,560	0,560	-
Cloreto de colina	0,165	0,165	0,020
Premix vitamínico ¹	0,100	0,100	0,100
Premix mineral ²	0,050	0,050	0,050
Óxido de cromo	0,500	0,500	0,500
Total	100,000	100,000	100,000

Composição calculada (%)

Proteína bruta (%)	9,260	0,450	12,090
Energia digestível (Kcal/kg)	3,495	3,452	3,424
Fibra bruta (%)	3,000	3,000	3,090
Cálcio (%)	0,760	0,760	0,760
Fósforo total (%)	0,360	0,360	0,620
Fósforo disponível (%)	0,360	0,360	0,360
Sódio (%)	0,400	0,400	0,400
Cloro (%)	0,500	0,500	0,500
Potássio (%)	0,900	0,900	0,900
Magnésio (%)	0,140	0,140	0,140

¹ Conteúdo/kg: vit A 10.000.000 U.I.; vit D₃ 1,500.000 U.I.; vit B₁ 2,0g; vit B₂ 5,0g; vit B₆ 3,0g; vit B₁₂ 30.000 mcg; ácido nicótico 30,000 mg; ácido pantotênico 12.000 mcg; vit K₃ 2.000 mg; ácido fólico, 800 mg; biotina 100 mg; selênio 300 mg e veículo q.s.p., 1.000 g.

² Conteúdo/kg: ferro, 100 g; cobre, 10 g; cobalto 1g; manganês, 40 g; zinco, 100 g; iodo, 1.5g e veículo q.s.p., 500 g.

³ Caseína hidrolisada enzimaticamente (Casein Hydrolised Enzymatically – CHE) – SIGMA Alldrich.

⁴ Dieta isenta de proteína.

⁵ Dieta com caseína hidrolizada enzimaticamente.

⁶ Celulose microcristalina 101-LT:106 – CI: 002778/04-001338 - Henrifarma produtos químicos e farmacêuticos Ltda.

Tabela 2 – Composição protéica e de aminoácidos determinadas nas dietas experimentais e concentrado protéico na matéria seca

	Dieta-teste*	CHE *	DIP*	Concentrado protéico ¹
PB	11,040	9,730	0,380	48,000
Valores dos Aminoácidos				
Lisina	0,580	0,680	0,005	2,523
Metionina	0,140	0,110	0,100	0,609
Ác. aspártico	0,750	0,580	0,010	3,261
Ác. glutâmico	1,126	2,080	0,010	4,896
Serina	0,420	0,400	0,004	1,826
Glicina	0,420	0,160	0,007	1,826
Histidina	0,240	0,260	0,006	1,043
Arginina	0,500	0,340	0,008	2,174
Treonina	0,428	0,190	0,011	1,862
Alanina	0,610	0,280	0,011	2,652
Prolina	0,540	0,860	0,013	2,348
Tirosina	0,380	0,460	0,005	1,652
Valina	0,560	0,600	0,008	2,435
Cistina	0,130	0,040	0,006	0,565
Isoleucina	0,480	0,470	0,004	2,087
Leucina	0,850	0,880	0,015	3,696
Fenilalanina	0,480	0,470	0,007	2,087
Triptofano	0,108	0,110	0,000	0,470

* Valores analisados no Laboratório CBO Assessoria e Análises, Campinas-SP.

¹ Composição química do alimento na matéria natural.

coleta. As amostras da digesta, compostas por animal do tratamento que continha o concentrado protéico-teste e a DIP foram descongeladas, pesadas, homogeneizadas e congeladas a -80°C, para posteriormente serem liofilizadas.

Nas amostras da digesta dos animais que consumiram dieta contendo CHE foram feitos os ajustes de pH para 3,5 no momento da coleta, adicionando uma solução de H₂SO₄ 9 mol/l imediatamente após a coleta, para reduzir a atividade enzimática e bacteriana nas amostras. Após o final dos dois dias de coleta, as amostras foram descongeladas a 4°C e encaminhadas ao Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agronomia - BIOAGRO da Universidade Federal de Viçosa, onde passaram por um processo de centrifugação a 1.450 giros (3.100 rpm) por 45 minutos a 0°C; em seguida foi retido o sobrenadante e o precipitado lavado com 5 ml de H₂O destilada, sendo novamente centrifugado

por mais 30 minutos, também a 0°C. Os precipitados foram guardados à temperatura de -80°C e liofilizados. O sobrenadante foi filtrado em uma célula de ultrafiltração, sempre mantida no gelo, com uma pressão de 20 psi, onde foi utilizada uma membrana de celulose regenerada com volume de exclusão de 10.000 Da e diâmetro de 76 mm (Millipore - nº 13.642), sendo posteriormente, congelado também a -80°C. Esse processo promoveu a separação molecular das proteínas (PM > 10.000 Da) dos peptídeos e aminoácidos livres (PM < 10.000 Da). A fração retida na membrana, isto é, a fração da amostra com peso molecular maior que 10.000 Da, foi adicionada ao precipitado, e o material foi liofilizado, finalmente moído e armazenado a -20°C, para posterior análise bromatológica.

Os teores de matéria seca, proteína bruta e cromo das digestas e rações experimentais foram determinados no Laboratório do CBO Assessoria e Análises, Campinas - SP, de acordo com as metodologias descritas por SILVA (1990). As composições em aminoácidos das digestas e rações foram determinadas por meio de cromatografia líquida de alta performance (HPLC).

A digestibilidade ileal dos aminoácidos foi determinada por meio do cálculo do fator de indigestibilidade, utilizando-se as fórmulas descritas por ROSTAGNO e FEATHERSTON (1977), como segue:

A) Cálculo do fator de indigestibilidade (F_{I1}):

$$F_{I1} = \frac{\text{Cr}_2\text{O}_3 \text{ dieta}}{\text{Cr}_2\text{O}_3 \text{ fezes}}$$

B) Coeficiente de digestibilidade aparente da proteína ($CD_{ap}AA$):

$$CD_{ap}PB = \frac{PB \text{ dieta} - (PB \text{ digesta} \times F_{I1})}{PB \text{ dieta}} \times 100$$

C) Coeficiente de digestibilidade verdadeira da proteína ($CD_v AA$):

$$CD_vPB = \frac{PB \text{ dieta} - (PB \text{ digesta} \times F_{I1} - PB_e \times F_{I2})}{PB \text{ dieta}} \times 100$$

em que:

PB_e = PB endógena excretada nas digestas; e

F_2 = fator de indigestibilidade da DIP ou da dieta com CHE.

D) Coeficiente de digestibilidade aparente de aminoácidos ($CD_{ap}AA$):

$$CD_{ap}aa = \frac{\text{mg AA/g dieta} - \text{mg AA/g } E_1 \times F_1}{\text{mg AA/g dieta}} \times 100$$

em que: E_1 = fezes da dieta-teste

E) Coeficiente de digestibilidade verdadeira de aminoácido (CD_vAA)

$$CD_vAA = \frac{\text{mg AA/g dieta} - (\text{mg AA/g } E_1 \times FL_1 - \text{mg AA/g } E_2 \times FL_2)}{\text{mg AA/g dieta}} \times 100$$

em que:

E_2 = fezes da DIP ou dieta com CHE; e

F_2 = fator de indigestibilidade da DIP ou da dieta com CHE.

F) Matéria seca digestível (MSD)

$$MSD (\%) = 100 - (F_1 \times 100)$$

G) Perdas de aminoácidos endógenos (mg/kg de matéria seca consumida)

$$AA_e (\text{mg/kg MS CONSUMIDA}) = AA_e \times F_2$$

em que

AA_e = Concentração de aminoácido endógeno (mg/kg matéria seca consumida)

F_2 = fator de indigestibilidade da DIP ou da dieta com CHE (g/kg).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O volume médio de fluido ileal coletado foi de 1.200 ml por animal e o volume médio de líquido retido na membrana de celulose após a ultrafiltração foi de 180 ml por animal.

Os valores médios das perdas ileais endógenas da proteína e dos aminoácidos determinados usando dieta isenta de proteína (DIP) e dieta com caseína hidrolisada enzimaticamente (CHE), estão apresentados na Tabela 3.

Não foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos para os valores de proteína bruta. As perdas de aminoácidos endógenas determinadas em digesta de animais que consumiram DIP, apresentaram valores absolutos de aminoácidos totais essenciais e não-essenciais inferiores em relação aos determinados por dietas com CHE, com exceção dos aminoácidos metionina, cistina, glicina e prolina, estando esses resultados de acordo em parte com DONKOH e MOUGHAN (1999), que encontraram os valores absolutos das perdas endógenas de todos os aminoácidos determinados com a CHE superiores ao determinado com a DIP. Conseqüentemente, o consumo de dietas com proteína, mesmo sendo considerada 100% absorvida como é o caso da caseína hidrolizada enzimaticamente, tende a aumentar as concentrações de proteína no fluido ileal.

Os animais alimentados com CHE apresentaram perdas endógenas estatisticamente superiores às dos animais que consumiram a DIP, que foram,

respectivamente: 971,34 e 504,02 mg/kg de matéria seca consumida ($P = 0,01$) para o aminoácido glutamina. Para o aminoácido ácido aspártico 565,18 e 170,72 mg/kg de matéria seca consumida e para serina 593,12 e 357,69 mg/kg de matéria seca consumida ($P < 0,05$) e de 410,46 e 268,27 mg/kg de matéria seca consumida para lisina, 352,43 e 260,14 mg/kg de matéria seca consumida ($P > 0,05$). No entanto, as perdas endógenas para o aminoácido glicina determinada com a dieta DIP, foram estatisticamente superiores ($P < 0,05$) quando comparadas com a CHE de respectivamente; 391,12 e 463,37 mg/kg de matéria seca consumida. Para os demais aminoácidos estudados não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$). JANSMAN (2002) determinou aumento das secreções endógenas utilizando o método da CHE para os aminoácidos glutamina de (8,40 g/16 g N), serina (26,86 g/16 g N), isoleucina (18,75 g/16g N), treonina (4,94 g/16 g N), valina (4,22 g/16 g N), histidina (23,23 g/16 g N), alanina (12,91 g/16 g N) e aspártico (13,80 g/16 g N) quando comparado ao método da DIP.

Os valores absolutos das perdas endógenas foram relativamente baixos para metionina e cistina no fluido ileal para as duas metodologias neste estudo. Isso pode ser explicado em parte, segundo POZZA (2003), pelo baixo conteúdo de aminoácidos sulfurado, tanto na camada de mucina quanto em secreções pancreáticas, quando comparados aos demais aminoácidos. Esses resultados confirmam os de HODGKINSON et al. (2000), os quais observaram redução do nível de cistina em animais que consumiram DIP por oito dias, afirmando que pode haver redução de secreções ricas em aminoácido sulfurado.

De modo geral encontra-se elevado teor de treonina nas secreções endógenas ileais, independentemente da técnica a ser utilizada, e isso pode ser devido ao aumento de glicoproteínas provenientes do muco intestinal, que são ricas nesse aminoácido, assim como foi relatado também por GRALA et al. (1998). De forma semelhante, os elevados teores de ácidos aspártico e glutâmico e leucina podem estar associados a uma relativa proporção destes no suco pancreáticos de suínos (PÖHLAND et al. 1993), além da contribuição na camada de mucina.

Tabela 3 – Valores médios de proteína e de aminoácidos ileais endógenos (mg/kg matéria seca consumida), determinados usando dieta isenta de proteína (DIP) e dieta com caseína hidrolisada enzimaticamente (CHE)

	CHE ²	DIP ²	CV % ⁶
PB⁵	9.569,85	10.657,59	13,73
Aminoácidos Essenciais			
Arginina	352,43	260,14	7,58
Histidina	154,73	138,20	15,4
Isoleucina	325,88	268,27	15,38
Leucina	567,33	479,63	11,50
Lisina	410,46	268,27	12,04
Metionina	107,45	130,07	12,61
Fenilalanina	320,20	276,40	11,43
Treonina ⁴	474,93	235,75	28,60
Valina	474,93	382,08	11,97
Triptofano	152,58	70,73	29,47
Média	337,39	250,95	-
Aminoácidos não-essenciais			
Alanina	462,03	447,11	10,07
Ác. Aspártico ³	565,18	170,72	21,62
Ác. Glutâmico	971,34	504,02	11,57
Cistina	96,70	97,55	13,99
Glicina ³	391,12	463,37	11,97
Serina ³	593,12	357,69	12,18
Prolina	434,10	691,00	32,87
Tirosina	294,41	284,53	14,75
Média	476,00	377,00	-

¹ Dieta isenta de proteína.

² Dieta contendo caseína hidrolisada enzimaticamente.

³ Nível de significância pelo teste F (P<0,05).

⁴ Não-significativo pelo teste F (P>0,05).

⁵ Coeficiente de variação (%).

A maior parte das proteínas endógenas restantes é originada da desconjugação de sais biliares e mucoglicoproteínas, em que esses componentes são em grande parte resistentes a ações das enzimas proteolíticas, não sofrendo, portanto, a reabsorção (STEIN et al., 1999). A glicina compõe cerca de 90% do total dos aminoácidos da bile e mucoglicoproteínas são ricas em prolina, glutamina, ácidos aspárticos, serina e treonina (HUANG et al., 1999).

Ao que parece com a inclusão de ingredientes protéicos altamente digestíveis nas dietas, como é o caso da caseína hidrolisada enzimaticamente, o organismo animal tende a aumentar as concentrações protéicas e de aminoácidos no fluido ileal endógeno.

Os valores dos coeficientes de digestibilidade ileal aparente e verdadeira da proteína bruta e dos aminoácidos, utilizando a técnica da caseína hidrolisada enzimaticamente e da dieta isenta de proteína do alimento protéico, encontram-se na Tabela 4.

Não houve diferenças significativas ($P > 0,05$) para os valores dos coeficientes de digestibilidade verdadeira da proteína bruta entre as técnicas estudadas, embora o valor absoluto determinado com a técnica da DIP para determinação das perdas endógenas tenha sido de 1,42% superior ao daquele determinado pela técnica da CHE. Esse aumento pode ser proveniente de nitrogênio não-protéico destinado à síntese de proteína, contribuindo para o aumento do coeficiente de digestibilidade verdadeira da proteína para a técnica da DIP. Sendo explicado também pelo fato de o consumo de dieta livre de proteína em que o estado fisiológico do animal ser anormal, podendo haver balanço negativo de nitrogênio. Há evidência de diminuição na atividade de enzimas proteolíticas no pâncreas e no intestino em animais que foram alimentados com DIP, afetando as perdas endógenas e conseqüentemente, subestimando os valores dos coeficientes de digestibilidade verdadeira dos alimentos, conforme DONKOT et al. (1999).

Observaram-se maiores valores dos coeficientes de digestibilidade verdadeira do concentrado protéico para os aminoácidos metionina e serina ($P < 0,01$) e treonina e triptofano ($P < 0,05$) quando se utilizou a técnica da CHE, em comparação com a DIP. Estes resultados podem estar relacionados à

Tabela 4 – Coeficientes de digestibilidade ileal aparente e verdadeira da proteína e dos aminoácidos do alimento protéico, usando dieta isenta de proteína (DIP) e dieta com caseína hidrolisada enzimaticamente (CHE) na matéria seca

	Coeficiente de digestibilidade (%)			CV (%) ⁶
	Aparente	Verdadeiro		
		DIP ¹	CHE ²	
PB⁵	78,17	87,83	86,60	3,69
Aminoácidos Essenciais				
Arginina ⁵	84,90	90,10	91,94	2,14
Histidina ⁵	82,98	88,74	89,43	2,71
Isoleucina ⁵	80,39	85,98	87,87	2,20
Leucina ⁵	83,23	88,7	89,91	2,03
Lisina ⁵	78,27	82,89	85,35	3,52
Metionina ³	75,90	95,06	105,22	2,82
Fenilalanina ⁵	82,62	88,37	89,29	1,52
Treonina ⁴	68,80	75,29	80,88	3,51
Valina ⁵	78,19	85,01	86,67	2,20
Triptofano ⁴	73,64	80,19	87,76	4,90
Média	78,89	86,03	89,43	-
Aminoácidos não-essenciais				
Alanina ⁵	77,21	84,54	84,78	3,67
Ác. aspártico	81,56	83,83	89,09	8,10
Ác. glutâmico ⁵	81,02	85,50	89,65	4,78
Cistina ⁵	75,74	83,24	83,18	5,34
Glicina ⁵	71,90	82,93	81,21	3,51
Serina ³	66,40	74,91	80,52	2,53
Prolina ⁵	78,20	90,99	86,24	9,40
Tirosina ⁵	79,67	87,16	87,42	2,30
Média	76,46	84,13	85,26	-

¹ Dieta isenta de proteína.

² Dieta contendo caseína hidrolisada enzimaticamente.

³ Nível de significância pelo teste F (P<0,01).

⁴ Nível de significância pelo teste F (P<0,05).

⁵ Não-significativo pelo teste F (P>0,05).

⁶ Coeficiente de variação (%).

presença de peptídeos ativos provindos da dieta contendo a CHE, que no intestino pode estimular a produção do hormônio pancreamicina, que estimula a secreção do suco pancreático rico em tripsinogênio quimiotripsinogênio, entre outras substâncias (DONKOH e MOUGHAN 1999). O fornecimento de peptídeos ativos estimula o processo secretório no intestino, pelo fato de eles serem mais facilmente absorvidos, podendo elevar a quantidade das secreções endógenas, melhorando assim a eficiência de utilização dos componentes da dieta. Ou ainda, devido às perdas de aminoácidos de origem endógena na prática de ultrafiltração, pois quando se utiliza membrana de filtração com volume de exclusão de 10.000 Da, conforme relatos de HODGKINSON (2003) pode haver aumento das perdas, e superestimando, desta forma, os coeficientes de digestibilidade verdadeiros.

Enquanto para os aminoácidos glicina e prolina, foram determinados coeficientes de digestibilidade verdadeiro superiores com o uso do método da DIP, concordando com JANSMAN et al. (2002). Diferentemente, DONKOT et al. (1999) observaram que entre esse dois aminoácidos somente os valores determinados para a glicina foram maiores pelo método da DIP.

Os valores dos aminoácidos digestíveis do concentrado protéico, determinados com as diferentes técnicas de avaliação da perda endógena, estão apresentados na Tabela 5.

Os valores absolutos dos aminoácidos digestíveis determinados pela técnica da CHE foram superiores àqueles determinados com DIP para os aminoácidos lisina, metionina, ácido aspártico, ácido glutâmico, serina, arginina, treonina, alanina, valina, isoleucina, leucina, fenilalanina e triptofano em 2,15 e 2,09%, 0,64 e 0,58%, 2,90 e 2,73%, 4,39 e 4,19%, 1,47 e 1,37%, 2,00 e 1,96%, 1,51 e 1,40%, 2,25 e 2,24%, 2,11 e 2,07%, 1,83 e 1,79%, 3,32 e 3,28%, 1,86 e 1,84% e 0,41 e 0,38%, respectivamente.

As diferenças de 2,87, 1,03 e 7,09% no percentual de aminoácidos digestíveis entre as técnicas de CHE e DIP para os três primeiros aminoácidos limitantes para suínos (lisina, metionina e treonina, respectivamente) ressaltam a importância da utilização da metodologia mais precisa para determinação dos coeficientes de digestibilidade ileal verdadeira dos alimentos. Uma vez que a inclusão sobre todos os ingredientes protéicos nas rações, esses valores, somados, irão interferir na quantidade de nutriente fornecida aos animais.

Tabela 5 – Conteúdo de proteína e dos aminoácidos digestíveis do concentrado protéico, determinado com a dieta isenta de proteína (DIP) e com caseína hidrolisada enzimaticamente (CHE)

	DIP ¹	CHE ²	Aumentos (%) ³
Proteína Digestível (%)			
PB	42,16	41,28	-
Aminoácidos digestíveis (%)			
AA DIG (%)⁴			
Lisina	2,09	2,15	+2,87
Metionina	0,58	0,64	+10,34
Ác. aspártico	2,73	2,90	+6,22
Ác. glutâmico	4,19	4,39	+4,77
Serina	1,37	1,47	+7,29
Glicina	1,51	1,48	-
Histidina	0,93	0,93	-
Arginina	1,96	2,00	+2,04
Treonina	1,40	1,51	+7,85
Alanina	2,24	2,25	+0,04
Prolina	2,14	2,02	-
Tirosina	1,44	1,44	-
Valina	2,07	2,11	+1,93
Cistina	0,47	0,47	-
Isoleucina	1,79	1,83	+2,23
Leucina	3,28	3,32	+1,21
Fenilalanina	1,84	1,86	+1,08
Triptofano	0,38	0,41	+7,89

¹ Dieta isenta de proteína.

² Dieta contendo caseína hidrolisada enzimaticamente.

³ Aumentos relativos à técnica da CHE.

5. CONCLUSÕES

As secreções protéicas e de aminoácidos endógenas ileais produzidas pela técnica da caseína hidrolisada enzimaticamente foram maiores que as secreções obtidas pela técnica da dieta isenta de proteína. Os coeficientes de digestibilidade verdadeiro da proteína foram inferiores, porém os coeficientes de digestibilidade verdadeiro dos aminoácidos do concentrado protéico foram superiores pela técnica da caseína hidrolisada enzimaticamente, em relação à dieta isenta de proteína.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BATTERHAM, E. S.; MURISON, R.D.; ANDERSEN, L. M. Availability of lysine in vegetable protein concentrates as determined by the slope – ratio assay with growing pigs and rats and by chemical techniques. **British Journal of Nutrition**, v. 51, n. 3, p. 75-99, 1984.

BATTERHAM, E. S.; ANDERSEN, L. M.; BAIGENT, D. R. Utilization of ileal digestible amino acids by growing pigs: Methionine. **British Journal of Nutrition**, v. 70, n. 3, p. 711-720, 1993.

BATTERHAM, E. S.; ANDERSEN, L. M.; BAIGENT, D. R. Utilization of ileal digestible amino acids by growing pigs: Tryptophan. **British Journal of Nutrition**, v. 71, n. 3, p. 345-360, 1994a.

BATTERHAM, E. S.; ANDERSEN, L. M. Utilization of ileal digestible amino acids by growing pigs: Isoleucine. **British Journal of Nutrition**, v. 71, n. 4, p. 531-541, 1994b.

BATTERHAM, E. S. Ileal digestibilities of amino acids in feedstuffs for pigs. In: D'MELLO, J. P. F. (Ed.). **Aminoacids in animal farm nutrition**. Wallingford: CAB International, 1994. p. 113-131.

BELLAVER, C. Digestibilidade ileal de aminoácido e utilização dos valores na formulação de dietas para suíno em crescimento. In: CONGRESSO DE LA AMENA Y I DEL CLANA, 11, México, 2003. **Anais...** México, 2003, p. 225-232.

BUTTS, C.A.; MOUGHAN, P. J.; et al. The effect of food dry matter intake on the endogenous ileal aminoacid extraction determined under peptide alimentation in the 50kg liveweight pig. **Journal Science Food Agriculture**, v. 62, p 235-234, 1993.

DE LANGE, C. F. M.; SAUER, W. C. et al. The effect of protein status of the pigs on the recovery and amino acid composition of endogenous protein in digesta collected from the distal ileum. **Journal Animal Science**, v. 67, p. 755-762, 1989b.

DE LANGER, S.; FULLER, M. F. The effects of excessive amounts of protein on lysine utilization in growing pigs. **British Journal of Nutrition**, v. 76, n. 5, p. 743-754, 1996

DONKOH, A.; MOUGHAN, P. J.; SMITH, W. C. Comparison of the slaughter method and simple T-piece cannulation of the terminal ileum for determining ileal amino acid digestibility in meat and bone meal for the growing pig. **Animal Feed Science and Technology**, v. 49, n. 1-2, p. 43-56, 1994.

DONKOH A.; MOUGHAN, P.J. Endogenous ileal nitrogen and amino acid flows in the growing pig receiving a protein - free and diets containing enzymically hydrolysed casein or grade levels of meat and bone meal. **Brit. Society of Animal Science**, v. 68, p. 511-513, 1999.

FAN, M. Z.; SAUER, W. C. Determination of apparent ileal amino acid digestibility in barley and canola meal for pigs with the direct; difference; and regression methods. **Journal of Animal Science**, v. 73, p. 2364-2374, 1995.

GATEL, F. Protein quality of legume seeds for non – ruminant animals: a literature review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 45, p. 317-348, 1994.

GRALA, W.; VERSTEGEN, M. W. A.; JANSMAN, A. J. M. et al. Ileal apparent protein and amino acid digestibilities and endogenous nitrogen losses in pigs fed soybean and rapeseed products. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 557-568, 1998.

HODGKINSON, S. M.; MOUGHAN, P. L.; et al. Effect of the duration of feeding of a protein – free diet on endogenous ileal nitrogen and amino acid loss in the growing pig. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 1407-1412, 2000.

HODGKINSON, S. M.; SOUFFRANT, W. B. et al. Comparison of the enzyme-hydrolyzed casein; guanidination and isotope dilution methods for determining ileal endogenous protein flow in the growing rat and pig. **Journal Animal Science**, v. 81, p. 2525-2534, 2003.

HUANG, S. X.; SAUER, W.C. et al. Amino acid digestibilities in different samples of wheat shorts for growing pigs. **Journal Animal Science**, v. 77, p. 2469-2477, 1999.

JANSMAN, A. J. M.; SIMINK, W. et al. Evaluation through literature data of the amount and amino acid composition of basal endogenous crude protein at the terminal ileum of pigs. **Animal Feed Science and Technology**, v. 98, p. 49-60, 2002.

LAPLACE, J. P. Amino acid availability in pig feeding. In: WORLD CONGRESS OF ANIMAL FEEDING, 4., Madrid, 1996. **Anais...** Madrid, 1996, v. IX, p. 109-129.

LIEN, K. A.; SAUER, W. C.; MOSENTHIN, R. et al. Evaluation of the ¹⁵N-isotope dilution technique for determining the recovery of endogenous protein in ileal digestion of pigs: Effects of dilution in the precursor pool for endogenous nitrogen secretion. **Journal Animal Science**, v. 75, n. 1, p. 148-158, 1997a.

LIEN, K. A.; SAUER, W. C.; DUGAN, M. E. R. Evaluation of the ¹⁵N-isotope dilution technique for determining the recovery of endogenous protein in ileal digestion of pigs: Effects of pattern of blood sampling; precursor pools and isotope dilution technique. **Journal Animal Science**, v. 75, n. 1, p. 159-169, 1997b.

LENIS, N. P.; BIKKER, P.; MEULEN, J. et al. Effect of dietary neutral detergent fiber on ileal digestibility and portal flux of nitrogen and amino acids and on nitrogen utilization in growing pigs. **Journal Animal Science**, v. 74, n. 11, p. 2687-2695, 1996.

LOW, A. G. Digestibility and availability of amino acids from feedstuffs for pigs: A Review. **Livestock Production Science**, v. 9, n. 4, p. 511-520, 1982.

MARISCAL-LANDIN, G.; SÈVE, B. et al. Endogenous amino nitrogen; collected from pigs with end-to-end ileorectal anastomosis is affected by the the method of estimation and altered by dietary fibre. **Journal Nutrition**, v. 125, p. 136-146, 1995.

MOUGHAN, P. L. Amino acid availability: aspects of chemical analysis and bioassay methodology. **Nutrition Research Reviews**, v. 16, p. 127-141, 2003.

MOUGHAN, P. L.; SCHUTTERT, G. Composition of nitrogen-containing fractions in digesta from the distal ileum of pigs fed a protein-free diet. **J. Nutr.**, v. 121, p. 1570-1574, 1991.

NYACHOTI, C. M.; LANGE, C. M.; Mc BRIDE, B. W. et al. Significance of endogenous gut nitrogen losses in the nutrition of growing pigs: A review. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 77, p. 149-163, 1997.

OTTO, E.R.; YOKOYAMA, M. et al. Nitrogen balance and ileal amino acid digestibility in growing pigs fed diets reduced in protein concentration. **Journal Animal Science**, v. 81, p. 1743-1753, 2003.

PARSONS, C. M. Influence of caecectomy on digestibility of amino acids by rooster fed distillers dried grains with solubles. **Journal of Agri. Sci.**, v. 104, p. 469-472, 1985.

PÖHLAND, U.; SOUFFRANT, W.C.; et al. Effect of feeding different diets on the exocrine pancreatic secretion of nitrogen; amino acids and enzymes in growing pigs. **Journal of Science Food Agriculture**, v. 62, p. 229-237, 1993.

POZZA, P. C. et al. Avaliação da perda endógena de aminoácido; em função de diferentes níveis de fibra para suíno. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 6, p. 1354-1361, 2003.

ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; DONZELE, J. L.; GOMES, P. C.; FERREIRA, A. S.; OLIVEIRA, R. F. M.; LOPES, D. C. **Tabelas brasileiras para aves e suínos**; composição de alimentos e exigências nutricionais. 2. ed. Viçosa: Editora UFV, 2000. 141 p.

STEIN, H. H.; AREF, S.; EASTER, R. A. Comparative protein and amino acid digestibilities in growing pigs and sows. **Journal Animal Science**, v. 77, p. 1169-1179, 1999.

TANKSLEY JR., T. D.; KNABE, D. A. Direct measurement of amino acid digestibility in swine. In: FINLEY, J. W.; HOPKINS, D. T. (Ed.) **Digestibility and amino acid availability in cereals and oilseeds**. AACC, Inc. St. Paul. 1985. p. 259-73.

TRAYLOR, S. L.; CROMWELL, G. L. ; LINDEMANN, M. D.; KNABE, D. A. Effects of level of supplemental on ileal digestibility of amino acids; calcium; and phosphorus in dehulled soyeam meal for growing pigs. **Journal Animal Science**, v. 79, p. 2634-2642, 2001.

WILIANS, P. E. V. Digestible amino acids for non-ruminant animals: Theory and recent challenges. **Animal Feed Science and Technology**, v. 53, p. 173-187, 1995.

APÊNDICE

ILUSTRAÇÕES

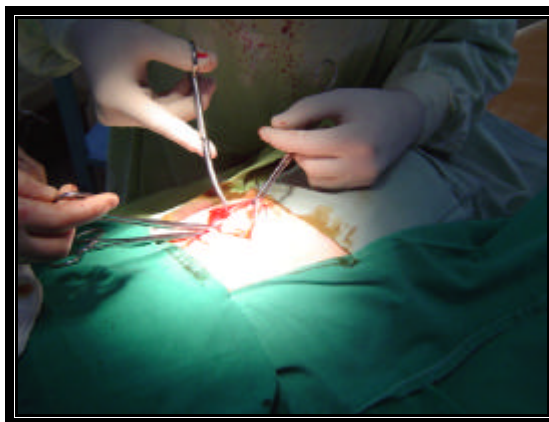


Foto 1 – Incisão vertical de 5 -6 cm na parede do corpo.



Foto 2 – Observação pós-operatório (sala de cirurgia).

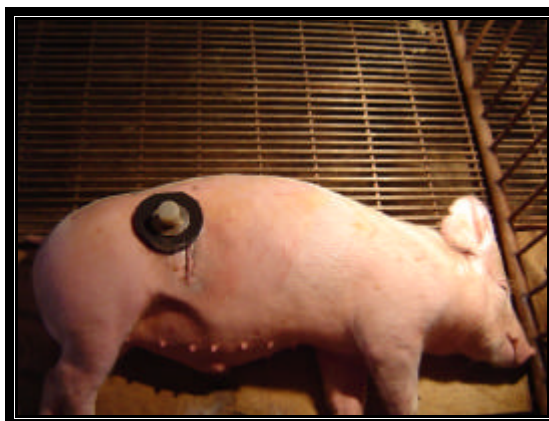


Foto 3 – Observação pós-operatório (sala experimental).



Foto 4 – Animal reabilitado.



Foto 5 – Fase experimental (dietas umedecidas).



Foto 6 – Coleta da digesta ileal.



Foto 7 – Digesta ileal coletado por animal.



Foto 8 – Preparo da digesta para processo de centrifugação.

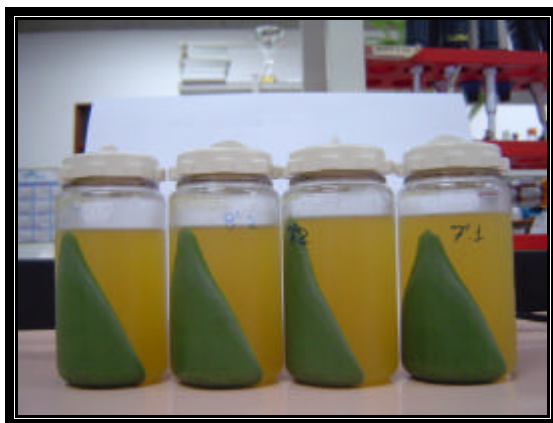


Foto 9 – Digesta após a 1ª centrifugação.



Foto 10 – Sobrenadante adquirido.

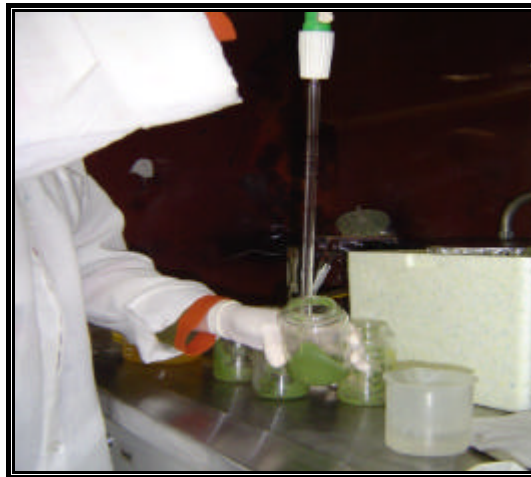


Foto 11 – Preparo do precipitado para 2ª centrifugação.

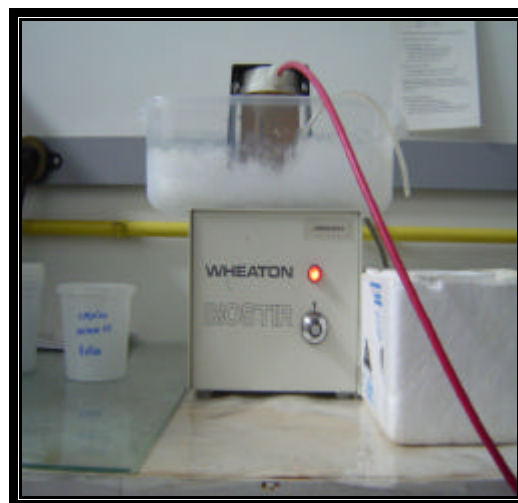


Foto 12 – Célula de ultrafiltração.

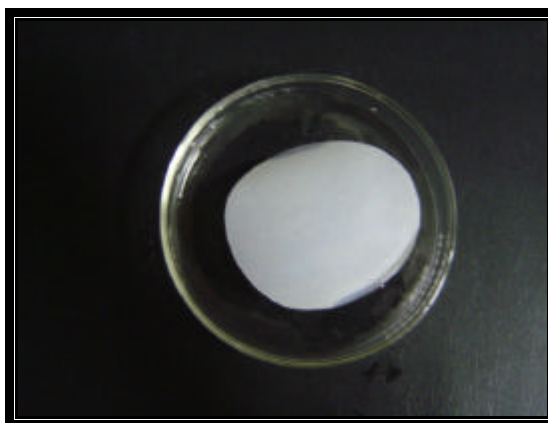


Foto 13 – Membrana de celulose regenerada com volume de exclusão de 10.000 Da.

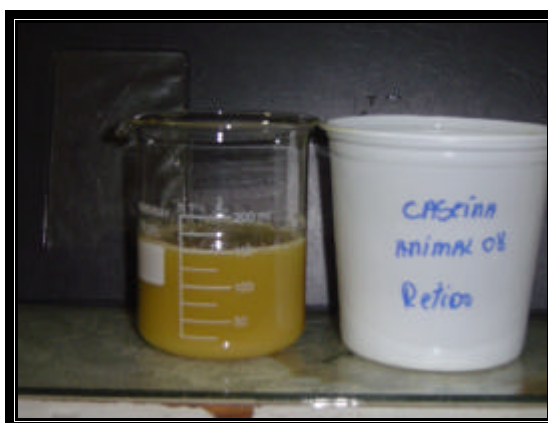


Foto 14 – Digesta retida na membrana de celulose com volume de exclusão de 10.000 Da



Foto 15 – Digesta seca (liofilizada).