

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ZOOTECNIA**

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE UM
MÉTODO IN VITRO PARA ESTIMAR A
DEGRADABILIDADE DAS PROTEÍNAS NO RÚMEN**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Carla Joice Härter

Santa Maria, RS, Brasil

2009

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE UM MÉTODO *IN VITRO* PARA ESTIMAR A DEGRADABILIDADE DAS PROTEÍNAS NO RÚMEN

por

Carla Joice Härter

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração em Nutrição de Ruminantes, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Zootecnia.**

Orientador: Prof. Luis Maria Bonnacarrère Sanchez

Santa Maria, RS, Brasil

2009

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação Zootecnia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE UM MÉTODO *IN VITRO*
PARA ESTIMAR A DEGRADABILIDADE DAS
PROTEÍNAS NO RÚMEN**

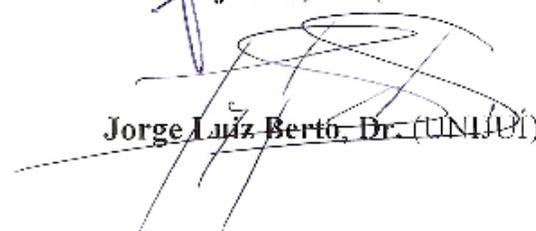
elaborada por
Carla Joice Härter

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Zootecnia

COMISSÃO EXAMINADORA:


Gilberto Vilmar Kozloski, Dr. (UFSM)
(Presidente/Co-orientador)


Maria Cecilia Cajaville, Dr. (Udelar/URUGUAY)


Jorge Luiz Berto, Dr. (UNIJUI)

Santa Maria, 13 de fevereiro de 2009.

"...Ser feliz é não querer saber onde é o nosso limite. É conseguir ver sempre o lado bom das coisas, é aprender com os erros, é rir do que não tem graça, é chorar sem culpa, é amar a vida, temer a Deus e aceitar os presentes que ele nos dá a cada dia, é sempre ter esperança, é lutar por uma boa causa, é respeitar e ser respeitado, é ter a alma leve e não ter a pretensão de que o mundo está contra você!!!
Seja feliz, faça feliz, não complique o simples, sorria, mesmo sem saber porque, agradeça mesmo quando não tem porque, ame até quem não te ama, e VIVA..."

AGRADECIMENTOS

A Deus acima de tudo, que é o principal provedor de tudo o que conquistei e de tudo o que sou.

Aos meus pais, pela educação, amor, incentivo e apoio.

Aos meus irmãos juntamente com suas respectivas famílias, que de uma forma ou de outra sempre contribuíram para que eu chegasse até aqui.

Aos amigos, minhas jóias preciosas, tanto os de perto como os distantes, que sempre se fizeram presentes, verdadeiros companheiros de todos os momentos, tanto para dar uma força nas horas de aperto como para comemorar uma vitória. Em especial às companheiras dos bailinhos e aos filósofos de boteco!

Aos orientadores Bonne e Gilberto pela atenção, ensinamentos transmitidos e confiança em mim depositada durante todos esses anos de convívio.

Aos estagiários e colegas de mestrado do LBNR, pessoas que sempre souberam estender sua mão, ensinando ou ajudando, companheiros de trabalho, inúmeros plantões e de algumas festinhas nas horas vagas. E em especial aos guerreiros dos eppendorfes, agradeço-lhes por todo trabalho realizado, pela persistência, dedicação e atenção, pois sem suas ajudas essa realidade não estaria se concretizando, saibam que tenho um carinho especial por vocês e os considero verdadeiros amigos.

A todos, o meu Muito Obrigada!

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Universidade Federal de Santa Maria

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE UM MÉTODO *IN VITRO* PARA ESTIMAR A DEGRADABILIDADE DAS PROTEÍNAS NO RÚMEN

AUTORA: CARLA JOICE HÄRTER

ORIENTADOR: LUIS MARIA BONNECARRÈRE SANCHEZ

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 13 de fevereiro de 2009.

Foi conduzido um conjunto de ensaios *in vitro* com o objetivo de desenvolver um método para estimar a degradação de proteína no rúmen baseado na liberação de amônia no meio de incubação. Foram incubadas amostras de farelo de soja, farinha de carne e ossos, azevém (*Lolium multiflorum*) e cynodon (*Cynodon dactylon* var. *Dactylon*) utilizando-se os procedimentos da técnica *in vitro*/gases. Foi avaliado o efeito da quantidade de amostra incubada, da inclusão de amido para corrigir a fração de nitrogênio capturado pelas bactérias, do teor de nitrogênio na solução tampão e do tratamento prévio das amostras para remoção da fração solúvel do nitrogênio. Foram conduzidos também ensaios *in vitro* de curta duração para medir a taxa de degradação ou de solubilização da fração solúvel da proteína das amostras. Os resultados de degradação protéica obtidos em algumas amostras incubadas *in vitro* foram comparados com os obtidos em ensaios *in vivo* e *in situ*, que foram conduzidos paralelamente. A degradação da proteína de diferentes amostras não foi afetada pelo tamanho de amostra (15 mg N/ amostra – 1 g de amostra), entretanto a degradabilidade e a taxa de degradação protéica do azevém, sem correção de amido, foram negativamente afetadas pela exclusão do bicarbonato de amônio da solução tampão ($P < 0,05$). O tratamento prévio da amostra interferiu ($P < 0,05$) nos resultados de degradação protéica das amostras de azevém e farelo de soja, mas não da farinha de carne. Em geral, a inclusão de amido para correção da amônia utilizada pelos microorganismos, resultou em maiores valores de degradabilidade da proteína do azevém ($P < 0,05$), mas não das outras amostras. O coeficiente de determinação (r^2) das estimativas da taxa de degradação, calculada com base na variação da concentração de amônia no meio ao longo do tempo de incubação, foram geralmente altos (superiores a 80%). As degradabilidades efetivas da proteína das amostras de farelo de soja, farinha de carne e azevém, estimadas pelo método *in vitro* foram inferiores às estimadas pelo método *in situ* ($P < 0,05$). Por outro lado, a degradabilidade efetiva da proteína de amostras de azevém e Cynodon estimada pelo método *in vitro* não diferiu dos valores obtidos *in vivo* com ovinos fistulados no duodeno. Em conclusão, o método *in vitro*/gases pode ser uma ferramenta útil para estimar a degradabilidade ruminal das proteínas, embora ainda necessite ser melhor validado com estudos *in vivo*.

Palavras-chave: degradabilidade, *in vitro*, *in situ*, *in vivo*, proteína, taxa de degradação.

ABSTRACT

Dissertation of Mastership
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Universidade Federal de Santa Maria

DEVELOPMENT AND EVALUATION OF AN *IN VITRO* METHOD TO ESTIMATE THE DEGRADATION OF PROTEINS IN THE RUMEN

AUTHOR: CARLA JOICE HÄRTER

ADVISOR: LUIS MARIA BONNECARRÈRE SANCHEZ

Date and defense's place: Santa Maria, February 13, 2009.

A set of assays was carried out to develop a method for estimating ruminal degradation of proteins based on ammonia production *in vitro*. Samples of soybean meal, meat and bone meal, ryegrass (*Lolium multiflorum*) and cynodon (*Cynodon dactylon* var. Dactylon) were incubated by using the procedures of the *in vitro*/gas method. The effects of sample amount; starch inclusion to correct for ammonia uptaked by bacteria; nitrogen concentration in buffer solution and preview treatment of samples for soluble nitrogen extraction were evaluated. Short-time *in vitro* assays were also carried out to estimate degradation rate or solubilization rate of soluble fraction of nitrogen. Results of protein degradation obtained for some samples incubated *in vitro* were compared to those obtained from *in situ* and *in vivo* assays carried out in parallel. Results of protein degradation of different samples were not affected by sample size (15 mg N/ sample – 1 g of sample) whereas degradability and degradation rate of ryegrass protein, without starch correction, was negatively affected by exclusion of ammonium bicarbonate from buffer solution ($P<0,05$). The preview extraction of soluble fraction of samples affected ($P<0.05$) protein degradation only of the ryegrass and soybean meal samples. Estimates of protein degradation for concentrate samples were not affected by starch inclusion. However, starch inclusion increased ($P<0.05$) protein degradation for ryegrass samples. Determination coefficient (r^2) of regressions relating ammonia concentration and incubation time were usually high (above 0.80). Protein degradability of soybean meal, meat and bone meal and ryegrass samples were lower by *in vitro* than by *in situ* method ($P<0.05$). In turn, protein degradability of ryegrass and cynodon samples estimated *in vitro* was similar to obtained *in vivo*. In conclusion, although it needs more consistent validation, the *in vitro*/gas method might be an useful tool for estimating rumen degradability of proteins.

Keywords: ammonia, degradability, *in vitro*, *in situ*, *in vivo*, protein, degradation rate.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1. Esquema da degradação protéica no rúmen.	19
FIGURA 2. Resumo dos ensaios realizados.....	29
FIGURA 3. Quantidade de N-NH ₃ (mg) presente em cada garrafa, em cada tempo após incubação, da amostra de farelo de soja em um ensaio <i>in vitro</i> gás. As amostras foram incubadas sem amido ou com inclusão de 100, 200 e 300 mg de amido por garrafa.....	37
FIGURA 4. Exemplo da reta de regressão gerada a partir das concentrações de N-NH ₃ de uma amostra, em relação aos respectivos volumes de gás (com amido = 0, 100, 200 e 300 mg). A intercepta da regressão é de 17,89, o que corresponde a concentração de N-NH ₃ quando a produção de gás for igual a zero.	38
FIGURA 5. Logaritmo natural da fração indegradável do nitrogênio de amostras incubadas com e sem amido, ao longo de 96 horas de incubação.	39
FIGURA 6. Teores de nitrogênio residual das amostras de farelo de soja (FS), farinha de carne e ossos (FC) e Azevém (AZ), após solubilização em tampão, ao longo do tempo.	41
FIGURA 7. Degradabilidade média de amostras de farelo de soja e farinha de carne à 24, 48, 72 e 96 horas de incubação <i>in vitro</i> (sem correção do nitrogênio pelo uso de amido) obtida nos ensaios 1 e 2. As barras sobre as colunas representam o respectivo desvio padrão. Letras diferentes sobre as colunas indicam que as médias dos dois ensaios são diferentes pelo teste F a 5% de probabilidade do erro Tipo I.....	44
FIGURA 8. Valores médios de taxa de degradabilidade (/h) nos ensaios 1 e 2. As barras sobre as colunas representam o respectivo desvio padrão.....	45
FIGURA 9. Valores médios de r ² das taxas de degradação nos ensaios 1 e 2. As barras sobre as colunas representam o respectivo desvio padrão.....	45
FIGURA 10. Valores de degradabilidade (% do N incubado) do farelo de soja, farinha de carne e ossos e azevém (<i>Lolium multiflorum</i>), nas 24, 48, 72 e 96 horas após incubação do	

ensaio 2 (n=3). As barras sobre as colunas representam o respectivo desvio padrão. Letras diferentes sobre as colunas indicam que as médias dos dois ensaios são diferentes pelo teste F a 5% de probabilidade do erro Tipo I.....	50
FIGURA 11. Valores de degradabilidade (% do N incubado) do farelo de soja, farinha de carne e ossos e azevém (<i>Lolium multiflorum</i>), nas 24, 48, 72 e 96 horas após incubação do ensaio 3 (n=9). As barras sobre as colunas representam o respectivo desvio padrão. Letras diferentes sobre as colunas indicam que as médias dos dois ensaios são diferentes pelo teste F a 5% de probabilidade do erro Tipo I.....	51
FIGURA 12. Valores de degradabilidade (% do N incubado) do farelo de soja, farinha de carne e ossos e azevém (<i>Lolium multiflorum</i>), nas 24, 48, 72 e 96 horas após incubação do ensaio 4 (n=3). As barras sobre as colunas representam o respectivo desvio padrão. Letras diferentes sobre as colunas indicam que as médias dos dois ensaios são diferentes pelo teste F a 5% de probabilidade do erro Tipo I.....	53
FIGURA 13. Valores de degradabilidade (% do N incubado) do farelo de soja, farinha de carne e ossos e azevém (<i>Lolium multiflorum</i>), nas 24, 48, 72 e 96 horas após incubação do ensaio 5 (n=6). As barras sobre as colunas representam o respectivo desvio padrão. Letras diferentes sobre as colunas indicam que as médias dos dois ensaios são diferentes pelo teste F a 5% de probabilidade do erro Tipo I.....	54
FIGURA 14. Taxa de degradação do nitrogênio (/h) do farelo de soja, farinha de carne e ossos e azevém (<i>Lolium multiflorum</i>) dos ensaios 2, 3, 4 e 5. As barras sobre as colunas representam o respectivo desvio padrão. Letras diferentes sobre as colunas indicam que as médias dos dois ensaios são diferentes pelo teste F a 5% de probabilidade do erro Tipo I.....	55
FIGURA 15. Valores de r ² (%) das taxas de degradação do nitrogênio do farelo de soja, farinha de carne e ossos e azevém (<i>Lolium multiflorum</i>) dos ensaios 2, 3, 4 e 5. As barras sobre as colunas representam o respectivo desvio padrão.....	56
FIGURA 16. Degradabilidades médias (% N incubado), das amostras incubadas com uso de inibidores in vitro. Amostras com antimicrobiano = Am; Az20 = azevém com 20% de inoculo; Az50 = azevém com 50% de inoculo; Az100 = azevém com 100% de inoculo; Fs20 = farelo de soja com 20% de inoculo; Fs50 = farelo de soja com 50% de inoculo; Fs100 = farelo de soja com 100% de inoculo;	57
FIGURA 17. Taxa de solubilização do N das amostras de farelo de soja durante 3 horas de incubação.	58
FIGURA 18. Taxa de solubilização do N das amostras de farinha de carne e ossos durante 3 horas de incubação.	58

FIGURA 19. Taxa de solubilização do N das amostras de azevém durante 3 horas de incubação.....	59
FIGURA 20. Taxa de degradação do nitrogênio (/h) do farelo de soja, farinha de carne e ossos e azevém (<i>Lolium multiflorum</i>) dos ensaio 3 <i>in vitro</i> , calculado com e sem amido e <i>in situ</i> . As barras sobre as colunas representam o respectivo desvio padrão. Letras diferentes sobre as colunas indicam que as médias dos dois ensaios são diferentes pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.....	60
FIGURA 21. Degradabilidade da PB (%) do farelo de soja, farinha de carne e ossos e azevém (<i>Lolium multiflorum</i>) dos ensaios ensaio 5 <i>in vitro</i> , calculado com e sem amido e <i>in situ</i> . As barras sobre as colunas representam o respectivo desvio padrão. Letras diferentes sobre as colunas indicam que as médias dos dois ensaios são diferentes pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.	61
FIGURA 22. Correlação entre os valores de degradabilidade protéica ruminal, encontrada <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> com azevém (<i>Lolium multiflorum</i>) e grama-paulista (<i>Cynodon dactylon</i> var. <i>dactylon</i>).....	62

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Resumo dos ensaios <i>in vitro</i> conduzidos no desenvolvimento da metodologia:..	29
TABELA 2. Composição química das amostras experimentais:.....	30
TABELA 3. Médias de degradabilidade, taxas de degradação, e r^2 ao longo do tempo do farelo de soja (FS), farinha de carne (FC), e azevém (AZ) (<i>Lolium multiflorum</i>), nos ensaios 2 e 3 ¹	47
TABELA 4. Médias de degradabilidade, taxas de degradação, e r^2 ao longo do tempo do farelo de soja (FS), farinha de carne (FC), e azevém (AZ) (<i>Lolium multiflorum</i>), nos ensaios 4 e 5 ¹	48

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A – Valores individuais de degradabilidade do farelo de soja, farinha de carne e azevém as 24 e 48 horas, nos cinco ensaios	78
APÊNDICE B – Valores individuais de degradabilidade do farelo de soja, farinha de carne e azevém as 72 e 96 horas, nos cinco ensaios	80
APÊNDICE C – Valores individuais de taxa de degradação protéica e seus coeficientes de determinação (r^2) do farelo de soja, farinha de carne e azevém, nos cinco ensaios	82
APÊNDICE D – Valores individuais de degradabilidade e taxa de degradação protéica do farelo de soja, farinha de carne e azevém, nos métodos <i>in situ</i> , <i>in vitro</i> sem amido e <i>in vitro</i> com amido	84
APÊNDICE E – Valores individuais de taxa de degradação protéica do farelo de soja, farinha de carne e azevém, nos métodos <i>in situ</i> e <i>in vitro</i> , do ensaio 3, calculadas sem amido e com amido	85
APÊNDICE F – Valores individuais de desaparecimento de N solúvel em tampão borato-fosfato em 3 horas e seus respectivos valores transformados em logaritmo	87
APÊNDICE G – Valores individuais de degradabilidade de forragens, calculados com base na taxa de degradação da proteína obtida <i>in vitro</i> , no fracionamento do nitrogênio, com 2% de taxa de passagem.....	88

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A. Composição do meio de cultura ¹	90
ANEXO B. Composição do meio de cultura ¹	91
ANEXO C. Composição do meio de cultura ¹	92
ANEXO D. Descrição da metodologia adotada para determinação de aminoácidos no líquido ruminal.....	93

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 HIPÓTESE	17
2.1 Hipótese geral	17
2.2 Hipóteses secundárias	17
3 ESTUDO BIBLIOGRÁFICO	18
3.1 Proteína na nutrição	18
3.2 Degradação da proteína	18
3.3 Valor protéico dos alimentos estimado por modelos matemáticos	20
3.4 Métodos para estimar a degradação protéica	22
3.4.1 Método <i>in vivo</i> :.....	22
3.4.2 Método <i>in situ</i> :	24
3.4.3 Método <i>in vitro</i> :.....	25
4 MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 Local e época	28
4.2 Material experimental	28
4.3 Desenvolvimento da metodologia	30
4.3.1 Ensaio <i>in vitro</i> /gases	30
4.3.2 Ensaio <i>in vitro</i> de curta duração	32
4.3.3 Ensaio de solubilização do nitrogênio	33
4.3.4 Ensaio <i>in situ</i>	33
4.3.5 Avaliação do método <i>in vitro</i>	34
4.4 Análises químicas	36
4.5 Cálculos e estimativas	36
4.5.1 Correção da concentração de amônia no meio de incubação pela inclusão de amido	36
4.5.2 Cálculo da degradabilidade <i>in vitro</i> da proteína bruta.....	38
4.5.3 Cálculo da taxa de degradação <i>in vitro</i> da proteína bruta.....	39
4.5.4 Cálculo da taxa de degradação <i>in situ</i>	39
4.5.5 Cálculo da taxa de solubilização do N.....	40
4.5.6 Estimativa da degradabilidade efetiva <i>in vitro</i> e <i>in situ</i>	41
4.6 Análises estatísticas	42
5 RESULTADOS	44
6 DISCUSSÃO	63
6.1 Efeito do tamanho da amostra	63
6.2 Efeito da composição do meio de incubação	63
6.3 Efeito do tratamento prévio das amostras	65
6.4 Efeito da inclusão de amido para obtenção dos valores de degradabilidade	66

6.5	Uso de inibidores <i>in vitro</i> para estimativa da degradabilidade protéica	66
6.6	Comparação do método <i>in vitro</i> com os métodos <i>in situ</i> e <i>in vivo</i>	67
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	68
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

1 INTRODUÇÃO

O suprimento de aminoácidos absorvidos no intestino dos ruminantes provém da fração protéica não degradada no rúmen e principalmente da proteína de origem microbiana, que por sua vez é formada a partir da proteína degradável no rúmen (PDR). A PDR fornece peptídeos, aminoácidos livres e amônia para o crescimento microbiano. Se a quantidade de proteína degradada excede à disponibilidade de carboidratos fermentáveis, grande quantidade de nitrogênio não utilizado pelos microorganismos ruminais pode ser perdida na forma de amônia (NOCEK; RUSSEL, 1988). Essa amônia é absorvida na parede ruminal para a corrente sanguínea e convertida em uréia no fígado. A uréia pode ser reciclada através da saliva ou ser excretada na urina (VAN SOEST, 1994; HUNTINGTON; ARCHIBEQUE, 1999). Com o objetivo de evitar perdas excessivas de nitrogênio na forma de uréia pela urina busca-se o conhecimento da degradabilidade da proteína para formulação de dietas equilibradas, que possibilitem uma sincronia na disponibilidade dos nutrientes à fermentação ruminal e capazes de suprir as exigências dos animais. Dessa forma evitam-se as perdas de nitrogênio para a atmosfera, reduzindo os custos de produção e os impactos causados ao meio ambiente. No entanto, para que isso possa ser alcançado, necessita-se de métodos eficientes para determinar a degradabilidade da proteína no rúmen.

Os métodos *in vivo* e *in situ* são os mais utilizados para estimar a degradação da proteína no rúmen. Entretanto, estimativas realizadas *in vivo*, além de serem mais demoradas, têm custo elevado e necessitam de um grande número de animais fistulados (TAMMINGA; CHEN, 2000). Já o método *in situ*, que consiste na suspensão de sacos de náilon com amostra diretamente no rúmen, não exige um grande número de animais, entretanto ainda é limitado o número de amostras que podem ser analisadas com esse procedimento. Além disso, esse método é criticado pela interferência nos resultados de desaparecimento de nitrogênio causada pela contaminação microbiana da amostra e pela necessidade de padronização da técnica, pois existe muita variabilidade entre os laboratórios em função de aspectos relacionados à condução dos ensaios (LÓPEZ, 2005; HVELPLUND; WEISBJERG, 2000; NOCEK, 1988).

Têm sido propostos métodos alternativos *in vitro* para a estimativa da degradabilidade protéica (RAAB, 1983; LANA, 2000; HERNÁNDEZ 2002; LANA, 2007; BRODERICK; CLAYTON, 1992), ensaios que utilizam inibidores de crescimento microbiano

(BRODERICK, 1987; HERNÁNDEZ, 2002) e uso de enzimas proteolíticas (KRISHNAMOORTHY et al., 1983; BARTLE et al., 1986; KOHN; ALLEN, 1995).

O método baseado na produção de gases proposto por Raab foi criado em 1983, quando as incubações ainda eram realizadas em seringas, utilizando quantidades de amostras relativamente pequenas, o que pode aumentar a variabilidade entre as estimativas. Nesse método a degradabilidade da proteína era estimada com a determinação de nitrogênio amoniacal pelo método Kjeldahl, sendo analisadas as amostras somente após o término da incubação, nas 24 horas, sem verificar a taxa de liberação de amônia no meio de incubação durante esse tempo.

Em vista disso, o presente estudo teve o objetivo de desenvolver e avaliar um método para estimar a degradabilidade da proteína com base na taxa de liberação de amônia, ao longo de 96 horas, através da técnica semi-automatizada de produção de gases *in vitro*.

2 HIPÓTESE

2.1 Hipótese geral

A degradabilidade ruminal da proteína pode ser estimada por um método *in vitro* com base na produção de gases, onde se mede a liberação de nitrogênio amoniacal no meio de incubação.

2.2 Hipóteses secundárias

O tamanho da amostra, a presença de uma fonte de nitrogênio no meio de incubação e/ou o processamento da amostra podem interferir nas variáveis de degradação proteica obtidas *in vitro*.

As variáveis de degradação proteica obtidas com base na liberação de amônia *in vitro* devem ser corrigidas para a fração da amônia captada pelas bactérias através da inclusão de amido no meio de incubação.

3 ESTUDO BIBLIOGRÁFICO

3.1 Proteína na nutrição

Proteínas são compostos orgânicos de estrutura complexa e de elevado peso molecular, fornecem a base estrutural dos tecidos e órgãos dos animais, formam neurotransmissores e hormônios polipeptídicos, como por exemplo, a insulina (TAMMINGA; CHEN, 2000). Também exercem função enzimática, energética e de defesa (anticorpos). As proteínas encontradas dentro do núcleo da célula (DNA) transmitem as informações genéticas e são responsáveis pela síntese protéica contínua. Além disso, os protídeos são responsáveis pelos mecanismos contráteis (actina e miosina).

São compostas por aminoácidos como unidades fundamentais, os quais estão unidos por ligações peptídicas que se estabelecem entre o grupo amina de um aminoácido e o grupo carboxilo de outro aminoácido, com a perda de uma molécula de água.

Embora na natureza existam mais de 300 aminoácidos, apenas 20 desses estão presentes na estrutura das proteínas, e para fins nutricionais, são classificados como aminoácidos essenciais (AAE) e aminoácidos não essenciais (AANE). Os AAE não são sintetizados pelo organismo animal, ou sintetizados em quantidades inferiores às exigências. A eficiência da utilização da proteína metabolizável pelos ruminantes depende do teor e da proporção de AAE que chegam ao intestino.

3.2 Degradação da proteína

A degradação da proteína dos alimentos no rúmen tem grande importância no suprimento de aminoácidos para os animais ruminantes, e ocorre através da ação de enzimas (proteases, peptidases e deaminases) secretadas pelos microorganismos ruminais (figura 1) (KOZLOSKI, 2002). A PDR é composta de proteína verdadeira e nitrogênio não protéico (NNP). A proteína verdadeira pode ser degradada em peptídeos e aminoácidos (AA), os quais podem ser deaminados em amônia (NH₃) ou incorporados à proteína microbiana. O nitrogênio não protéico é composto de ácidos nucleicos, NH₃, AA, e pequenos peptídeos. Os peptídeos,

AA e a NH_3 são utilizados como fonte de N pelos microorganismos do rúmen (BACH et al., 2005). A massa microbiana, por sua vez, será a principal fonte de aminoácidos que chega ao intestino delgado, representando 45 a 55% da proteína metabolizável. A proteína não degradada no rúmen (PNDR) pode significar uma segunda fonte de aminoácidos disponíveis ao animal (SANTOS, 2006).

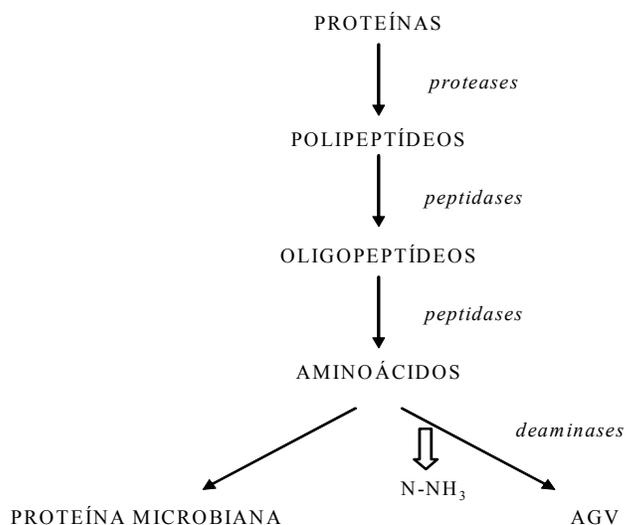


Figura 1. Esquema da degradação proteica no rúmen.

O conhecimento sobre a degradação da proteína dos alimentos é fundamental para que se chegue a níveis ideais de PDR, o que otimizaria o crescimento microbiano e levaria a encontrar quantidades de PNDR que complementaria as exigências nutricionais dos ruminantes (NRC, 2001). Adicionalmente, um melhor equilíbrio na oferta de PDR levaria uma menor perda de compostos nitrogenados, evitando a produção em excesso de amônia e sua liberação na forma de uréia pela urina, reduzindo assim o impacto ambiental.

A degradabilidade proteica ruminal pode ser afetada por vários fatores, tais como a composição química e física da proteína bruta (PB). O valor de PB dos alimentos considera o total de nitrogênio (N), incluindo o nitrogênio protéico e outros compostos nitrogenados não protéicos como aminas, amidas e aminoácidos. A maior parte do nitrogênio da planta está em forma de aminoácidos formando proteína. A proporção de nitrogênio não protéico (NNP) varia de 23 a 30% do nitrogênio total. Considera-se que o NNP é rapidamente e totalmente degradado no rúmen, e tanto gramíneas como leguminosas, possuem teores substanciais dessa

fração em sua composição. A presença de altos níveis de compostos secundários nas plantas, como os taninos, também podem modificar a fermentação da fração protéica.

A estrutura globular, a presença de ligações dissulfeto na proteína e o pH ruminal interferem a atividade proteolítica microbiana, bem como o acesso microbiano à proteína, dificultando sua a degradabilidade. Além disso, o aumento da taxa de passagem, causado pela maior ingestão de matéria seca está inversamente correlacionado com a quantidade de PDR. O processamento de certos tipos de alimentos tem como objetivo diminuir a degradabilidade ruminal da proteína e aumentar a oferta de aminoácidos para a digestão intestinal. Entretanto, algumas praticas adotadas, como o aquecimento excessivo, provocam a formação de complexos protéicos (reação de Maillard), afetando negativamente a digestão tanto a nível ruminal como também ao longo de todo o trato digestivo dos animais.

3.3 Valor protéico dos alimentos estimado por modelos matemáticos

Os modelos matemáticos baseiam-se na estimativa das exigências nutricionais de diferentes espécies e categorias de ruminantes, preconizando a melhor eficiência de utilização dos nutrientes, a fim de reduzir os custos e os impactos ambientais provocados pelas criações (TEDESCHI et al., 2005).

Por muito tempo, as exigências protéicas para a formulação de rações, foram baseadas no teor de proteína bruta dos alimentos, no entanto, o potencial de produção individual dos animais vem aumentando e torna-se cada vez mais importante levar em consideração não só a quantidade de proteína, mas principalmente o perfil de aminoácidos essenciais que chega ao intestino para serem absorvidos (SANTOS, 2006). Com base nisso, em todo o mundo tem sido publicado novos sistemas protéicos para estimar as exigências dos ruminantes.

Um dos importantes avanços científicos empregados para a obtenção das exigências protéicas dos ruminantes, foi a introdução do conceito de proteína metabolizável (PM) para prever a produção de proteína microbiana (PMic), pelos sistemas de Burroughs et al. (1974), Institut National de la Recherche Agronomica (INRA, 1989), Agricultural Research Council (ARC, 1980), e do National Research Council (NRC, 1985). O sistema de PM começou a ser posto em prática pelo NRC bovino de leite de 1989 e 2001 (NRC, 1989; 2001), e em 1996 para bovinos de corte (NRC, 1996; 2000). O NRC baseia-se no suprimento de proteína metabolizável mediante divisão da proteína bruta em duas frações (PDR e PNDR), separando

as exigências do rúmen das do animal (NRC 2000; 2001). Através de valores bromatológicos tabulados, o modelo estima o valor protéico com base na composição química de determinado alimento, sendo assim classificado como de nível 1. Esse sistema baseia-se em cálculos estáticos e deterministas de degradação dos carboidratos e proteínas, e produção de proteína microbiana, não levando em consideração a manutenção dos microorganismos e a reciclagem do N no rúmen (TEDESCHI et al., 2005).

O Cornell Net Carbohydrate and Protein System (CNCPS) publicado em 1992 (RUSSEL et al., 1992) é um modelo mecanicístico que leva em consideração a fermentação ruminal, crescimento microbiano, taxa de digestão e passagem do alimento, bem como seu nível de energia digestível com base na sua composição bromatológica e condições fisiológicas do animal, com o objetivo de avaliar a dieta e o desempenho animal em diferentes situações. Além de utilizar o modelo do nível 1 para prever as exigências protéicas, o CNCPS também adota uma forma mais dinâmica, denominada nível 2, onde compara as taxas de digestão e de passagem de cada uma das frações dos carboidratos e proteínas (frações A, B1, B2, B3, e C), que são determinadas quimicamente (FOX et al., 2004). Dessa forma, o modelo estima a quantidade de matéria orgânica fermentada no rúmen, a síntese de proteína microbiana, a produção de amônia, PDR e PNDR, digestão intestinal e disponibilidade de energia e proteína metabolizável.

O valor protéico dos alimentos e os requerimentos dos animais estimados pelo INRA (1989) são expressos em proteína verdadeiramente digerida e absorvida no intestino delgado (PDI), sendo essa a soma da fração verdadeiramente digerida da PNDR (PNDRDI) e da proteína microbiana (PMDI). Esse sistema calcula dois valores de PMDI, sendo a proteína microbiana verdadeira que pode ser produzida mediante a disponibilidade de N ou aquela sintetizada a partir da energia disponível do alimento. A estimativa da PDI é feita com base na quantidade de PB, na degradabilidade da PB, na matéria orgânica fermentável (MOF) e digestibilidade intestinal da proteína verdadeira indegradável no rúmen dos alimentos, sendo adotado o método *in situ* para a estimativa dos parâmetros de degradabilidade. Na estimativa de PMDI, o modelo não considera o nitrogênio reciclado e assume que os aminoácidos correspondem a 80% da proteína microbiana, sendo que estes aminoácidos teriam uma digestibilidade intestinal de 80%. Nos alimentos energéticos, a proteína microbiana é estimada como 145 g /kg de MOF e nos protéicos, como 90% da PB.

O sistema Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization (CSIRO) (1990) estima a degradabilidade protéica através de equações empíricas baseadas no conteúdo de FDN e PB dos alimentos. É estimado uma produção de PMic de 170 g / kg de MO

digestível para leguminosas em estágio inicial de crescimento e gramíneas, 130 g / kg de MO digestíveis para misturas de alimentos e 95 g / kg de MO para silagens. O modelo considera que 56% da PMic produzida se tornará em PM, e que uma possível falta de N degradável no rúmen, será suprida pelo N endógeno reciclado.

O Agricultural and food research council (AFRC, 1993) foi desenvolvido com base na reunião de equações já publicadas no Agricultural research council (ARC, 1980) e AFRCs de 1990, 1992, 1991 e 1991. A síntese de proteína microbiana é computada como gramas / MJ de energia metabolizável fermentada e assume que a PMic contém 75% de aminoácidos, o quais possuem uma digestibilidade intestinal de 85%, resultando um total de 63,75% de PM da PMic. Esses valores também são corrigidos para o nível de consumo. Esse modelo assume que a síntese microbiana está condicionada a fração rapidamente degradável (N solúvel em água) e à potencialmente degradável no rúmen, determinada pela taxa de degradação e taxa de passagem a qual é influenciada pelo nível de consumo. O nitrogênio reciclável não é computado e estima-se que a PNDR tem uma digestibilidade intestinal de 90% depois de descontado o teor de proteína insolúvel em detergente ácido.

3.4 Métodos para estimar a degradação protéica

Os modelos de cálculo de ração necessitam de estimativas confiáveis da taxa de degradação da fração protéica, para que junto às taxas de degradação de carboidratos, possa ser estimada a quantidade de matéria orgânica digerida no rúmen, a produção microbiana, produção de amônia, a fração não degradada no rúmen e a digestão intestinal.

As medidas de taxa de degradação podem ser gravimétricas, que se baseia no desaparecimento da amostra incubada *in situ* ou *in vitro*, e medidas metabólicas, que mede os produtos finais da degradação (PELL et al., 1994). Além disso, a degradabilidade protéica pode ser obtida através de experimentos realizados diretamente nos animais (*in vivo*).

3.4.1 Método *in vivo*:

A forma utilizada para medir a degradação protéica *in vivo* baseia-se na utilização de animais preparados cirurgicamente com fístula duodenal reentrante ou do tipo T. A proteína total que passa pelo duodeno proximal é medida e amostrada, e a fração protéica proveniente dos microorganismos ruminais pode ser determinada pelo uso de marcadores .

Como marcadores, são utilizados ácidos nucleicos (RNA, DNA), purinas, amino ácidos (2,6 – ácido diaminopimelico (DAPA), D-alanina), e isótopos como sulfúrico-35 (P^{35}), fósforo-32 (P^{32}) e nitrogênio-15 (N^{15}).

A estimativa de nitrogênio de origem microbiana (NM) no nitrogênio não amoniacal do intestino é através da seguinte relação:

$$\text{NM} = \frac{\text{marcador na digesta} \times \text{marcador nos microorganismos}}{\text{Teor de N dos microorganismos}} \quad (1)$$

Depois de descontadas as quantidades de N amoniacal ($N-NH_3$) e NM do N total da digesta duodenal é estimada a degradabilidade protéica com base no valor de N residual, composto pelo N de origem do alimento não degradado no rúmen e N endógeno. A principal limitação desse método em estimar a degradação protéica é pela dificuldade de separar o N de origem endógena da PNDR. Entretanto, muitos pesquisadores assumem esse erro e calculam a PDR com base no N consumido (CN) e fluxo de N no duodeno conforme a equação abaixo:

$$\text{PDR} = \text{CN} - (\text{N total} - (\text{NM} + \text{N-NH}_3)) \quad (2)$$

Teoricamente, essa técnica é a mais confiável para a medida da degradabilidade protéica, no entanto ela tem muitas desvantagens, pois é invasiva e de elevado custo. Em animais recebendo dieta compostas com mais de um tipo de alimento, impossibilitam a utilização dessa técnica, e por se tratar de ruminantes, maior é a dificuldade de estimar isoladamente a degradação de um alimento concentrado. A medida do fluxo de digesta intestinal é um processo laborioso (REYNOLDS et al., 1994; PONCET et al., 1995), demanda muito tempo (STERN et al., 1994) e o processo cirúrgico de canulação pode alterar as taxas de fluxo normais (SUTTON; OLDHAM, 1977; FAICHNEY, 1993). Outra limitação é a medida com acurácia da proteína microbiana.

Como alternativa, o método de esvaziamento ruminal, quando conduzido com cuidado para diferentes tempos após a alimentação e com uso de marcadores, pode resultar em boas informações a respeito da dinâmica da degradação e síntese microbiana ruminal.

3.4.2 Método *in situ*:

Proposto por Mehrez e Ørskov, em 1977, o método *in situ* é o mais amplamente utilizado nos estudos de degradabilidade da fração nitrogenada dos alimentos para utilização em sistemas de predição de exigências nutricionais em ruminantes (NRC, 1996; AFRC, 1992). Baseia-se no desaparecimento do nitrogênio da amostra incubada em saquinhos de poliéster, diretamente no rúmen. Se comparada com o *in vivo*, é considerada uma técnica de fácil e rápida execução, necessita pouca quantidade de alimento, além de possibilitar o acompanhamento da degradação ao longo do tempo. Com isso, embora a amostra não passe os processos de mastigação, ruminação e escape ruminal, esse método é o mais utilizado para estudos desta natureza. Entretanto, fatores como, a necessidade de animais fistulados no rúmen, o tipo de dieta desses animais, a quantidade e granulometria da amostra a ser incubada, o tamanho e a porosidade do saquinho, devem de ser levados em consideração, pois influenciam nos resultados. Em geral, na lavagem dos saquinhos que correspondem ao tempo zero, ocorrem perdas significativas de amostra, o que superestima a fração prontamente solúvel do nitrogênio. Outro aspecto negativo é a contaminação do resíduo da incubação pelos microorganismos aderidos às partículas, sendo uma das maiores fontes de erro para a estimativa da taxa de degradação ruminal da proteína (NOCEK, 1988; VANZANT et al., 1998). Além disso, é discutida a barreira física que os saquinhos representam ao acesso dos microorganismos à amostra, podendo ocasionar sua degradação incompleta (LÓPEZ, 2005), e alguns estudos afirmam que a população microbiana, bem como a atividade proteolítica no interior dos saquinhos é diferente daquela no ambiente ruminal (MICHALET-DOREAU & NOZIERE, 1998; HUHTANEN, 1998).

Em 1979 Ørskov e McDonald propuseram um modelo para estimar a cinética da degradação dos alimentos, pressupondo a divisão da proteína em três frações: A, B e C. A primeira, corresponde a todo nitrogênio não protéico e proteína solúvel do alimento, sendo a porção totalmente e rapidamente solúvel no rúmen. A fração B é aquela potencialmente solúvel, que sofrerá degradação durante todo o tempo de incubação. E por último, C é a fração indegradável no rúmen. O modelo é expresso pela seguinte equação linear:

$$P = a + b * (1 - \exp^{-c*t}) \quad (3)$$

Onde:

P = degradabilidade potencial da proteína;

^t = tempo de incubação

a = representa o substrato solúvel e rapidamente degradável;

b = representa o substrato insolúvel, mas potencialmente degradável;

^c = taxa constante da função b.

Adicionalmente, na equação acima foi incluída a taxa de passagem do alimento para estimar a degradabilidade efetiva.

$$\text{Degradabilidade efetiva} = a + \frac{(b \times c)}{(c + k)} \quad (4)$$

Onde: k = taxa de passagem das partículas sólidas do rúmen.

Após a determinação das frações A, B, C, taxa de passagem (kp) e obtenção da taxa de degradação protéica (kd) através do modelo acima descrito, torna-se possível o cálculo das frações PDR e PNDR da proteína de determinado alimento com as seguintes equações (NRC, 2001):

$$\text{PDR} = A + B \left[\frac{kd}{(kd+kp)} \right] \quad (5)$$

$$\text{PNDR} = B \left[\frac{kp}{(kd+kp)} \right] + C \quad (6)$$

3.4.3 Método *in vitro*:

A degradação ruminal é fundamental para o fornecimento de nutrientes para suprir as exigências nutricionais dos microorganismos anaeróbicos e tecidos dos ruminantes. Portanto é essencial o estudo da dinâmica da fermentação e potencial nutritivo de vários alimentos antes de sua utilização na formulação de dietas. Muitos métodos são utilizados, entretanto, alguns se tornaram indesejáveis devido às implicações ao bem estar animal. Portanto, há uma necessidade de desenvolver métodos *in vitro* que não exijam a intervenção cirúrgica nos

ruminantes, ou que pelo menos as amenize par obtenção do líquido ruminal em estudos de degradação protéica.

As técnicas *in vitro* utilizadas para estimar a degradação protéica baseiam-se na medida dos produtos finais da degradação, como por exemplo, o nitrogênio amoniacal. Esses ensaios têm como objetivo diminuir intervenções cirúrgicas em animais, e como principais vantagens podemos citar a praticidade, pois envolve menos tempo para condução e baixo custo por não demandar de um grande número de animais para sua realização. Em geral, os métodos *in vitro* estimam a degradabilidade com base no aparecimento dos produtos da degradação protéica no meio de incubação.

Os primeiros estudos *in vitro* realizados para estimar a de degradação protéica no rúmen foram conduzidos por Little no ano de 1963, citado por Calsamiglia et al. (2000), que incubou amostras de alimentos com inoculo sob condições anaeróbicas e estimou a degradação protéica pela liberação de N-NH₃ no meio.

Mais tarde, Raab et al. (1983) desenvolveu um método que se baseia na inclusão de níveis crescentes de carboidratos fermentáveis no meio de incubação para determinar a fração de N-NH₃ utilizada pelas bactérias. Por equação de regressão relacionando as concentrações de N-NH₃ nos diferentes níveis de inclusão de carboidratos chegaram a um valor de liberação de N-NH₃ quando a produção de gás era igual à zero. Esse valor de N-NH₃ foi então considerado ser proveniente da degradação protéica, incluindo a fração utilizada para o crescimento bacteriano.

Broderick, em 1987, propôs um método utilizando hidrazina e clorafenicol como inibidores do crescimento bacteriano para estimar a degradabilidade protéica através da liberação de aminoácidos e N-NH₃. Em 1992, Broderick e Clayton, obtiveram resultados mais consistentes de degradabilidade protéica, em duas horas, usando um modelo matemático baseado nas equações de Michaelis-Menten. Neutze et al. (1993) modificou o método que utiliza inibidores *in vitro* pela estimativa da fração degradável da proteína com nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético. Hristov e Broderick (1994) desenvolveram um sistema utilizando ¹⁵N para distinguir a fração protéica utilizada pelos microorganismos da fração indegradável.

Vários estudos foram conduzidos com o objetivo avaliar o uso, em meio anaeróbico, de proteases extraídas de plantas e enzimas obtidas de bactérias ou fungos (KRISHNAMOORTHY et al., 1983; BARTLE et al., 1986; AUFRÈRE et al. 1991). Os procedimentos enzimáticos requerem o uso de enzimas obtidas comercialmente, sendo que as mais comumente usadas são a pepsina e proteases, as quais possuem um pH ótimo de ação,

mas que, no entanto não condizem com o pH ruminal (VAN SOEST, 1994). Outro problema relacionado a esse método é a difícil obtenção de um perfil enzimático semelhante ao que se tem no ambiente ruminal. Estudos conduzidos por Kohn e Allen (1995) revelam que o uso conjunto de enzimas proteolíticas com celulolíticas melhora a estimativa de degradação.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local e época

Os ensaios *in vitro*, *in situ* e *in vivo* (figura 2), bem como todas as análises laboratoriais, foram conduzidos no Laboratório de Bromatologia e Nutrição de Ruminantes, do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Santa Maria, durante o período de maio de 2007 a dezembro de 2008.

4.2 Material experimental

Para desenvolvimento da metodologia foram incubadas *in vitro* (tabela 1) e *in situ* amostras de farelo de soja (alta degradabilidade), farinha de carne e ossos (baixa degradabilidade) e azevém (*Lolium multiflorum*). A farinha de carne não foi fornecida como dieta animal, sendo usada somente em ensaios *in vitro* e *in situ*. Paralelamente, para avaliação da metodologia, foram utilizados alguns dados de amostras de azevém (*Lolium multiflorum*) e capim-paulista (*Cynodon dactylum*), testadas *in vivo*, onde foram oferecidas verdes, mediante corte diário (tabela 2).

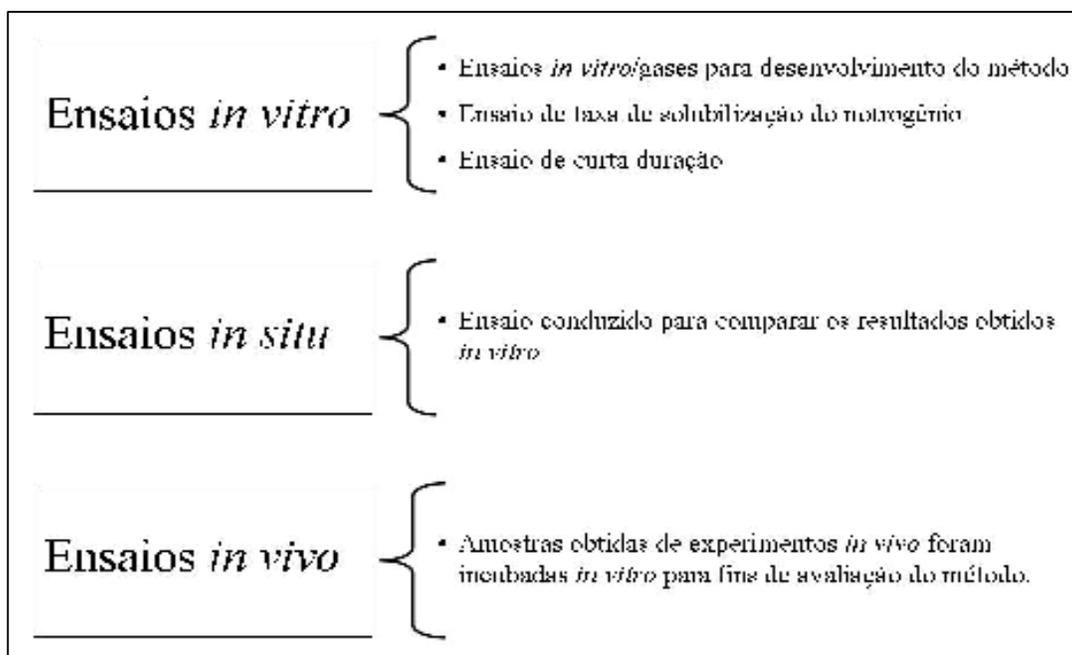


Figura 2 – Resumo dos ensaios realizados

Tabela 1 – Resumo dos ensaios *in vitro* conduzidos no desenvolvimento da metodologia:

Ensaio	Quantidade de amostra	Meio de incubação	Amido (mg)	Tratamento prévio da amostra
1	1 g	11 mg/dl N	-	Amostra pura
2	15 mg N	11 mg/dl N	100, 200, 300 e 400	Amostra pura
3	15 mg N	sem N	100, 200, 300 e 400	Amostra pura
4	30 mg N	8 mg/dl N	100, 200 e 300	Amostra solubilizada momentos antes à incubação
5	30 mg N	8 mg/dl N	100, 200 e 300	Solubilização de uma grande quantidade de amostra

Tabela 2 – Composição química das amostras experimentais:

Alimento	% MS	MO (% MS)	N (% MS)	N solúvel ¹ (% N)	B ² (%N)	NIDA ³ (%N)
<i>Ensaaios in vitro e in situ</i>						
Farelo de soja	96,7	93,1	8,26	20,0	75,6	4,4
Farinha de carne e ossos	97,5	71,4	9,67	25,4	72,7	1,9
Azevém	95,2	76,0	3,09	41,5	46,3	12,2
<i>Ensaio in vitro e in vivo⁴</i>						
Azevém 1	92,4	93,0	5,11	43,3	52,5	4,2
Azevém 2	92,6	77,7	3,94	70,8	23,2	6,0
Cynodon 1	91,7	77,4	1,77	8,0	81,5	10,5
Cynodon 2	91,5	77,4	1,91	35,2	53,4	11,4

¹N solubilizado após tratamento de 3 horas em tampão borato-fosfato à 4°C;

²B= N total – (Nsolúvel em tampão borato-fosfato + N insolúvel em detergente ácido);

³NIDA = N insolúvel em detergente ácido;

⁴Amostras obtidas de ensaios *in vivo*;

4.3 Desenvolvimento da metodologia

4.3.1 Ensaaios *in vitro*/gases

Foram conduzidos cinco ensaios utilizando a técnica semi-automatizada de produção de gases *in vitro* (MAURÍCIO et al., 1999) descritos abaixo:

Ensaio 1:

Foi incubado aproximadamente 1g de amostra de farelo de soja e farinha de carne e ossos, com 100 ml de fluído ruminal tamponado (THEODOROU et al., 1994), numa relação tampão/fluído ruminal de 8:2 conforme Goering & Van Soest (1970) (ANEXO A). As amostras foram incubadas anaerobicamente, em triplicatas, em frascos de vidro (capacidade de 160ml) vedados com tampas de borracha. O líquido ruminal foi obtido de bovinos fistulados no rúmen, recebendo pastagem de azevém (*Lolium multiflorum*) à vontade. Após a coleta, o líquido foi filtrado através de duas camadas de gaze sob injeção contínua de CO₂ e mantido em banho-maria a 39° C. Os frascos foram vedados e incubados a 39°C em estufa de ar forçado.

Para estimar a taxa de degradação da proteína foi coletado 0,5 ml do conteúdo de cada garrafa, nos tempos 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 18, 24, 36, 48, 72 e 96 horas após a incubação, com auxílio de uma seringa de 1mL com agulha. Esse conteúdo era transferido para frascos eppendorf, imediatamente adicionado 1,5 ml de uma solução de ácido sulfúrico 0,36 molar e refrigerado para posterior determinação de nitrogênio amoniacal.

Ensaio 2:

Foi conduzido utilizando-se os mesmos procedimentos do Ensaio 1, exceto que a quantidade de amostra incubada em cada garrafa foi modificada de modo a serem incubadas quantidades equivalentes a 15 mg de nitrogênio. Foram ainda incubadas garrafas adicionais contendo, além de cada amostra, 100, 200, 300 e 400 mg de amido (amido solúvel p.a., MERCK). Adicionalmente a pressão originada na parte superior dos frascos foi medida nos tempos 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 18, 24, 36, 48, 72 e 96 horas após a incubação, utilizando-se um transdutor de pressão conectado a uma válvula de três saídas. A primeira saída foi conectada a uma agulha (0,6 mm), a qual era inserida na tampa de borracha, a segunda ao transdutor de pressão e a terceira permanecia livre sendo utilizada para retirada dos gases do interior dos frascos a cada leitura, até pressão nula.

Os valores de pressão foram convertidos em volume de gás utilizando-se equação previamente determinada (SENGER, 2005):

$$y = - 0,0593x^2 + 5,01x - 0,4694 . \quad (7)$$

A produção de gás em cada tempo era corrigida para a produção de gás média obtida de frascos contendo fluido ruminal tamponado sem amostra (brancos).

Ensaio 3:

Foram conduzidas três corridas utilizando-se os mesmos procedimentos do Ensaio 2, exceto que o tampão utilizado no meio de cultura foi modificado, retirando-se bicarbonato de amônia (ANEXO B).

Ensaio 4:

Foi conduzida uma corrida utilizando-se os mesmos procedimentos do Ensaio 2, exceto que: as amostras foram pesadas em triplicata e individualmente em saquinhos de

poliéster (cujo tamanho equivaleu a 25 mg de amostra/cm²) em quantidades equivalentes a 30 mg de N, os quais foram selados e, previamente à incubação, foram mergulhados em uma solução tampão borato-fosfato por 3 horas à 4°C. Esse procedimento foi adotado a fim de retirar a fração instantaneamente solúvel do N das amostras, pois a mesma poderia estar interferindo no perfil de degradação da fração potencialmente degradável. Foram utilizados somente três níveis de inclusão de amido (100, 200 e 300 mg) e a solução tampão foi modificada de modo a ter uma concentração de N de 8 mg/dl (ANEXO C). Em ensaio prévio, foi observado que a amostragem ao longo do tempo causa a diminuição gradual do volume no interior das garrafas, e conseqüente diminuição na produção de gases, então em cada coleta o volume equivalente ao retirado foi repostado com uma solução tampão de meio sem N.

Ensaio 5:

Uma quantidade de aproximadamente 50g de cada uma das amostras foi acondicionada em sacos de poliéster (com tamanho aproximado de 30 × 20 cm) e submetida ao tratamento com tampão borato-fosfato por 3 horas a 4°C. Posteriormente, foram lavadas com água corrente durante alguns minutos, secas em estufa de ar forçado por 72 horas a 55°C e moídas (peneira com porosidade de 1 mm), obtendo-se um resíduo livre de N solúvel. Foram então conduzidas duas corridas utilizando-se os mesmos procedimentos do Ensaio 4, exceto que em cada frasco foi incubado uma quantidade de resíduo de cada amostra equivalente a 30 mg de N.

4.3.2 Ensaio *in vitro* de curta duração

Foi conduzido um ensaio *in vitro* de curta duração (até 6 horas) para testar procedimentos que permitissem avaliar a taxa de degradação da fração solúvel do N, baseando-se no uso de antimicrobianos para obtenção dos produtos da degradação protéica, evitando sua utilização pelos microorganismos ruminais.

Foram pesadas, em triplicatas, amostras de azevém e farelo de soja em quantidades equivalentes a 30 mg de N e colocadas em frascos de 160 ml contendo fluido ruminal (inóculo) e diferentes proporções de solução tampão formulada conforme Theodorou et al. (1994). Também foi utilizado inibidores do crescimento bacteriano para estimativa da taxa de degradação. Como antimicrobiano, foi adicionado a cada frasco 1 mM de hidrazina, 3 g de cloranfenicol, 2 mM de mercaptoetanol e 330 mg de maltose (BRODERICK, 1987).

Foram testados os seguintes meios de incubação:

1. Com antimicrobiano e 20 % de inoculo
2. Com antimicrobiano e 50 % de inoculo
3. Com antimicrobiano e 100 % de inoculo
4. Sem antimicrobiano e 20% de inoculo
5. Sem antimicrobiano e 50% de inoculo
6. Sem antimicrobiano e 100% de inoculo

O líquido ruminal foi obtido de bovinos fistulados no rúmen, recebendo pastagem de azevém (*Lolium multiflorum*) à vontade. Após a coleta, o líquido foi filtrado através de duas camadas de gaze sob injeção contínua de CO₂ e mantido em banho-maria a 39° C. Os frascos foram vedados e incubados a 39°C em estufa de ar forçado. Foi medido o pH do meio de incubação em cada frasco antes e depois da incubação. Foram coletadas amostras (500ul) do conteúdo dos frascos após 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 360 minutos de incubação com uma seringa de 1mL com agulha. A amostra era imediatamente transferida para tubos eppendorf contendo 1,5 ml de ácido tricloroacético (TCA). Deste modo, a concentração final de TCA foi 5%. As amostras foram centrifugadas (3000 × g) e coletado o sobrenadante, o qual foi congelado para posterior análise de N-NH₃ e aminoácidos .

4.3.3 Ensaio de solubilização do nitrogênio

Foi conduzido um ensaio com o objetivo de estimar a taxa de solubilização da fração prontamente solúvel do N. Foram pesadas aproximadamente 300 mg de amostra em saquinhos de nylon as quais foram submetidas em triplicata a tratamento com solução tampão borato-fosfato, a 4°C, durante 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210 e 240 minutos. Após a retirada da solução foi determinado o teor de N no material residual.

4.3.4 Ensaio in situ

Paralelamente aos ensaios *in vitro*, foi conduzido um ensaio de degradação *in situ* utilizando-se três bovinos fistulados no rúmen, alimentados com uma dieta a base de azevém (*Lolium multiflorum*) e suplementados com farelo de glúten de milho (Refinazil).

As amostras experimentais foram secas em estufa (55° C) com ar forçado por 72 horas e moídas em moinho tipo Willey com peneira de porosidade 2 mm. Três gramas de cada amostra foram pesadas em sacos de poliéster (10 x 10 cm e porosidade de 50µm), proporcionando uma relação de 15 mg de amostra/cm² de superfície do saco, os quais foram selados e incubados no rúmen em duplicatas por horário.

As amostras foram incubadas seqüencialmente durante 3, 6, 9, 12, 24, 36, 72, 96 h, com retirada conjunta de todas as amostras ao final das 96 h de incubação. Deste modo, em cada animal foram incubados 60 saquinhos (3 alimentos × 9 tempos × 2 replicatas).

Para a incubação, os saquinhos foram colocados dentro de sacos maiores de tecido sintético com grande porosidade, sendo este preso a uma peça de metal, com a função de manter os sacos na parte ventral do rúmen, e fixado externamente com uma corda de náilon.

Após a retirada do rúmen os sacos foram lavados extensivamente com água corrente até esta fluir límpida. Adicionalmente, sacos não incubados também foram lavados, correspondendo ao tempo zero. Após a lavagem, todos os sacos foram mantidos submersos por 24 h em uma solução de dissociação de bactérias (WHITEHOUSE et al., 1994). Posteriormente, foram novamente lavados em água corrente, colocados em estufa com ar forçado à 55° C por 72 h, pesados e armazenados para posterior análise.

4.3.5 Avaliação do método *in vitro*

Os procedimentos descritos no ensaio 5 foram adicionalmente conduzidos com amostras de forrageiras utilizadas previamente em ensaios de digestibilidade *in vivo*, exceto que os tempos de coleta foram reduzidos (6, 12, 24, 36, 48 e 72 horas).

Os ensaios *in vivo* foram conduzidos com ovinos machos, fistulados no duodeno, mantidos em gaiolas de metabolismo e alimentados *ad libitum* com azevém (*Lolium multiflorum*) ou capim-paulista (*Cynodon dactylon* var. *dactylon*) cortados diariamente . Os experimentos eram constituídos de períodos experimentais com 15 dias cada, num delineamento experimental Quadrado Latino 4 x 4.

A síntese de proteína microbiana foi estimada com base no fluxo de purinas no duodeno.

A partir de uma composição de microorganismos isolados do rúmen, de 78,14% de MO, 9,51 % de N e 1,56% de purinas (expressos em % de MS), obteve-se uma relação de N

total:purinas de 6,1. Este valor foi então utilizado para o cálculo de nitrogênio microbiano, sendo que:

$$\mathbf{NM = Concentração\ purinas\ (mg/g\ de\ MS\ incubada) \times 6,1} \quad (8)$$

O fluxo de MO no duodeno foi calculado com base na excreção fecal e na concentração duodenal de FDN da seguinte forma:

$$\mathbf{MO\ duodenal\ (g/dia) = Excreção\ fecal\ (g/dia) \times FDN\ fecal\ (\%) / FDN\ duodenal\ (\%)} \quad (9)$$

O fluxo de N total foi calculado considerando o fluxo de MS duodenal e a porcentagem de N no conteúdo duodenal, da seguinte forma:

$$\mathbf{N\ duodenal\ (g/dia) = (N\ duodenal\ (\% \text{ da MS}) \times MS\ duodenal\ (g/dia)) / 100} \quad (10)$$

O fluxo de N amoniacal foi calculado de acordo com a relação entre o fluxo de N total, em g/dia, e a porcentagem de N amoniacal, em relação ao N total, respectivamente:

$$\mathbf{N\ amoniacal\ (g/dia) = (N\ duodenal\ (g/dia) \times N\ amoniacal\ (\% \text{ do N})) / 100} \quad (11)$$

O fluxo de nitrogênio microbiano foi estimado pelo produto entre a concentração de Nm (g/gMS) e o fluxo de MS duodenal (g/dia).

O fluxo N residual do alimento foi estimado como a diferença entre o fluxo de N total, N amoniacal e N microbiano:

$$\mathbf{N\ residual = Nt - NNH3 - Nm} \quad (12)$$

A degradabilidade da proteína foi estimada pela diferença entre o consumo total de N (CN) e o N residual:

$$\mathbf{PDR = CN - N\ residual} \quad (13)$$

Assume-se que o N endógeno está incluído no N residual do alimento.

4.4 Análises químicas

Foram determinados os teores de matéria seca (MS) por secagem em estufa a 105°C e cinzas por queima em mufla a 600°C durante 3 horas. O teor de N total foi determinado pelo método de Kjeldahl (método 984.13, AOAC, 1995), modificado por usar uma solução de ácido bórico 4% (p/v) como receptor da amônia livre durante a destilação, uma solução de 0,2% (p/v) de verde de bromocresol e 0,1% (p/v) de vermelho de metila como indicador, e uma solução padrão de ácido sulfúrico para titulação (Kozloski et al., 2003). A análise da concentração de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) foram realizadas em autoclave a 110°C, por 40 minutos, conforme Senger et. al. (2008). O N solúvel em tampão borato-fosfato e N insolúvel em detergente ácido (NIDA) foram analisados de acordo com Licitra et al. (1996).

A concentração de N-NH₃ no meio de incubação foi determinada colorimetricamente conforme Weatherburn (1967).

A concentração de aminoácidos foi determinada colorimetricamente utilizando um método adaptado de Palmer e Peters (1969) (ANEXO D).

Nas amostras de conteúdo duodenal foram determinados os teores de purinas (MAKKAR; BECKER, 1999), MS, MO e FDN. Na amostra do sobrenadante filtrado, foi analisado o teor de amônia (WEATHERBURN, 1967). O teor de N total, aminoácidos e peptídeos foram determinados numa amostra reconstituída onde a relação entre amostra sólida e líquido de sobrenadante era mensurada sempre obedecendo a proporção de matéria parcialmente seca da digesta duodenal.

4.5 Cálculos e estimativas

4.5.1 Correção da concentração de amônia no meio de incubação pela inclusão de amido

A concentração de N-NH₃ no meio de incubação foi estimada pelo método proposto por Raab et al. (1983), que tem como princípio corrigir a fração incorporada pelos

microorganismos através da correlação entre os resultados de produção de gás e de concentração de N-NH_3 das amostras incubadas com os diferentes níveis de amido (Figura 3).

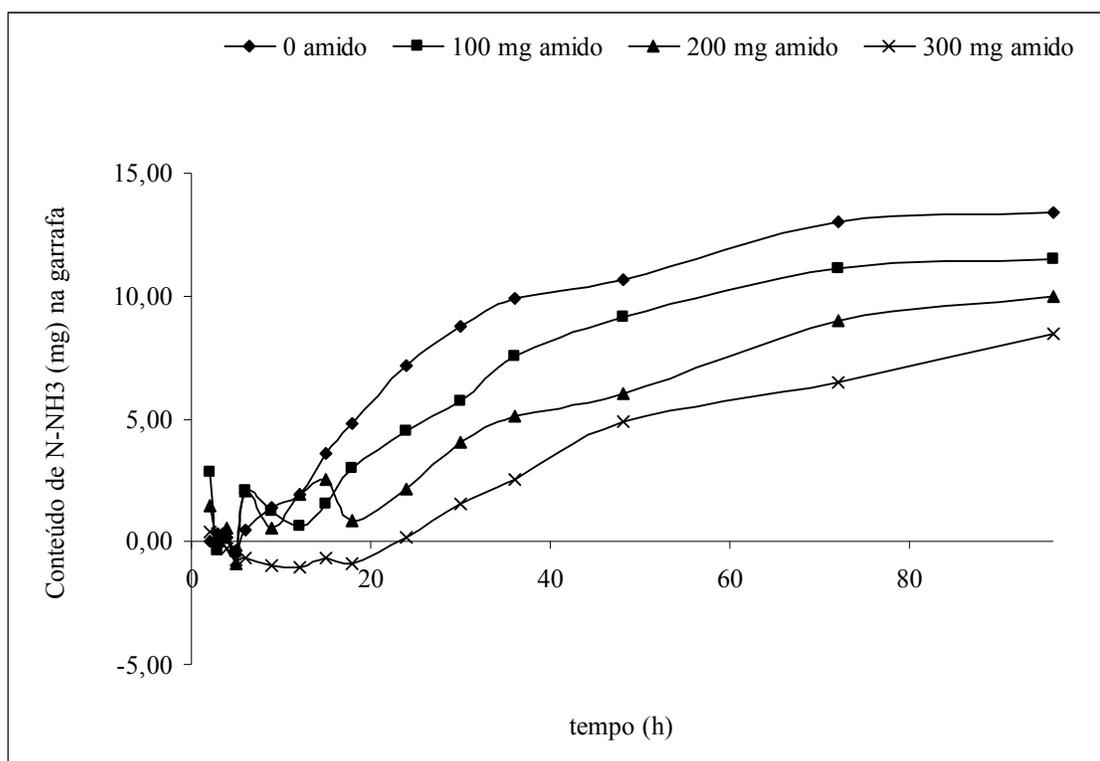


Figura 3 – Quantidade de N-NH_3 (mg) presente em cada garrafa, em cada tempo após incubação, da amostra de farelo de soja em um ensaio *in vitro* gás. As amostras foram incubadas sem amido ou com inclusão de 100, 200 e 300 mg de amido por garrafa.

Mediante a inclusão de amido, obtém-se uma relação inversamente proporcional de produção de N-NH_3 em relação a produção de gases. Com esses resultados, para cada tempo de leitura, foi gerada uma equação de regressão que resultou na concentração de N-NH_3 quando a produção de gás fosse igual a zero (Figura 4).

Portanto a liberação de N-NH_3 proveniente da degradação protéica no meio de incubação, em cada tempo de leitura, é estimada pela intercepta da regressão gerada com as concentrações de N-NH_3 de cada uma das amostras com suas respectivas inclusões de amido.

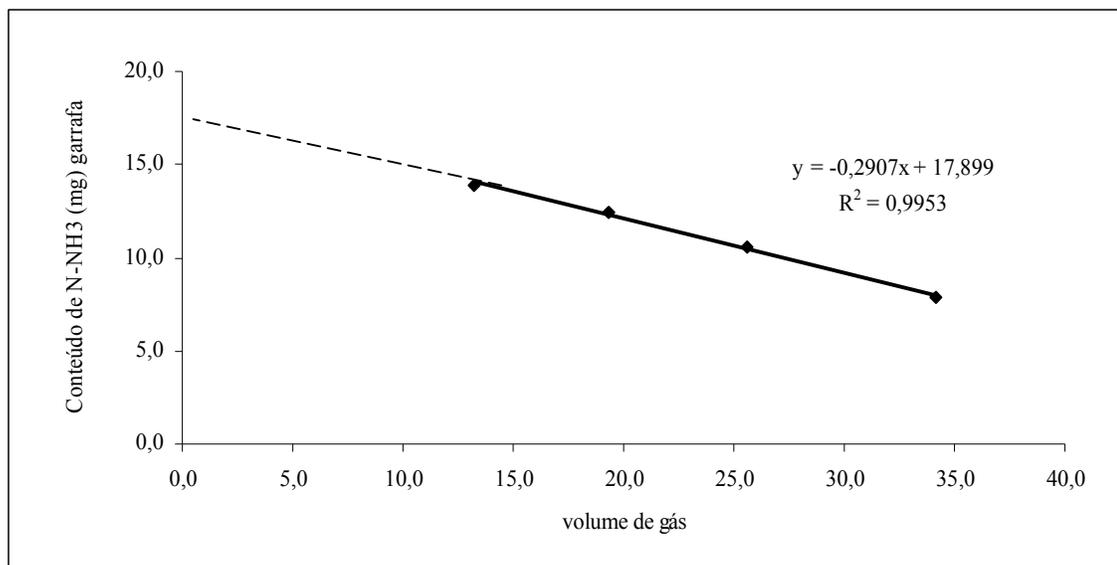


Figura 4 – Exemplo da reta de regressão gerada a partir das concentrações de N-NH₃ de uma amostra, em relação aos respectivos volumes de gás (com amido = 0, 100, 200 e 300 mg). A intercepta da regressão é de 17,89, o que corresponde a concentração de N-NH₃ quando a produção de gás for igual a zero.

4.5.2 Cálculo da degradabilidade *in vitro* da proteína bruta

A degradabilidade dos compostos nitrogenados em cada tempo de incubação foi calculada multiplicando-se a concentração de N-NH₃ (descontado o valor encontrado nos brancos) pelo volume do meio de incubação, dividido pela quantidade de nitrogênio incubado.

$$\text{DNIV} = (([\text{N-NH}_3] - [\text{N-NH}_3 \text{ Br}]) \times \text{volume}) / \text{NI} \quad (14)$$

Onde:

DNIV = degradabilidade do nitrogênio *in vitro*;

[N-NH₃] = concentração de amônia medida ou estimada pela inclusão de amido;

[N-NH₃ Br] = concentração de N-NH₃ na amostra coletada dos brancos;

NI = N incubado.

A degradabilidade também foi calculada no ensaio *in vitro* com uso inibidores do crescimento bacteriano em cada horário de coleta, da seguinte forma:

$$\text{DNIV} = ([\text{N-NH}_3 + \text{N-amino}] - [\text{N-NH}_3 + \text{N-amino Br}]) / \text{NI} \quad (15)$$

Onde:

DNIV = degradabilidade do nitrogênio *in vitro*;

[N-NH₃+N-amino] = concentração de N amoniacal e de aminoácidos;

[N-NH₃+N-amino Br] = concentração de N amoniacal e de aminoácidos do branco;

NI = N incubado.

4.5.3 Cálculo da taxa de degradação *in vitro* da proteína bruta

A taxa fracional de degradação protéica foi estimada como o coeficiente de regressão entre o logaritmo natural da proporção indegradável ($\ln(1 - \text{DNIV})$) e o tempo de incubação (horas) (BRODERICK, 1987). Um exemplo é apresentado na Figura 5.

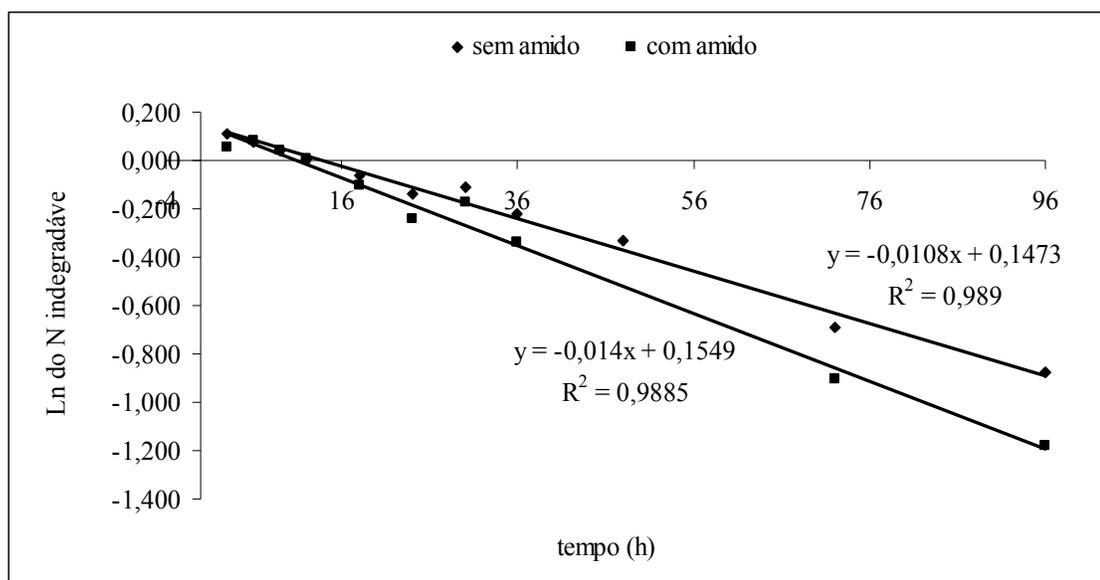


Figura 5 – Logaritmo natural da fração indegradável do nitrogênio de amostras incubadas com e sem amido, ao longo de 96 horas de incubação.

4.5.4 Cálculo da taxa de degradação *in situ*

Os valores do desaparecimento de N das amostras, ao longo do tempo de incubação, foram ajustados ao modelo de Ørskov e McDonald (1979) para cálculo das taxas de degradação, conforme equação a seguir:

$$P = a + b \times (1 - \exp^{-c \cdot t}) \quad (16)$$

Onde:

P = degradabilidade potencial do alimento;

t = tempo de incubação

a = representa o substrato solúvel e rapidamente degradável;

b = representa o substrato insolúvel, mas potencialmente degradável;

c = taxa constante da função b.

Os resultados de taxa de degradação foram obtidos com auxílio do programa Ficurve, conforme programa criado pela International Feed Resources Unit (2004).

4.5.5 Cálculo da taxa de solubilização do N

A solubilidade do N foi calculada como a proporção que desapareceu da amostra a vários tempos de tratamento com solução tampão (Figura 6):

$$NS = (N_{inc} - N_{res}) / N_{sol \text{ total}} \quad (17)$$

Onde:

NS = nitrogênio solúvel (proporção do N solúvel total);

N_{inc} = teor de nitrogênio da amostra (inicial);

N_{res} = teor de nitrogênio no material residual;

N_{sol total} = nitrogênio solúvel total após 4 horas em solução tampão.

A taxa fracional de desaparecimento do N solúvel foi estimada pelo coeficiente de regressão do logaritmo natural da proporção da fração solúvel não solubilizada ($\ln(1 - NS)$) em 3 horas de incubação no tampão borato-fosfato.

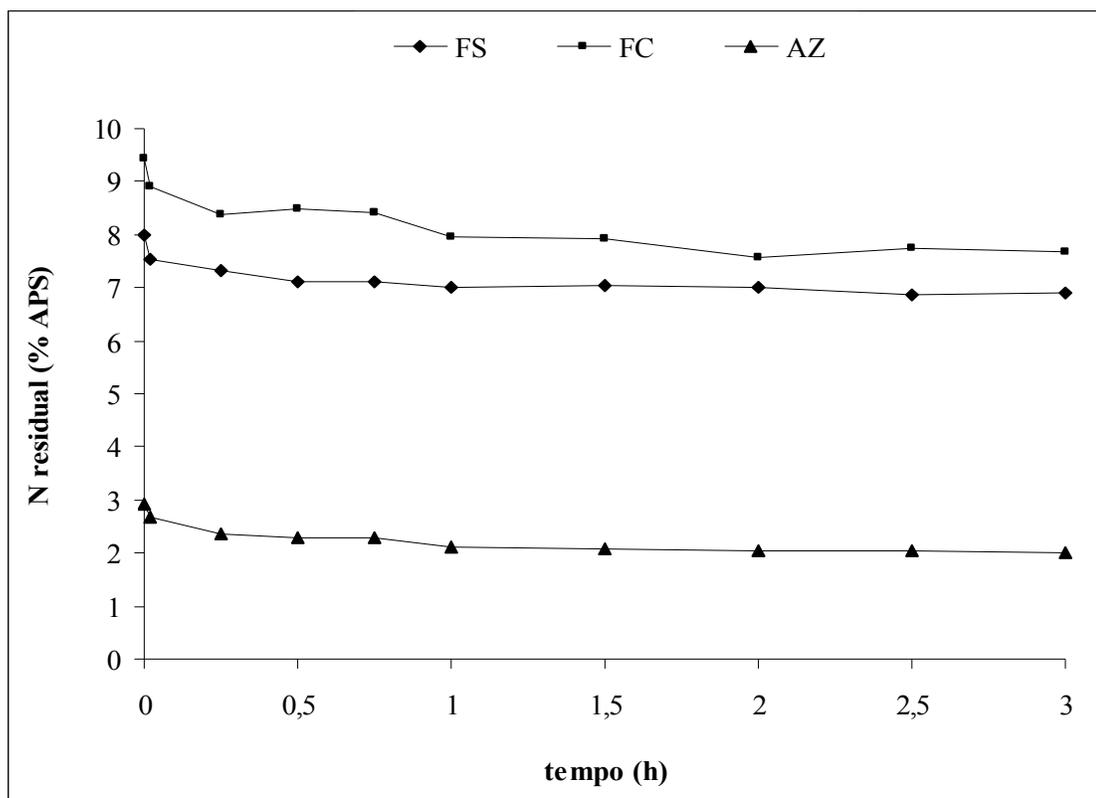


Figura 6 – Teores de nitrogênio residual das amostras de farelo de soja (FS), farinha de carne e ossos (FC) e Azevém (AZ), após solubilização em tampão, ao longo do tempo.

4.5.6 Estimativa da degradabilidade efetiva *in vitro* e *in situ*

Foi calculada a degradabilidade efetiva (DE) dos alimentos com os resultados obtidos *in vitro*, com e sem amido, e *in situ*, através da seguinte equação (ØRSKOV; MCDONALD, 1979):

$$\text{Degradabilidade efetiva} = A + ((B \times c) / (c + k)) \quad (18)$$

Onde:

- a = representa a fração solúvel e rapidamente degradável;
- b = representa a fração insolúvel, mas potencialmente degradável;
- c = taxa de degradação da fração b;
- k = taxa de passagem das partículas no rúmen (5 %/h)

Nas amostras incubadas *in vitro*, os valores da fração “a” foram determinados após a solubilização em tampão borato-fosfato por 3 horas a 4°C, enquanto que no método *in situ* esta fração correspondeu ao N que desapareceu das amostras no tempo zero. Os valores de degradabilidade efetiva do ensaio *in situ* foram obtidos com auxílio do programa Fitcurve, enquanto que do *in vitro* foi calculado manualmente pela equação acima.

Para comparar com o método *in vivo*, no cálculo da degradabilidade efetiva das amostras de azevém e cynodon incubadas *in vitro*, utilizou-se a taxa de passagem para forragens encontrada pela equação (Fox et al., 2004):

$$Kpf=(0,38+(0,022*CMS*1000/PV^{0,75})+2*1/100) \quad (19)$$

Onde:

Kpf = taxa de passagem da forragem expressa em %/ hora;

CMS = consumo de matéria seca (kg / dia);

PV^{0,75} = peso metabólico (kg);

4.6 Análises estatísticas

Os resultados de degradabilidade, taxa de degradação e seus coeficientes de determinação foram submetidos à análise de variância considerando o seguinte modelo matemático:

$$Y_{ij}(k) = \mu + \beta_i + \gamma_j + (\beta \times \gamma)_{ij} + \varepsilon_{ij}$$

Onde:

Y_i = variável dependente

μ = media das observações

β_i = efeito do tratamento (i.e. tamanho da amostra; composição do meio de incubação; tratamento prévio da amostra ou correção pelo amido)

γ_j = efeito dado tipo de amostra

β×γ = efeito da interação tratamento vs tipo de amostra

ε_i = erro experimental

O ensaios foram comparados pelo teste “F”, onde foi avaliado o efeito da quantidade de amostra incubada (ensaio 1 vs ensaio 2), a presença ou ausência de uma fonte de N (bicarbonato de amônio) no meio de incubação (ensaio 2 vs ensaio 3) e o tratamento prévio da amostra antes da incubação (ensaio 4 vs ensaio 5).

Os resultados de degradabilidade e das taxas de degradação da proteína obtidas com e sem correção pelo uso de amido para cada amostra e em cada ensaio foram comparadas pelo teste “t” para dados pareados.

Os resultados de degradabilidade *in vitro* e *in situ* foram comparados pelo teste de Tukey, a nível de 5 % de probabilidade.

Os resultados de degradabilidade *in vitro* foram comparados com os obtidos *in vivo* pelo teste “t” para dados pareados e, adicionalmente, relacionados por regressão linear simples.

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa estatístico SAS (2001).

5 RESULTADOS

O efeito da quantidade de amostra utilizada no meio de incubação foi avaliado comparando-se os resultados de degradabilidade (Figura 7), taxa de degradação (Figura 8) e r^2 da taxa de degradação (Figura 9) entre os ensaios 1 e 2. Com exceção da degradabilidade à 24 horas de incubação, a qual foi mais alta ($P<0,05$) no ensaio 2, todas as demais variáveis analisadas foram similares nos dois ensaios.

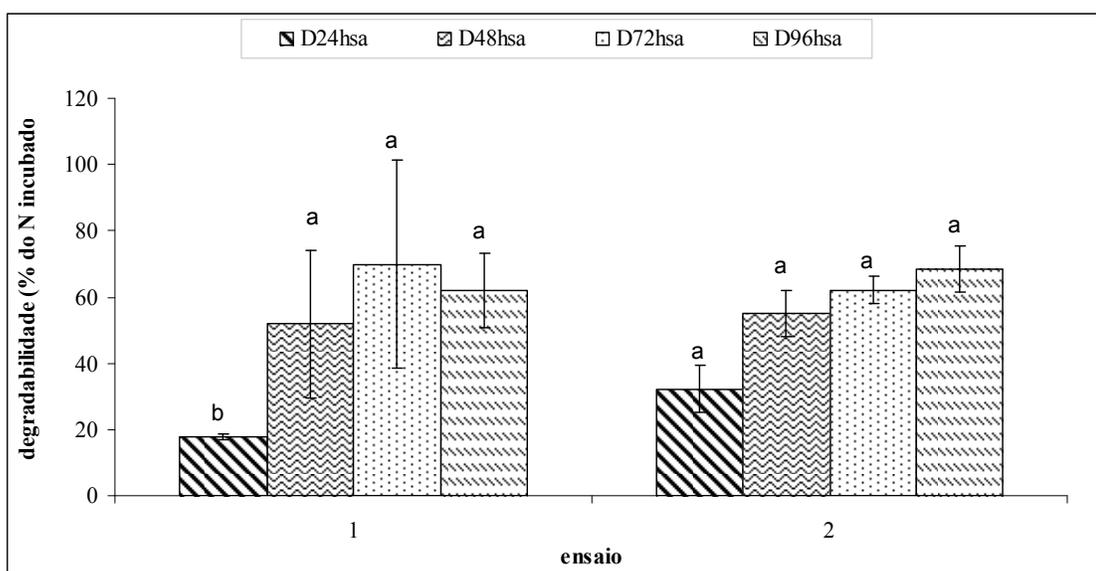


Figura 7 – Degradabilidade média de amostras de farelo de soja e farinha de carne à 24, 48, 72 e 96 horas de incubação *in vitro* (sem correção do nitrogênio pelo uso de amido) obtida nos ensaios 1 e 2. As barras sobre as colunas representam o respectivo desvio padrão. Letras diferentes sobre as colunas indicam que as médias dos dois ensaios são diferentes pelo teste F a 5% de probabilidade do erro Tipo I.

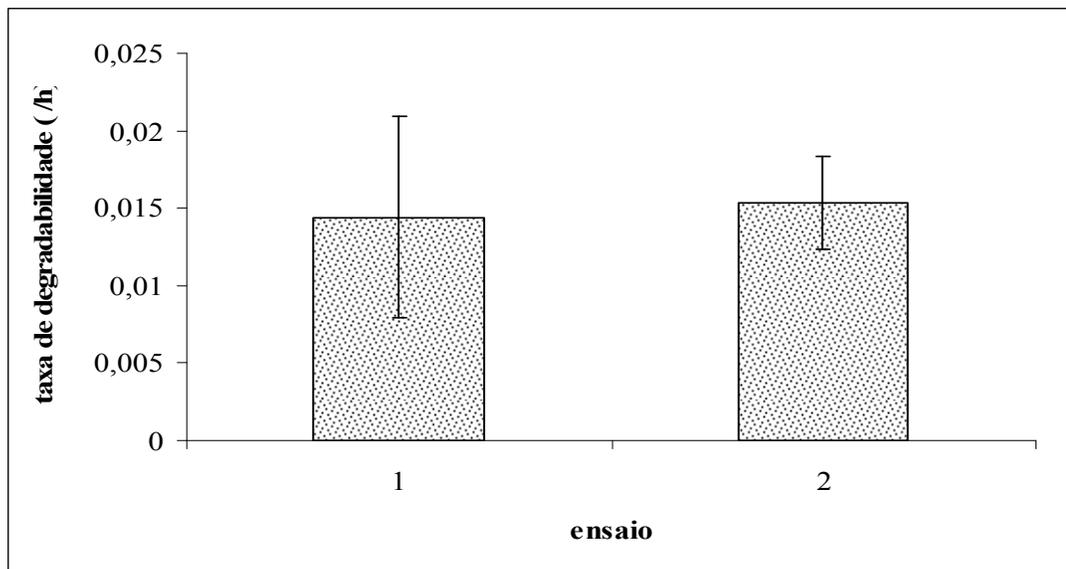


Figura 8 – Valores médios de taxa de degradabilidade (/h) nos ensaios 1 e 2. As barras sobre as colunas representam o respectivo desvio padrão.

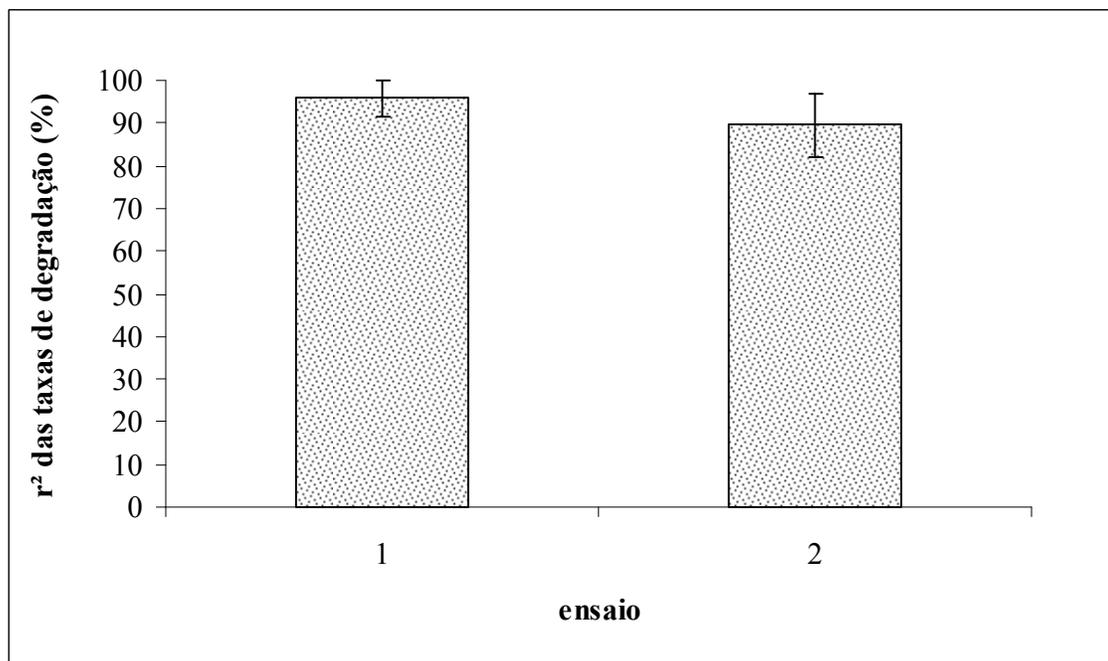


Figura 9 – Valores médios de r^2 das taxas de degradação nos ensaios 1 e 2. As barras sobre as colunas representam o respectivo desvio padrão.

Na tabela 3 encontram-se os resultados de degradabilidade em diferentes tempos, taxa de degradação e seus coeficientes de determinação (r^2), dos ensaios 2 e 3. Todos os resultados, com exceção da degradabilidade as 24 horas e o r^2 corrigidas pela utilização do amido, não sofreram efeito de ensaio, entretanto na maioria, houve efeito da interação entre ensaio e amostra ($P<0,01$).

A degradabilidade protéica do azevém, nas 24, 48, 72 e 96 horas, calculadas com e sem correção pelo uso do amido e a taxa de degradação sem uso de amido foram superiores no ensaio 2 ($P<0,01$). Entretanto os valores de r^2 com correção pelo amido foram melhores no azevém no ensaio 3. Já os valores de degradabilidade da farinha de carne e ossos foram superiores às 24, 48 e 96 horas com uso amido, bem como em 72 e 96 horas e taxa de degradação sem amido. Da mesma forma os valores de degradabilidade do farelo de soja foram maiores nas 72 horas.

Os resultados obtidos com o tratamento prévio de retirada da fração solúvel do nitrogênio da amostra estão na tabela 4. Com exceção da degradabilidade às 48 horas e valores de r^2 , corrigidos pela inclusão de amido, para todos os demais resultados houve interação entre ensaio e amostra ($P<0,01$). Nas amostras de farelo de soja, as degradabilidades as 24 e 48 horas, corrigidas ou não pelo amido, e a taxa de degradação sem amido foram maiores no ensaio 4 ($P<0,01$). Da mesma forma, para o azevém, as degradabilidades, às 24, 48, 72 e 96 horas sem amido, às 24 e 72 horas com amido e ambas as taxas de degradação foram superiores no ensaio 4 ($P<0,01$). No entanto os resultados obtidos com a incubação de farinha de carne não foram diferentes entre os ensaios.

Tabela 3 – Médias de degradabilidade, taxas de degradação, e r^2 ao longo do tempo do farelo de soja (FS), farinha de carne (FC), e azevém (AZ) (*Lolium multiflorum*), nos ensaios 2 e 3¹.

Variável ²	Ensaio 2			Dp ³	Ensaio 3			DP		P ⁴	
	FS	FCO	AZ		FS	FCO	AZ	E	E*A		
D24hsa	34,1	30,3	46,4 ^a	9,1	38,6	36,2	25,2 ^b	11,0	ns	ns	**
D24hca	35,9	49,7 ^a	75,0 ^a	20,4	40,5	33,4 ^b	35,2 ^b	9,3	**	**	**
D48hsa	60,7	49,1	76,4 ^a	12,5	66,1	63,3	47,3 ^b	16,0	ns	ns	**
D48hca	57,5	44,5 ^b	109,4 ^a	30,0	67,0	62,8 ^a	67,0 ^b	10,8	ns	ns	**
D72hsa	63,7 ^b	60,6 ^b	94,1 ^a	16,4	84,8 ^a	87,7 ^a	62,1 ^b	16,9	ns	ns	**
D72hca	53,5 ^b	62,0	130,3 ^a	37,9	82,6 ^a	73,8	79,6 ^b	18,0	ns	ns	**
D96hsa	72,6	64,3 ^b	106,9 ^a	20,3	93,4	102,2 ^a	73,5 ^b	19,6	ns	ns	**
D96hca	63,9	66,9 ^b	142,6 ^a	40,3	91,5	100,1 ^a	83,1 ^b	17,0	ns	ns	**
TxDsa	0,017	0,013 ^b	0,034 ^a	0,009	0,032	0,033 ^a	0,016 ^b	0,015	ns	ns	**
TxDca	0,016	0,014	0,031	0,012	0,03	0,03	0,023	0,013	ns	ns	ns
R ² sa	88,7	90,3	94,4	6,6	93,0	88,9	96,4	6,3	ns	ns	ns
R ² ca	84,0	90,0	84,1 ^b	8,8	93,2	91,3	95,0 ^a	5,5	**	**	ns

a,b = médias da mesma amostra na mesma linha seguidas de letras diferentes são diferentes pelo teste F a 5% de probabilidade do erro Tipo I.

¹Ensaio 2 = presença de bicarbonato de amônio (NH₄HCO₃) na solução tampão; Ensaio 3 = solução tampão do meio de incubação sem bicarbonato de amônio (NH₄HCO₃).

²D24hsa = Degradabilidade às 24 horas de incubação obtida sem amido; D24hca = Degradabilidade às 24 horas de incubação obtida com correção pelo uso de amido; D48hsa = Degradabilidade às 48 horas de incubação obtida sem amido; D48hca = Degradabilidade às 48 horas de incubação obtida com correção pelo uso de amido; D72hsa = Degradabilidade às 72 horas de incubação obtida sem amido; D72hca = Degradabilidade às 72 horas de incubação obtida com correção pelo uso de amido; D96hsa = Degradabilidade às 96 horas de incubação obtida sem amido; D96hca = Degradabilidade às 96 horas de incubação obtida com correção pelo uso de amido;

³ Desvio padrão das médias onde n= 3 por amostra no ensaio 2 e n=9 por amostra no ensaio 3.

⁴ Probabilidade do erro Tipo I, calculada pelo teste F: * = P < 0,05; ** = P < 0,01. E = efeito de ensaio e E*A = efeito da interação ensaio vs. amostra.

Tabela 4 – Médias de degradabilidade, taxas de degradação, e r^2 ao longo do tempo do farelo de soja (FS), farinha de carne (FC), e azevém (AZ) (*Lolium multiflorum*), nos ensaios 4 e 5¹.

Variável ²	Ensaio 4			DP ³	Ensaio 5			DP	P ⁴	
	FS	FCO	AZ		FS	FCO	AZ		E	E*A
D24hsa	55,5 ^a	20,7	25,7 ^a	17,7	27,7 ^b	12,4	1,54 ^b	13,0	**	**
D24hca	73,3 ^a	17,1	91,3 ^a	37,9	32,9 ^b	10,4	13,7 ^b	16,0	**	**
D48hsa	99,0 ^a	48,1	50,0 ^a	25,9	47,4 ^b	32,9	0 ^b	26,1	**	**
D48hca	125,7 ^a	43,2	79,0	51,5	52,4 ^b	36,7	56,0	27,7	**	Ns
D72hsa	102,3	66,2	82,5 ^a	16,7	65,8	44,5	3,6 ^b	36,4	**	**
D72hca	129,8	62,8	180,8 ^a	60,4	121,7	43,5	80,1 ^b	50,5	**	**
D96hsa	112,7	74,7	92,0 ^a	17,6	77,0	54,9	7,1 ^b	41,3	**	**
D96hca	135,9	72,3	160,1	40,0	110,5	60,5	101,1	51,3	ns	*
TxDsa	0,044 ^a	0,015	0,033 ^a	0,013	0,018 ^b	0,011	0,002 ^b	0,009	**	**
TxDca	0,043	0,014	0,048 ^a	0,024	0,023	0,012	0,015 ^b	0,008	**	**
R ² sa	94,6	96,0	92,1	4,7	85,2	95,8	46,5	33,7	ns	**
R ² ca	85,5	96,2	79,8	11,0	91,5	91,7	88,3	7,3	ns	Ns

a,b = médias da mesma amostra na mesma linha seguidas de letras diferentes são diferentes pelo teste F a 5% de probabilidade do erro Tipo I.

¹Ensaio 4 = Amostra submetida a solubilização por 3 horas e imediatamente incubada; Ensaio 5 = Amostra submetida a solubilização e secagem previamente a incubação.

²D24hsa = Degradabilidade às 24 horas de incubação obtida sem amido; D24hca = Degradabilidade às 24 horas de incubação obtida com correção pelo uso de amido; D48hsa = Degradabilidade às 48 horas de incubação obtida sem amido; D48hca = Degradabilidade às 48 horas de incubação obtida com correção pelo uso de amido; D72hsa = Degradabilidade às 72 horas de incubação obtida sem amido; D72hca = Degradabilidade às 72 horas de incubação obtida com correção pelo uso de amido; D96hsa = Degradabilidade às 96 horas de incubação obtida sem amido; D96hca = Degradabilidade às 96 horas de incubação obtida com correção pelo uso de amido;

³ Desvio padrão das médias onde n= 3 por amostra no ensaio 4 e n=6 por amostra no ensaio 5.

⁴ Probabilidade do erro Tipo I, calculada pelo teste F: * = P < 0,05; ** = P < 0,01. E = efeito de ensaio e E*A = efeito da interação ensaio vs. amostra.

As médias de degradabilidade nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas de incubação calculadas com e sem correção pelo uso de amido, das amostras de farelo de soja, farinha de carne e ossos, e azevém, dos ensaios 2, 3, 4 e 5 estão representados nas figuras 10, 11, 12 e 13, respectivamente.

No ensaio 2 todos os resultados de degradabilidade protéica do azevém, ao longo do tempo de incubação foram superiores quando calculadas mediante utilização do amido para correção da fração utilizada pelos microorganismos ($P < 0,05$). O mesmo foi observado no ensaio 3 ($P < 0,01$), mas também foi detectado uma maior degradabilidade na amostra de farinha de carne incubada sem amido as 72 horas ($P < 0,05$).

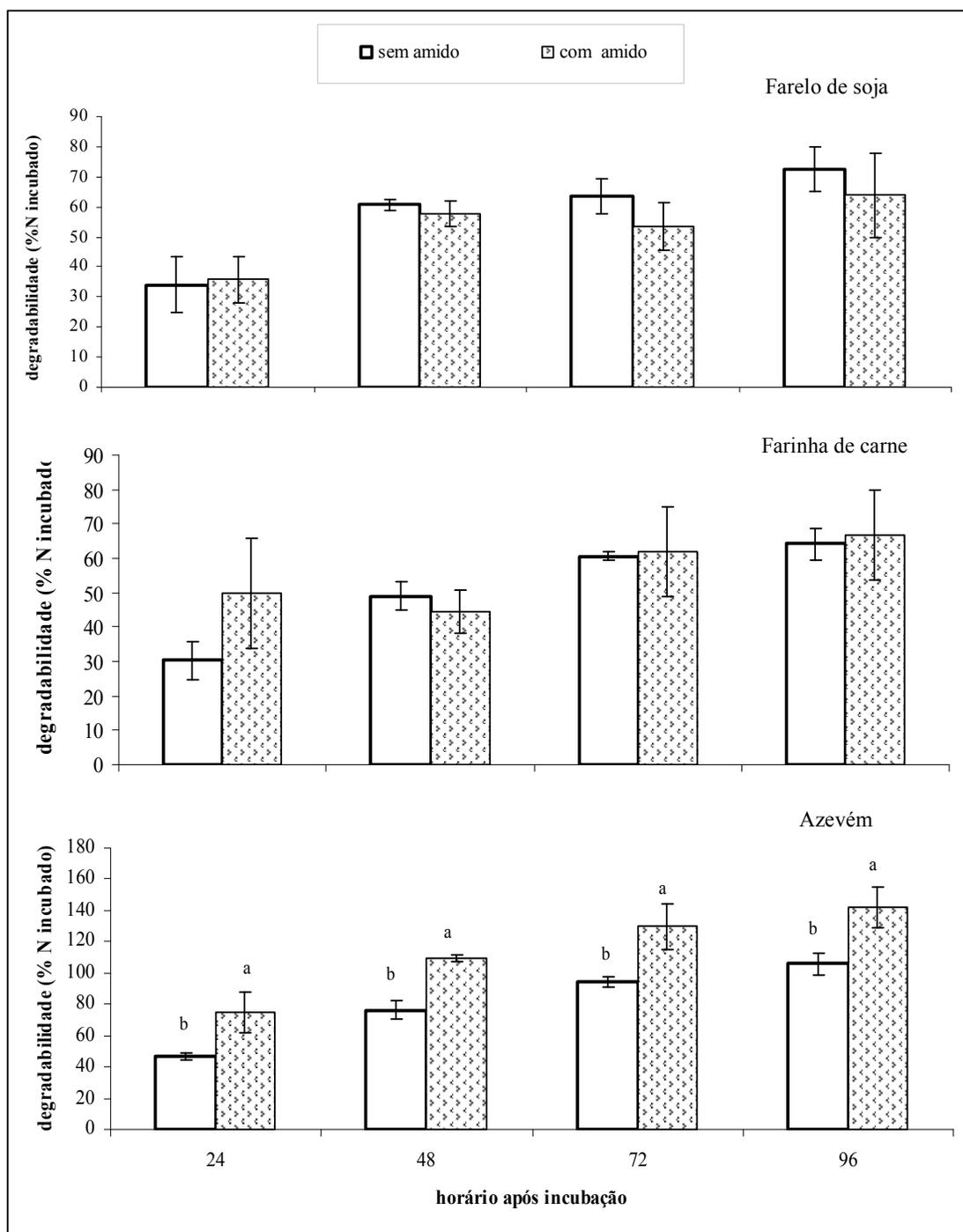


Figura 10 – Valores de degradabilidade (% do N incubado) do farelo de soja, farinha de carne e ossos e azevém (*Lolium multiflorum*), nas 24, 48, 72 e 96 horas após incubação do ensaio 2 (n=3). As barras sobre as colunas representam o respectivo desvio padrão. Letras diferentes sobre as colunas indicam que as médias dos dois ensaios são diferentes pelo teste F a 5% de probabilidade do erro Tipo I.

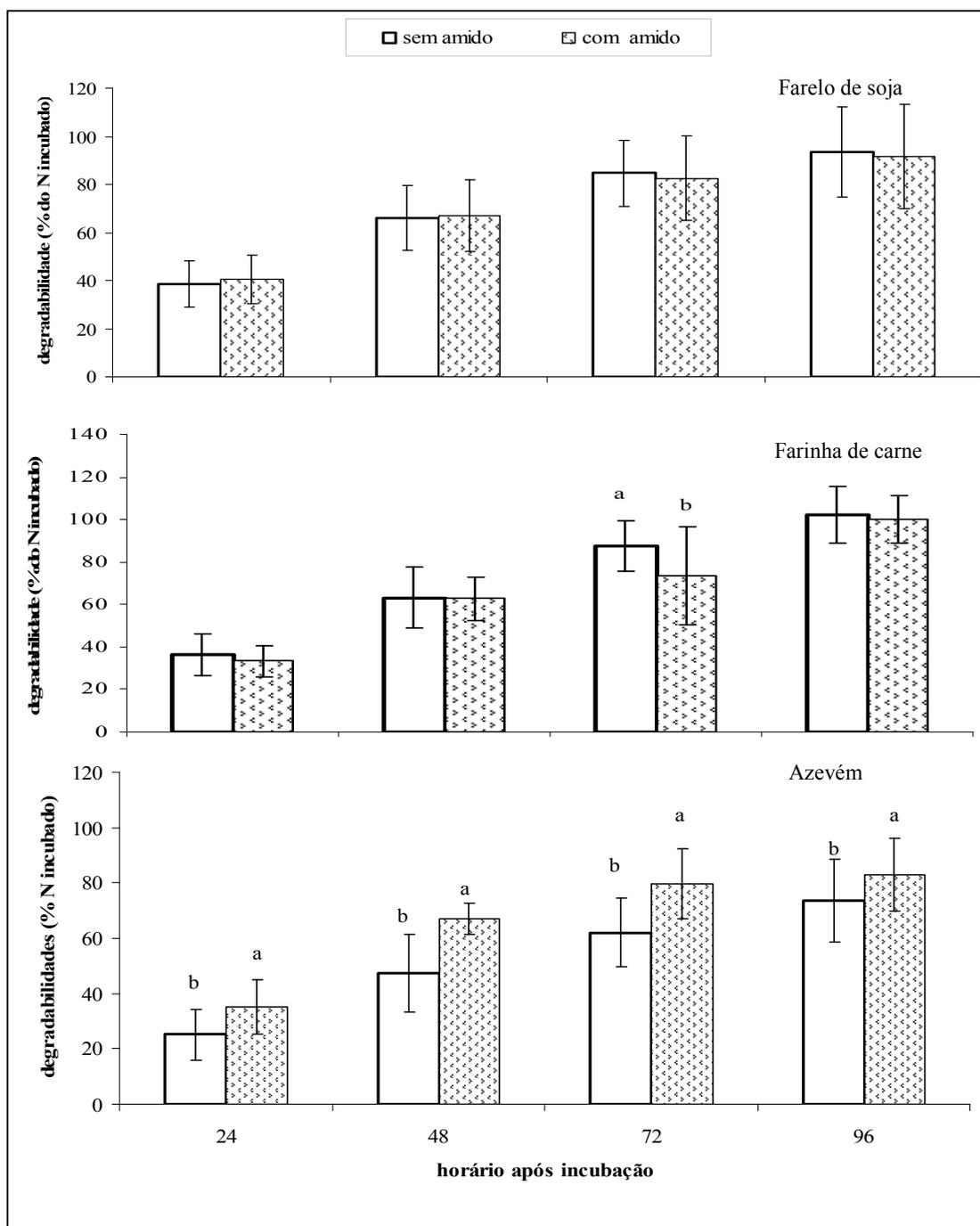


Figura 11 – Valores de degradabilidade (% do N incubado) do farelo de soja, farinha de carne e ossos e azevém (*Lolium multiflorum*), nas 24, 48, 72 e 96 horas após incubação do ensaio 3 (n=9). As barras sobre as colunas representam o respectivo desvio padrão. Letras diferentes sobre as colunas indicam que as médias dos dois ensaios são diferentes pelo teste F a 5% de probabilidade do erro Tipo I.

As degradabilidades do ensaio 4 em geral foram similares, com exceção das 24 e 96 horas de incubação do farelo de soja onde os resultados foram superiores quando calculados com base no uso do amido, da farinha de carne as 24 e 96 horas, que foram maiores quando obtidas sem amido e do azevém que foi superior somente nas 96 horas com uso do amido ($P<0,05$).

Quanto ao uso de amido para o cálculo de degradabilidade, os resultados do farelo de soja no ensaio 5, foram iguais ao ensaio anterior ($P<0,05$). Neste ensaio a degradabilidade da farinha de carne também foi superior quando calculada sem amido, mas somente no tempo de 24 horas ($P<0,05$). As observações obtidas com a incubação do azevém, em geral, resultaram em degradabilidades mais elevadas quando corrigidas pelo uso do amido ($P<0,05$).

Os valores de taxa de degradação das amostras, calculados com e sem correção pelo uso do amido, e seus r^2 estão representados nas figuras 14 e 15, respectivamente. A inclusão de amido, gerou resultados superiores de taxas de degradação ($P<0,01$) às amostras de azevém, nos ensaios 3 e 5, onde o N da amostra ou do meio de incubação era inferior. A forma de obtenção das taxas (com e sem amido) nas amostras de farelo de soja e farinha de carne e ossos, foi semelhante. A porcentagem da variação total (r^2) entre as formas de estimar a taxa de degradação da proteína nos diferentes ensaios foi estatisticamente similar.

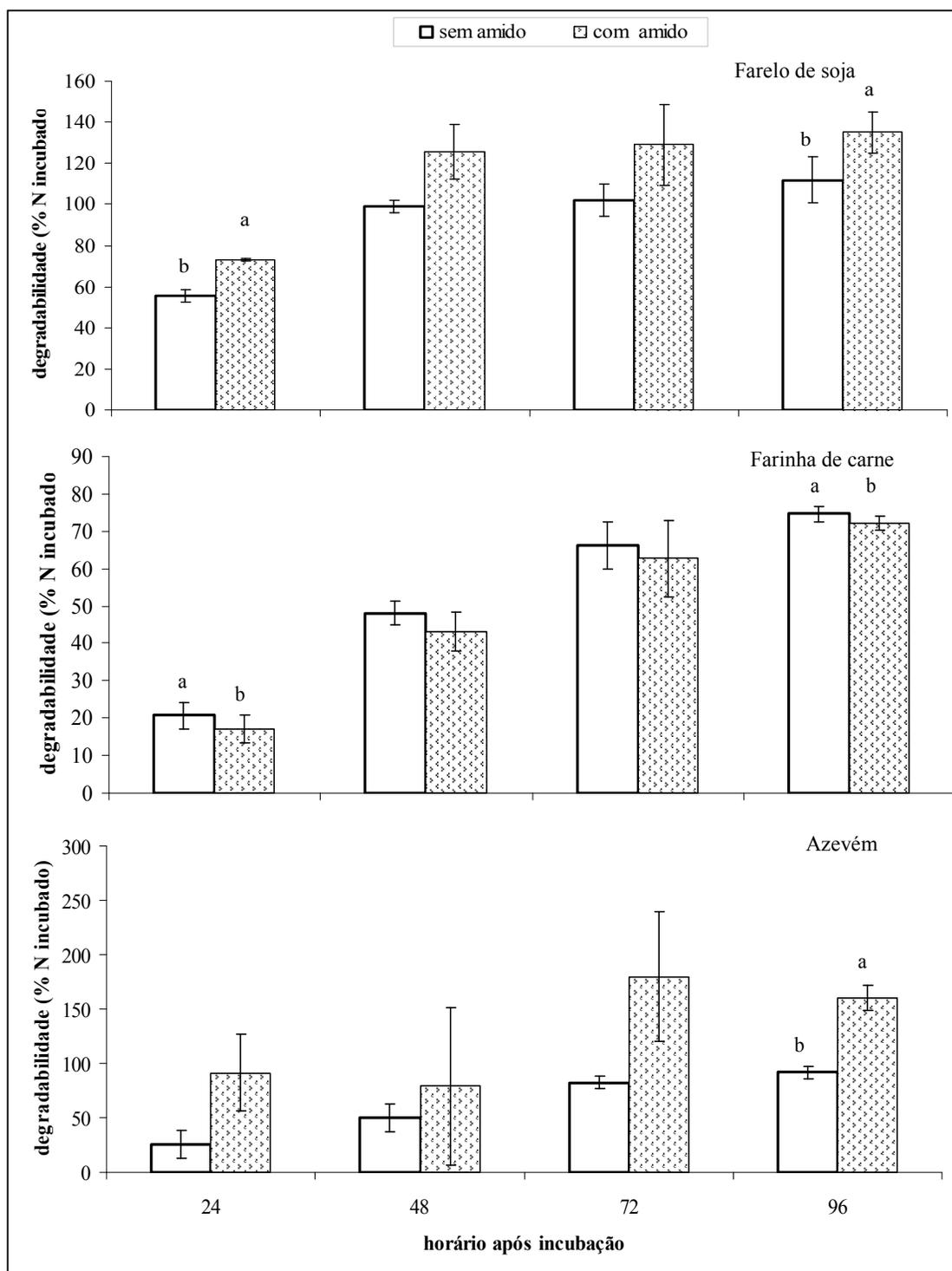


Figura 12 – Valores de degradabilidade (% do N incubado) do farelo de soja, farinha de carne e ossos e azevém (*Lolium multiflorum*), nas 24, 48, 72 e 96 horas após incubação do ensaio 4 (n=3). As barras sobre as colunas representam o respectivo desvio padrão. Letras diferentes sobre as colunas indicam que as médias dos dois ensaios são diferentes pelo teste F a 5% de probabilidade do erro Tipo I.

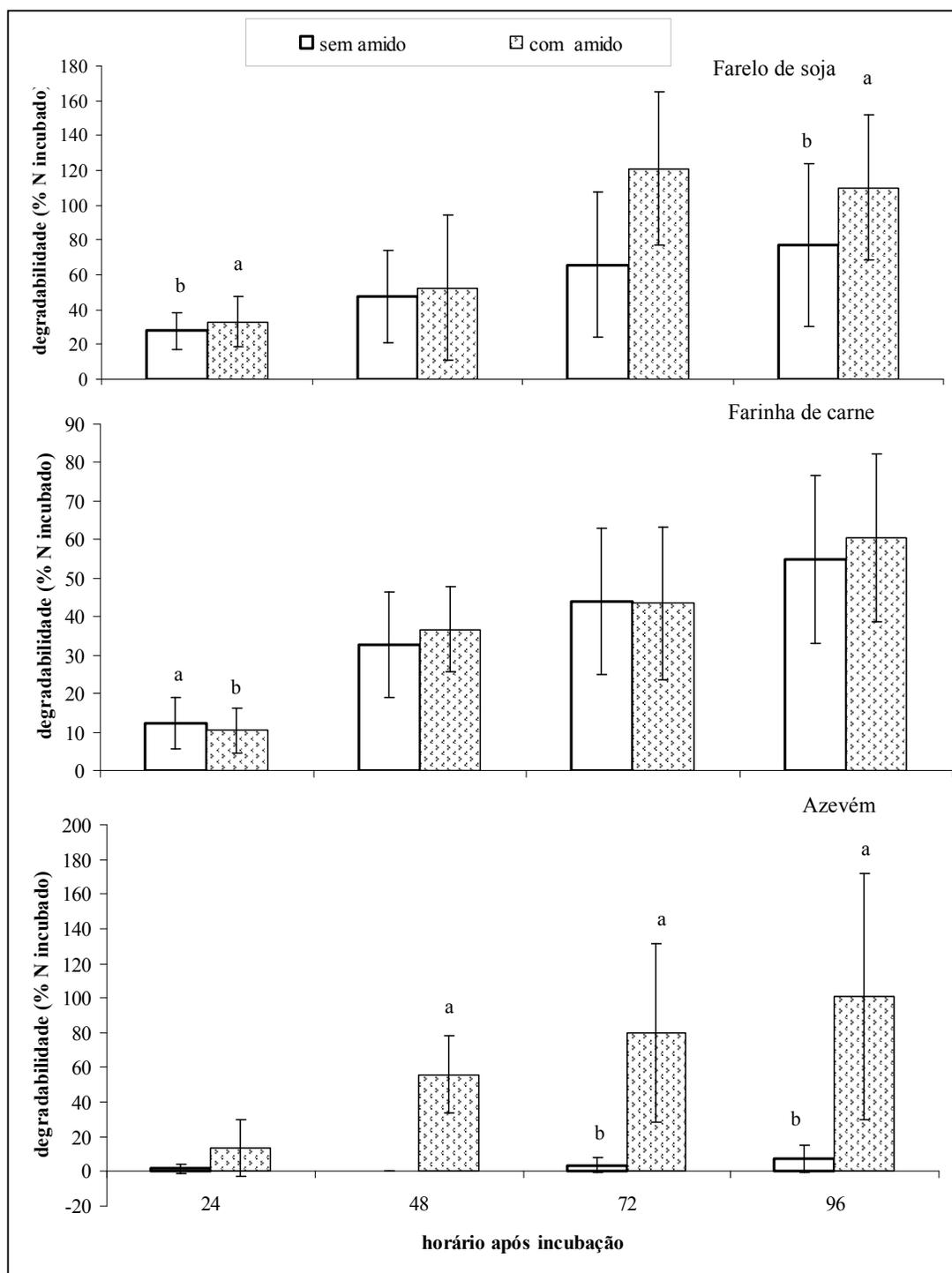


Figura 13 – Valores de degradabilidade (% do N incubado) do farelo de soja, farinha de carne e ossos e azevém (*Lolium multiflorum*), nas 24, 48, 72 e 96 horas após incubação do ensaio 5 (n=6). As barras sobre as colunas representam o respectivo desvio padrão. Letras diferentes sobre as colunas indicam que as médias dos dois ensaios são diferentes pelo teste F a 5% de probabilidade do erro Tipo I.

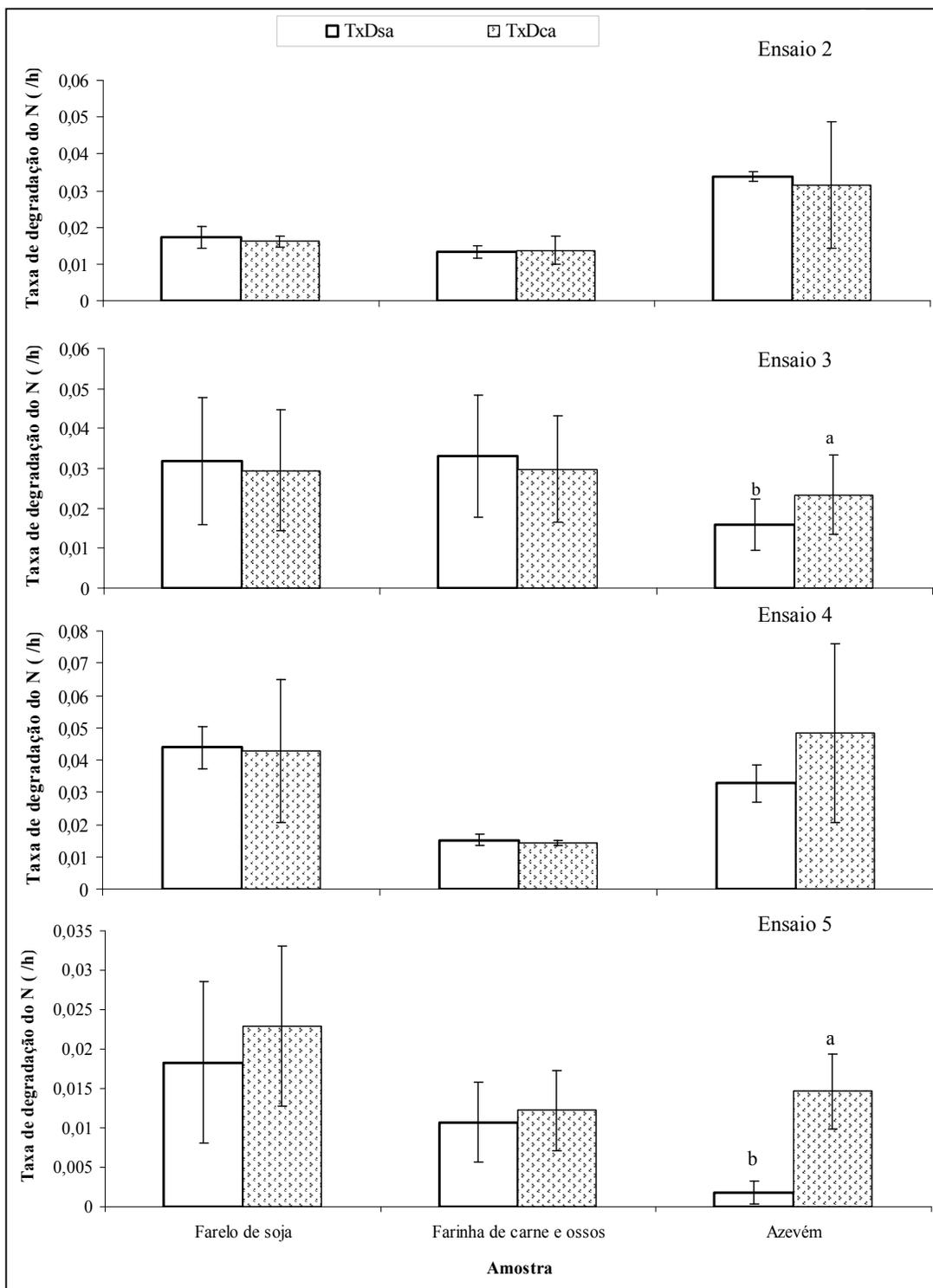


Figura 14 – Taxa de degradação do nitrogênio (/h) do farelo de soja, farinha de carne e ossos e azevém (*Lolium multiflorum*) dos ensaios 2, 3, 4 e 5. As barras sobre as colunas representam o respectivo desvio padrão. Letras diferentes sobre as colunas indicam que as médias dos dois ensaios são diferentes pelo teste F a 5% de probabilidade do erro Tipo I.

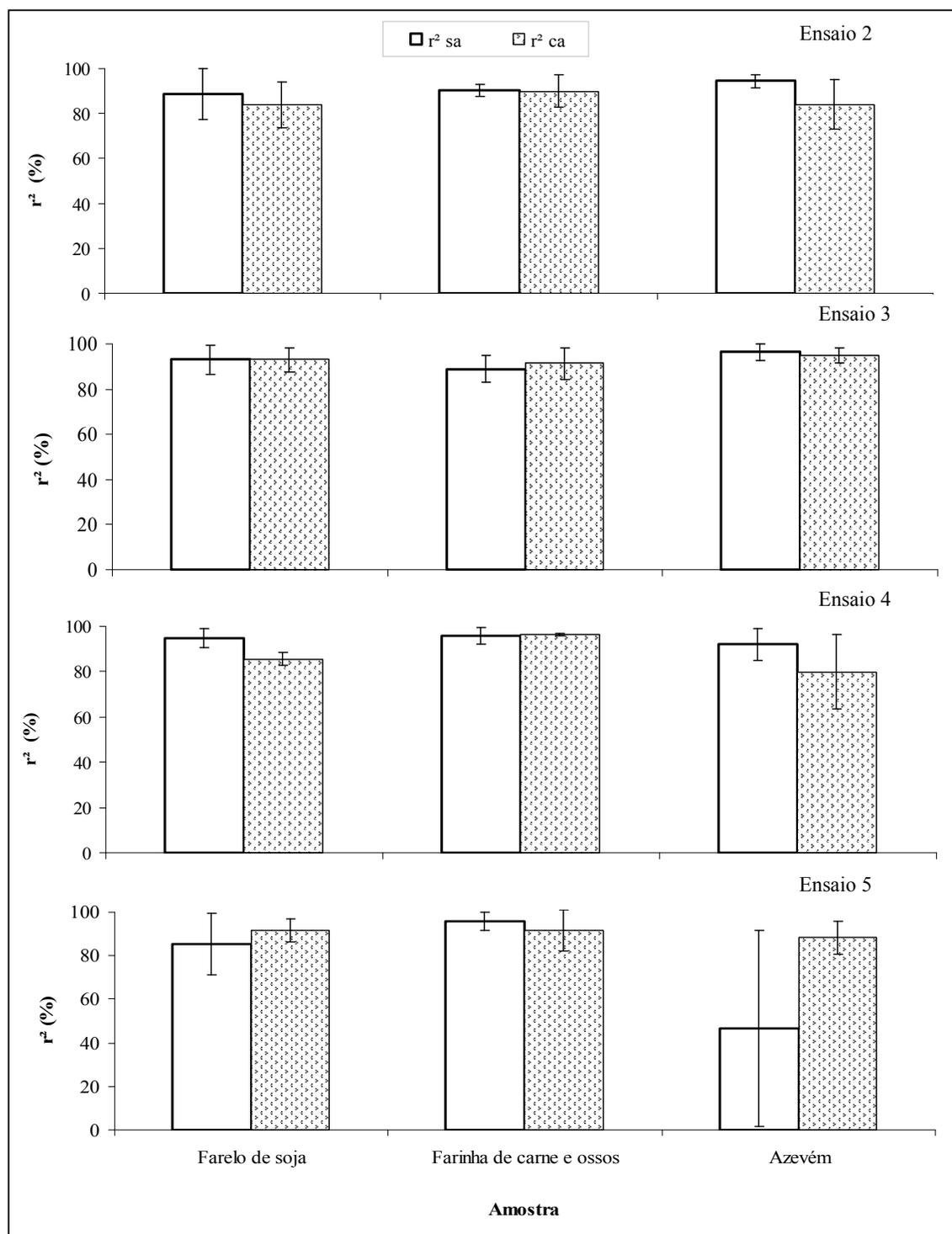


Figura 15 – Valores de r^2 (%) das taxas de degradação do nitrogênio do farelo de soja, farinha de carne e ossos e azevém (*Lolium multiflorum*) dos ensaios 2, 3, 4 e 5. As barras sobre as colunas representam o respectivo desvio padrão.

As degradabilidades obtidas com o uso de inibidores *in vitro* estão representadas na figura 16. Não foi possível chegar aos resultados de taxa de degradação com os resultados obtidos nesse ensaio. O método utilizado para quantificar os aminoácidos foi inadequado, pois os antimicrobianos reagiram com os reagentes utilizados na determinação colorimétrica dos aminoácidos, o que provavelmente subestimou sua concentração no meio de incubação. Somente nas amostras incubadas com 100% de líquido ruminal, é que foi possível detectar valores crescentes de degradabilidade ao longo do tempo, provavelmente devido a maior atividade microbiana nesse tratamento.

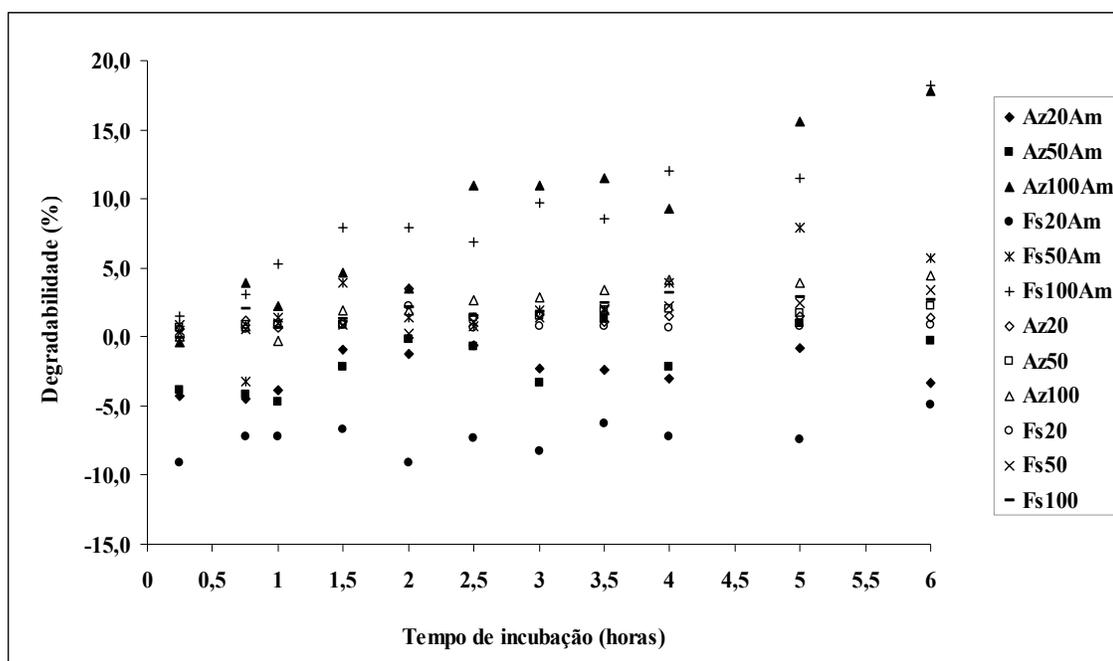


Figura 16 – Degradabilidades médias (% N incubado), das amostras incubadas com uso de inibidores *in vitro*. Amostras com antimicrobiano = Am; Az20 = azevém com 20% de inoculo; Az50 = azevém com 50% de inoculo; Az100 = azevém com 100% de inoculo; Fs20 = farelo de soja com 20% de inoculo; Fs50 = farelo de soja com 50% de inoculo; Fs100 = farelo de soja com 100% de inoculo;

A taxa de solubilização do N em tampão borato-fosfato encontrada no farelo de soja foi de 83,46%, 78,23% na farinha de carne e 147,84% no azevém, estando representadas nas, figuras 17, 18 e 19, respectivamente.

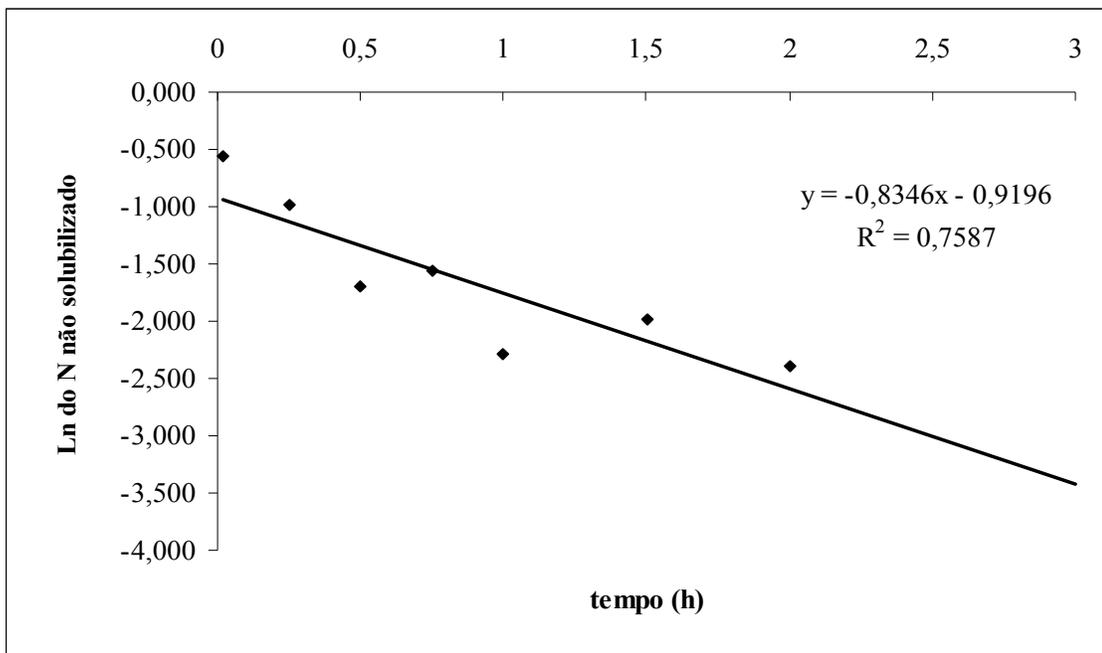


Figura 17 – Taxa de solubilização do N das amostras de farelo de soja durante 3 horas de incubação.

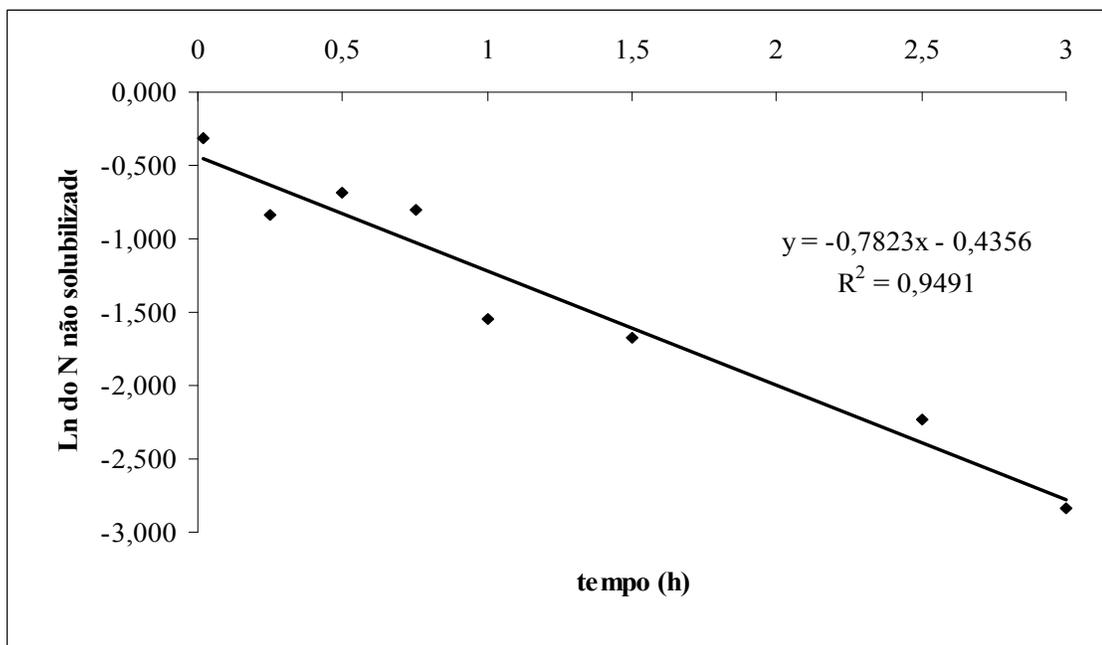


Figura 18 – Taxa de solubilização do N das amostras de farinha de carne e ossos durante 3 horas de incubação.

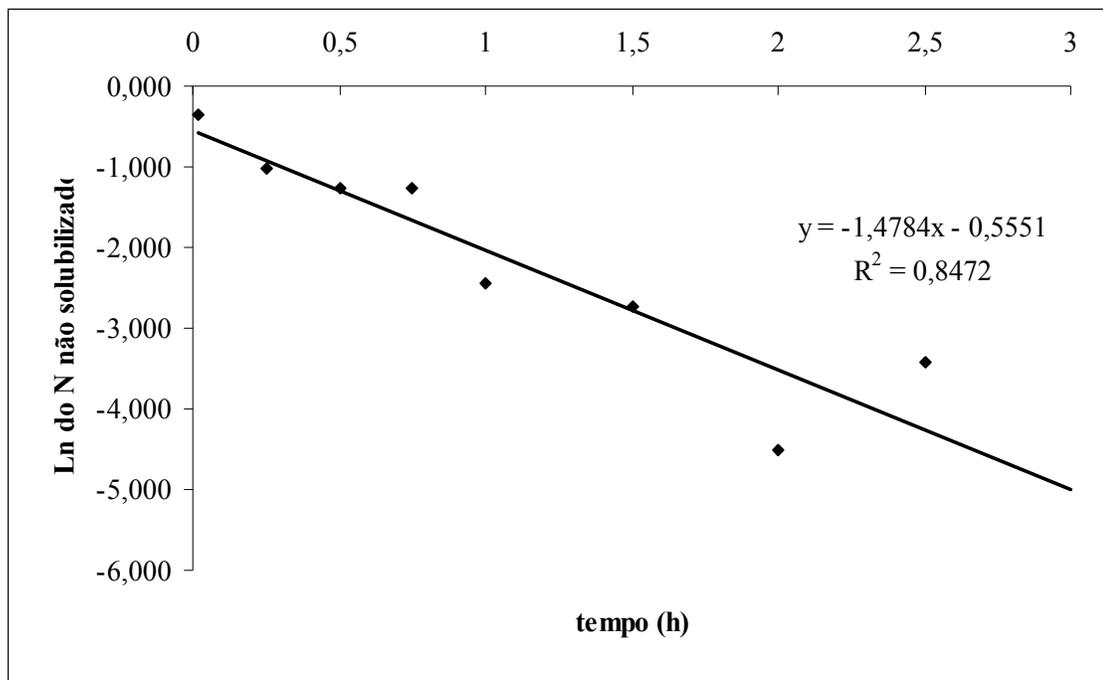


Figura 19 – Taxa de solubilização do N das amostras de azevém durante 3 horas de incubação.

A comparação dos resultados de taxa de degradação obtidos nos ensaio 3 e *in situ* dos três alimentos, está representada na figura 20. Com exceção da farinha de carne, as degradabilidades do farelo de soja e azevém encontradas pelo método *in situ* foram superiores ($P < 0,01$).

Os resultados de degradabilidade estimados pelo ensaio 5 e *in situ*, estão apresentados na figura 21. Todos os resultados obtidos pelo método *in vitro*, utilizando ou não o amido para cálculo, foram inferiores ao *in situ* ($P < 0,01$).

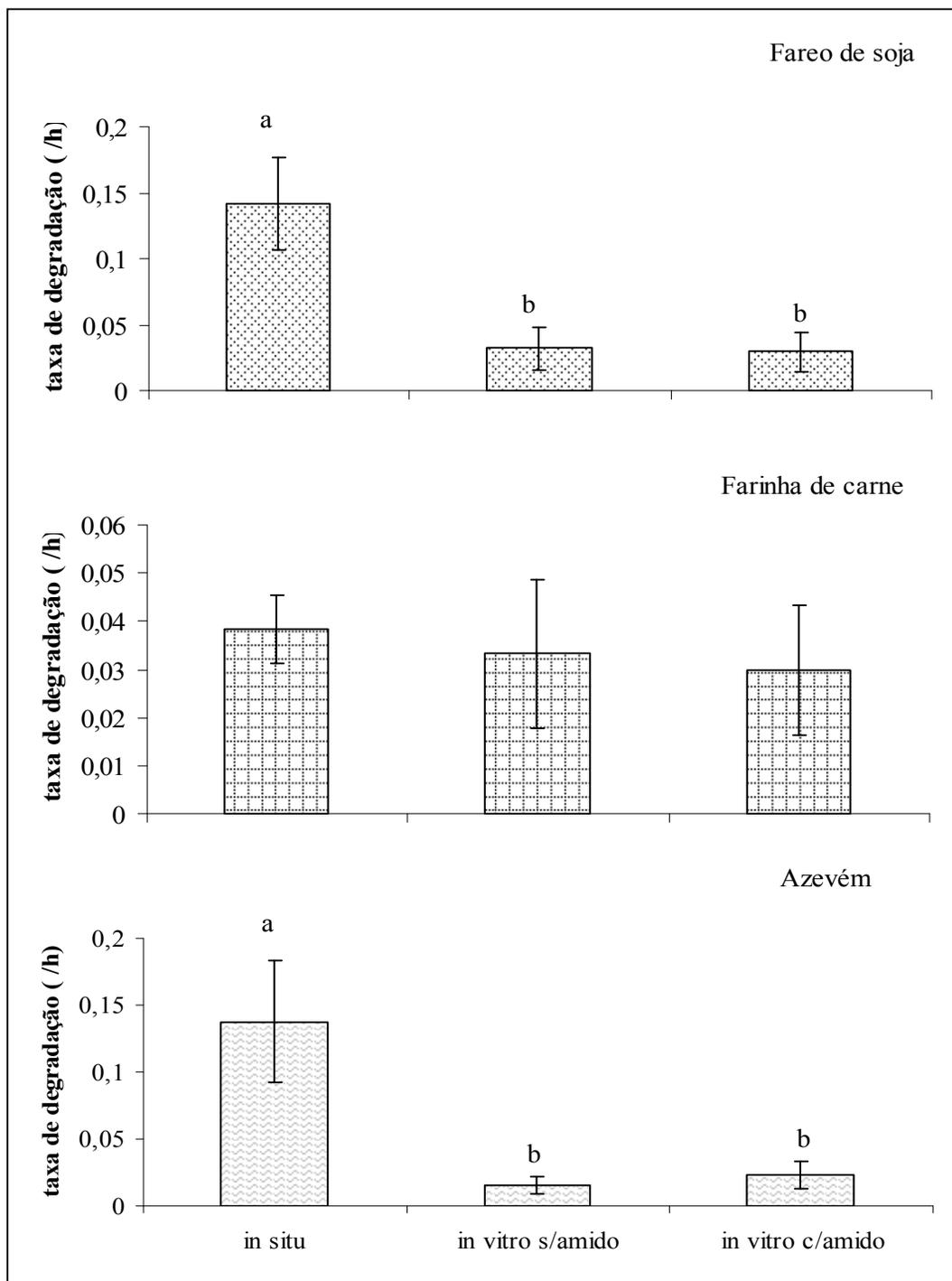


Figura 20 – Taxa de degradação do nitrogênio (/h) do farelo de soja, farinha de carne e ossos e azevém (*Lolium multiflorum*) dos ensaio 3 *in vitro*, calculado com e sem correção pelo uso de amido e *in situ*. As barras sobre as colunas representam o respectivo desvio padrão. Letras diferentes sobre as colunas indicam que as médias dos dois ensaios são diferentes pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

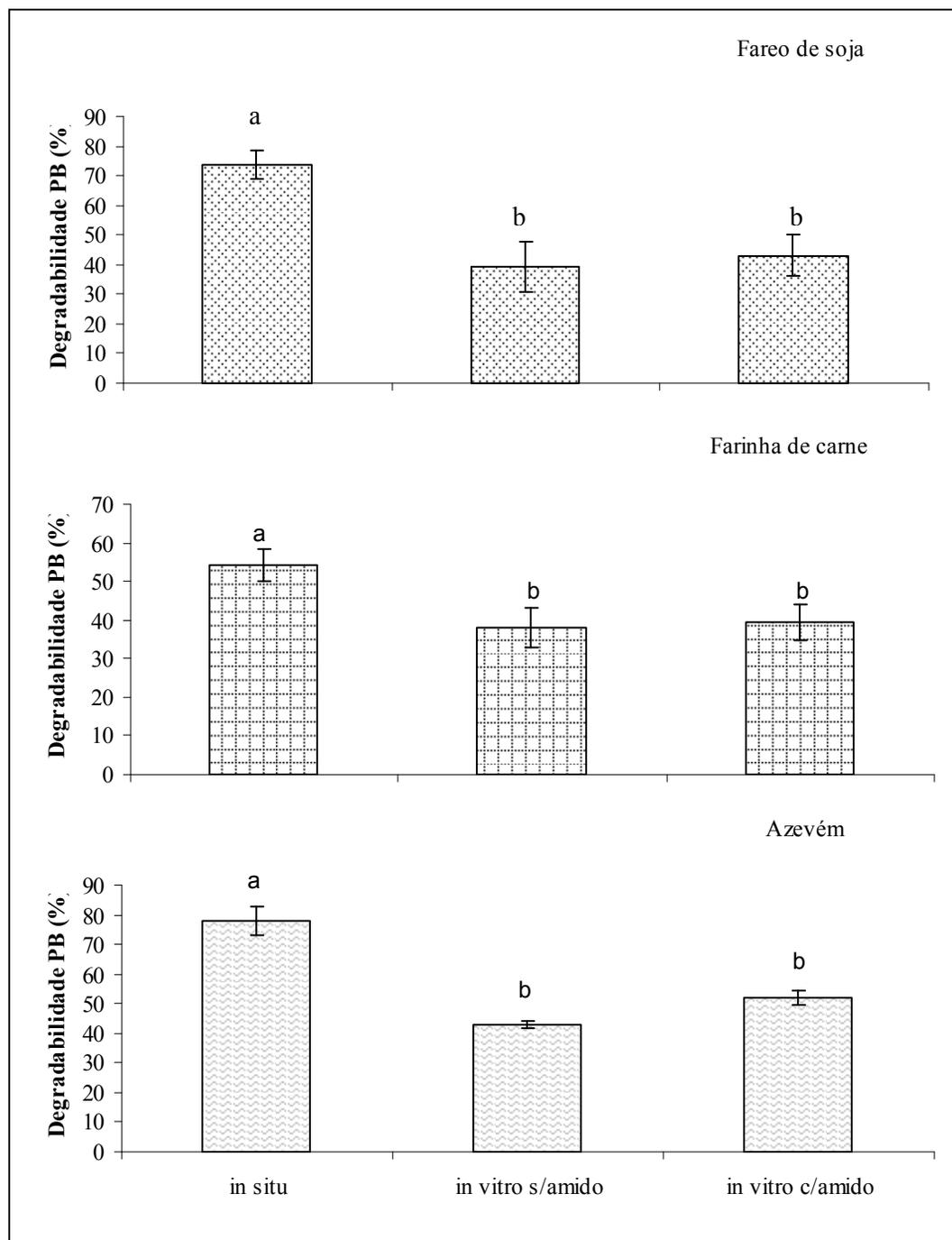


Figura 21 – Degradabilidade da PB (%) do fareo de soja, farinha de carne e ossos e azevém (*Lolium multiflorum*) dos ensaios ensaio 5 *in vitro*, calculado com e sem correção pelo uso de amido e *in situ*. As barras sobre as colunas representam o respectivo desvio padrão. Letras diferentes sobre as colunas indicam que as médias dos dois ensaios são diferentes pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

A correlação entre os resultados obtidos *in vivo* com os *in vitro*, está representada na figura 22. Na aplicação do teste t para dados pareados, não houve diferença estatística entre os resultados obtidos entre dois métodos.

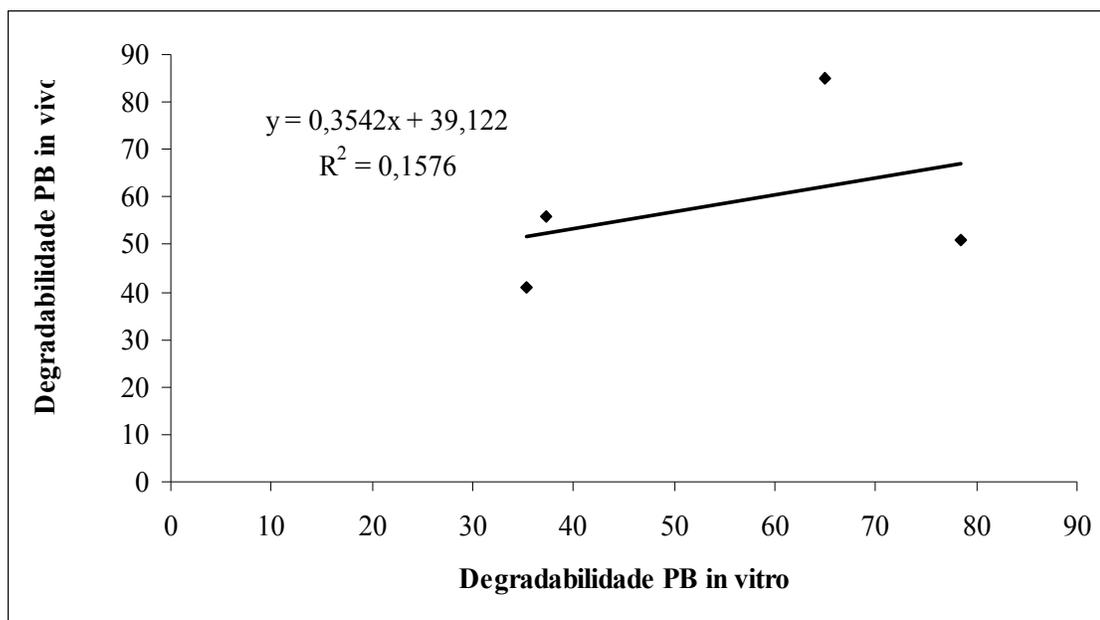


Figura 22 – Correlação entre os valores de degradabilidade protéica ruminal, encontrada *in vitro* e *in vivo* com azevém (*Lolium multiflorum*) e grama-paulista (*Cynodon dactylon* var. *dactylon*).

6 DISCUSSÃO

6.1 Efeito do tamanho da amostra

Inicialmente foi conduzido um ensaio obedecendo aos procedimentos convencionais da técnica *in vitro*/gás, onde se incubava um grama de amostra nas garrafinhas. Pressupondo que os resultados obtidos poderiam ser muito variáveis devido ao fato de que as quantidades de amostras incubadas não foram equivalentes quanto ao teor de N, posteriormente foi realizado o segundo ensaio onde as amostras foram incubadas em quantidades equivalentes a 15 mg de N. Os resultados obtidos com a comparação dos ensaios 1 e 2, sugerem que não é necessária uma fixação na quantidade de N incubado para estudos de degradabilidade protéica, permitindo a condução de um ensaio com quantidades mais adequadas de amostra, entretanto observou-se que quando incubadas quantidades iguais de N, a variação entre os resultados foi menor. Isso indica que mais estudos referentes ao tamanho de amostra são necessários para ajuste da técnica.

Em função do baixo teor de N de alguns tipos de amostras, mediante a necessidade de um valor fixo de N, as quantidades a serem incubadas poderiam extrapolar o recomendado de um grama por garrafa nos ensaios *in vitro* gases (MAURICIO et al., 1999). Entre os grupos de pesquisa, os tamanhos de amostra chegaram a variar de 100 a 1250 mg (GETACHEW et al. 1998). Uma amostra de maior tamanho pode prover resultados mais precisos, entretanto um aspecto importante a ser levado em consideração é a capacidade de tamponamento do meio, ao longo de todo o tempo de incubação (MAURICIO et al., 1999; PELL; SCHOFIELD, 1993).

Theodorou (1994) observou que um aumento na quantidade de substrato no meio de incubação aumentou linearmente o volume de gases, mas a taxa de produção de gases não foi afetada, no entanto estudos dessa natureza, referentes à liberação de NH_3 no meio de incubação ainda são escassos.

6.2 Efeito da composição do meio de incubação

No presente estudo o meio de incubação do ensaio 2 era constituído de 4 g/L de bicarbonato de amônio, correspondendo a 111,1 mg de N/l, o que poderia proporcionar um possível atraso no início da digestão microbiana da proteína do alimento incubado, interferindo nos resultados finais de degradação. Em vista disso, conduziu-se um novo ensaio onde foi completamente eliminada qualquer fonte de N instantaneamente solúvel no meio de incubação (ensaio 3). No entanto, de uma forma geral a degradabilidade e taxa de degradação do azevém sem uso de amido foi negativamente afetada pela ausência do bicarbonato de amônio no meio de incubação ($P < 0,05$).

Grande parte dos estudos realizados com objetivo de estimar a degradação protéica pelo método *in vitro* utiliza no meio de incubação tampões sem presença de N. Em geral são baseados no uso de tampão proposto por Menke (1979) (RAAB, 1983; HERNÁNDEZ et al., 2002) e principalmente uso da saliva artificial criada por McDougall (1948) (BRODERICK, 1987; HERNÁNDEZ et al., 2002; LANA et al., 2007; BRODERICK; CLAYTON, 1992; LUCHINI et al., 1996).

Estudos realizados em busca de uma concentração de NH_3 que permita a maximização do crescimento microbiano e degradação da MO, mostram resultados que variam de 50 mg de N/l (SATTER; STYTER, 1974) a 200 mg de N/l (MILLER, 1973; MEHREZ et al., 1977; ERDMAN et al., 1986). Dryhurst e Wood (1998) recomendam uma concentração mínima de 80 mg N/l no meio de incubação para que a atividade microbiana não seja negativamente afetada, assim como Nagadi et. al. (2000) relatam uma concentração de N/l de 50 a 100 mg, dependendo da disponibilidade de FDN fermentável disponível.

Mediante um excesso de carboidratos fermentáveis, as bactérias irão direcionar seu metabolismo para um maior gasto de ATP, através de reações fúteis (RUSSELL, 1998; KOZLOSKI, 2002). Ao contrário, mediante excesso de N, uma parte que está na forma de aminoácidos será metabolizada pelos microorganismos para obtenção de energia, e a outra parte, na forma de N-NH_3 , escapará da fermentação, sendo absorvida na parede ruminal e a porção não destinada à reciclagem pelo organismo do animal será excretada na urina na forma de uréia (NOCEK; RUSSEL, 1988; BACH et. al. 2005). No entanto, nas condições de um ensaio *in vitro*, o excesso de N-NH_3 na solução tampão, poderá influenciar no perfil da degradabilidade protéica, uma vez que o método empregado se baseia na liberação deste produto no meio de incubação. Isso indica que deve de ser incluída no meio de incubação uma quantidade mínima de N necessário para garantir a atividade microbiana. Dessa forma é assegurado um perfil de degradação da proteína, atrelado às características do alimento e não

a uma deficiência ou excesso de substrato (RYMER et. al., 2005). Com isso, decidiu-se utilizar uma concentração de 80 mg de N/l a partir do ensaio 4.

Como esperado, ainda observa-se que as degradabilidades do azevém foram significativamente deprimidas quando retirado o bicarbonato de amônio do meio de incubação. Isso indica que as bactérias provavelmente demoraram mais tempo para iniciar a degradação, chegando a um valor de degradabilidade inferior, se comparado com o ensaio 2. Entretanto o contrário foi observado com as amostras de farinha de carne e farelo de soja. Com isso, é possível afirmar que a característica químico-física da proteína instantaneamente solúvel dos alimentos incubados, é diferente, e que nem sempre é instantaneamente degradável. Mahadevan et al. (1980), afirma que a proteína solúvel pode ser digerida em diferentes taxas de degradação, podendo estas ser menores até que as taxas da fração potencialmente degradável. Mediante tal observação surge a hipótese de que a fração solúvel da proteína esteja influenciando de alguma forma a estimativa final da degradabilidade protéica. Entretanto, de uma forma geral, nota-se a necessidade da condução de mais estudos a fim de estabelecer uma concentração de N ideal no meio de incubação para os diferentes alimentos, de forma que o perfil de degradação protéica não seja negativamente afetado.

6.3 Efeito do tratamento prévio das amostras

Levando em consideração que os modelos que estimam os valores de PDN consideram que a fração totalmente solúvel (fração A) é totalmente degradada e que a fração potencialmente degradável (fração B) depende da taxa de passagem e de degradação do alimento (NRC, 2001), resolveu-se então, partir para ensaios onde foi incubado somente o resíduo do alimento pré-solubilizado em tampão, para a obtenção de valores de taxa de degradação reais da fração B. Outro fator que reforçou esta decisão foi a suposição de que a fração prontamente solúvel estivesse interferindo na degradabilidade da fração mais lentamente degradável.

Devido aos menores valores de desvio padrão, principalmente para os parâmetros de taxa de degradação, a melhor forma considerada para separar a fração B foi a de tratar toda a amostra previamente com solução tampão, secá-la e depois então com base no teor de N residual realizar a incubação. Acredita-se que com o procedimento do ensaio 4 o N das amostras não foi suficientemente solubilizado. Contudo destaca-se a necessidade de

aperfeiçoar o método de secagem da amostra, sugerindo-se a utilização de liofilizador para tal procedimento.

Se usados isoladamente, as taxas de degradação encontradas no ensaio 5, são bons indicadores de comparação entre os alimentos.

6.4 Efeito da inclusão de amido para obtenção dos valores de degradabilidade

Os resultados de degradabilidade e taxa de degradação dos ensaios 2, 3, 4 e 5 sugerem que a inclusão de amido para correção da fração capturada pelas bactérias funcionou somente com o azevém, não sendo necessário adotar esta prática para concentrados protéicos ao longo de 96 horas. Tal observação atribui maior praticidade ao método, pois possibilita uma redução considerável no número de amostras coletas para serem analisadas.

Com o tratamento de solubilização das amostras, além do N, a fração de carboidrato solúvel também foi perdida. Como o crescimento microbiano depende não só de uma fonte de N, mas também de energia (RUSSEL et al, 1992), a inclusão de amido no meio de incubação parece ter sido importante para uma melhoria na degradação protéica.

6.5 Uso de inibidores *in vitro* para estimativa da degradabilidade protéica

Com o objetivo de encontrar a taxa de degradação da fração protéica prontamente solúvel dos alimentos, conduziu-se um ensaio de curta duração com utilização de inibidores do crescimento bacteriano. Entretanto não foi possível obter resultados precisos com a utilização deste método, pois além de ter ocorrido problemas na determinação de aminoácidos, possivelmente existam outras limitações para o seu uso na estimativa da degradabilidade da proteína. A acumulação dos produtos finais da degradação pode ter causado uma inibição das enzimas proteolíticas, e a ação de inibição dos antimicrobianos sobre o crescimento microbiano, provavelmente influenciaram negativamente na síntese enzimática (CALSAMIGLIA et al., 2000).

6.6 Comparação do método *in vitro* com os métodos *in situ* e *in vivo*

Os resultados de degradabilidade da proteína, obtidas através das taxas de degradação encontradas no ensaio 5, que se referem somente a degradação da fração B das amostras, foram utilizados para comparação com os resultados obtidos *in situ*. Os resultados *in vitro* foram significativamente menores. Possivelmente isso pode estar relacionado a uma subestimativa da degradabilidade *in vitro* por não computar juntamente com o N-NH₃ os demais produtos da degradação protéica como os aminoácidos. As correções pelo uso de amido também poderiam não estar estimando verdadeiramente o total das quantidades de N-NH₃ liberadas com a degradação da proteína.

Por outro lado, o método *in situ*, pode estar superestimando a degradabilidade dos alimentos, pois se baseia no desaparecimento de amostra do interior dos saquinhos incubados no rúmen, o que não quer dizer que essa fração que desapareceu realmente sofreu degradação. Outro problema deste método é a determinação da fração A, que corresponde ao N que desaparece dos saquinhos no tempo zero (somente lavado em água). Na maior parte das vezes uma grande parte do que sai do saquinho com esse procedimento corresponde a perdas de amostra pelos poros, desta forma superestimando a fração A e todo o demais perfil de degradação ao longo do tempo de incubação (HVELPLUND; WEISBJERG, 2000). Outro aspecto que atribui desvantagem do método *in situ* em relação ao *in vitro*, é o número limitado de amostras a ser usado em um ensaio.

Os resultados obtidos *in vivo*, quando comparados com os *in vitro* pelo teste “t” foram estatisticamente similares. Entretanto, o gráfico mostra a equação de regressão entre os dois métodos com um valor de r² baixo, o que reforça a necessidade da realização de mais testes para obtenção de um maior número de comparações, a fim de validar o método *in vitro*.

Embora o método *in vivo* possivelmente seja o mais confiável, ainda não há uma forma padronizada para sua utilização na determinação da degradabilidade protéica ruminal. Além disso, é invasivo, demanda bastante tempo e possui custo mais elevado para execução. Com isso, ressalta-se a necessidade do desenvolvimento de métodos mais simples e rápidos para estimar a degradação protéica ruminal (STERN et al., 1994). Como o método *in vitro* baseado na produção de gases já está consolidado na estimativa da degradação da matéria orgânica, busca-se então sua utilização para fins de estimativa da degradabilidade protéica ruminal.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As variáveis de degradação protéica obtidas com base na liberação de amônia *in vitro* são afetadas pelo tamanho e processamento da amostra, assim como pela concentração de nitrogênio no meio de incubação. A inclusão de amido, por sua vez, interfere nas variáveis de degradação da proteína de amostras de volumoso, mas não de concentrados.

Embora ainda necessite de mais estudos para sua validação e de adequação da quantidade de amostra a ser incubada, a taxa e extensão da degradação ruminal da proteína dos alimentos pode ser estimada pela medida da liberação de amônia no meio de incubação utilizando um ensaio *in vitro*/gases. Neste caso, a amostra deve ser previamente tratada com solução tampão pH 7.0 para retirada da fração solúvel do nitrogênio, a solução tampão deve ter uma concentração de nitrogênio de 80 mg/l e as amostragens de líquido do interior dos frascos devem ser feitas nos tempos 6, 12, 24, 36, 48 e 72 horas após incubação, com a devida reposição do volume.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRICULTURAL RESEARCH COUNCIL. **The nutrient requirements of ruminant livestock**. London: The Gresham Press, 1980, 351 p.

AGRICULTURAL AND FOOD RESEARCH COUNCIL. Nutritive requirements of ruminant animals: energy (Report 5). **Nutrition Abstracts and Reviews. Series B**, CAB International, Wallingford, v. 60, 1990, p. 729-804.

_____. A reappraisal of the calcium and phosphorus requirements of sheep and cattle (Report 6). **Nutrition Abstracts and Reviews**, CAB International, Wallingford, v. 61, 1991, p. 573- 612.

_____. Voluntary intake of cattle (Report 8). **Nutrition Abstracts and Reviews**, CAB International, Wallingford, v. 61, 1991, p.816-823.

_____. Nutritive requirements of ruminant animals: protein (Report 9). **Nutrition Abstracts and Reviews**, CAB International, Wallingford, v. 62, 1992, p. 787-835.

_____. **Energy and protein requirements of ruminants**. CAB International, Wallingford, 1993, 159p.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 12th edition. Washington, D. C. 1995.

AUFRERE J. et. al. Predicting in situ degradability of feed proteins in the rumen by two laboratory methods (solubility and enzymatic degradation). **Animal Feed Science and Technology**. Amsterdam, v. 33, n. 1-2, p.97-116, apr., 1991.

BACH, A.; CALSAMIGLIA, S.; STEREN, M. D. Nitrogen metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science**. Savoy, v. 88, E. Suppl., p. E9-E21, 2005.

BARTLE, S. J.; PRESTON, R. L.; GIBSON, M. L; In vitro evaluation of the pH effect on protein degradation and synthesis by rumen microorganisms. **Nutrition Reports International**, Los Altos – Califórnia, v. 34, n. 6, p. 1001-1009, feb., 1986.

BRODERICK, G. A. Determination of protein degradation rates using a ruminal *in vitro* system containing inhibitors of microbial nitrogen metabolism. **British Journal Nutrition**, London, v. 58, n. 3, p. 463- 475, nov., 1987.

BRODERICK, G. A.; CLAYTON, M. K. Ruminal protein degradation rates estimated by nonlinear regression analysis of Michaelis-Menten *in vitro* data. **British Journal of Nutrition**, London, v. 67, n. 1, p. 27-42, jan., 1992.

BURROUGHS, W.; TRENKLE, A.; VETTER, R. L. A system of protein evaluation for cattle and sheep involving metabolizable protein (amino acids) and urea fermentation potential of feedstuffs. **Veterinary Medicine/Small Animal Clinician**, Washington, v. 69, n. 6, p. 713-722, jun., 1974.

CALSAMIGLIA, S.; STERN, M. D.; BACH, A. Enzymatic and Microbial-cell preparation techniques for predicting rumen degradation and post-ruminal availability of protein. In: **Forage Evaluation in Ruminant Nutrition**. (eds D.I Givens, E. Owen, R.F.E. Axford and H.M. Omed). CAB International, 2000.

CORNELL NET CARBOHYDRATE AND PROTEIN SYSTEM. Ithaca: **Cornell University**, Software, version 5.0.18. 2002.

DRYHURST, N; WOOD, C.D. The effect of nitrogen source and concentration on *in vitro* gas production using rumen micro-organisms. **Animal Feed Science Technology**, Amsterdam, v. 71, n. 1-2, p. 131-143, mar., 1998.

ERDMAN, R. A., PROCTOR, G. H., VANDERSALL, J. H. Effect of rumen ammonia concentration on *in situ* rate and extent of digestion of feed stuffs. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 69, n. 9, p. 2312-2320, sep., 1986.

FAICHNEY, G. J. Digesta flow. In: FORBES, J. M.; FRANCE, J. (Eds.) **Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism**. London: Commonwealth Agricultural Bureaux, Cambridge University, 1993, p.53-85.

FOX, D. G. et. al. The Cornell Net Carbohydrate and Protein System model for evaluating herd nutrition and nutrient excretion. **Animal Feed Science Technology**, Amsterdam, v. 112, n. 1-4, p. 29-78, feb., 2004.

GETACHEW, G. et. al. *In vitro* gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. **Animal Feed Science Technology**. Amsterdam, v. 72, n. 3-4, p. 261-281, jun., 1998.

GOERING, H. K.; VAN SOEST, P. J. Forage fiber analysis: apparatus reagents, procedures and some applications. **Agricultural Handbook**, 379. Washington, D.C. 1970.

HERNÁNDEZ, F. I. L. et. al. Determinação da Cinética Ruminal da Proteína de Vários Alimentos Utilizando o Método de Inibidores *In Vitro*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.31, n.1, p.243-255, fev., 2002.

HERNÁNDEZ, F. I. L. et. al. Determinação da Cinética Ruminal da Proteína de Vários Alimentos Utilizando o Método de Inibidores *In Vitro*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 31, n. 1, p. 232-242, fev., 2002.

HRISTOV, A.; BRODERICK, G. A. *In vitro* determination of ruminal protein degradability using ¹⁵N-ammonia to correct for microbial nitrogen uptake. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 72, n. 5, p. 1344-1353, maio, 1994.

HVELPLUND, T.; WEISBJERG, M. R. In situ techniques for the estimation of protein degradability and postrumen availability. In. **Forage Evaluation in Ruminant Nutrition**. (eds D.I Givens, E. Owen, R.F.E. Axford and H.M. Omed). CAB International, 2000.

HUHTANEN, P.; VANHATALO, A.; VARVIKKO, T. Enzyme activities of rumen particles and feed samples incubated *in situ* with differing types of cloth. **British Journal of Nutrition**, London, v. 79, n. 22, p.161-168, fev.,1998.

HUNTINGTON, G. B.; ARCHIBEQUE, S.L. Practical aspects of urea and ammonia metabolism in ruminants. **Proceedings of the American Society of Animal Science** , 1999, p. 1-11.

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONÔMICA. **Ruminant nutrition**. Recommended allowances and feed tables. Montrouge, France: Institut National de la Recherche Agronomique, John Libbey Eurotext, 1989, 389 p.

KOHN, R. A.; ALLEN, M. S. In vitro protein degradation of feeds using concentrated enzymes extracted from rumen contents. **Animal Feed Science Technology**, Amsterdam, v. 52, n. 3, p. 15-28, mar., 1995.

KOZLOSKI, G. **Bioquímica de ruminantes**. 1. ed. Santa Maria: Ed. UFSM, 134p, 2002.

KOZLOSKI, G. V. et. Al. Potential nutritional assessment of dwarf elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schum. Mott) by chemical composition, digestion and net portal flux

of oxygen in cattle. **Animal Feed Science Technology**, Amsterdam, v. 104, n. 1-4, p. 29-40, feb., 2003.

KRISHNAMOORTHY, U.; SNIFFEN, C. J.; STERN, M. D. et. al. Evaluation of a mathematical model of rumen digestion and an in vitro simulation of rumen proteolysis to estimate the rumen-undegraded nitrogen content of feedstuffs. **British Journal of Nutrition**, London, v. 50, n. 2, p. 555-568, nov., 1983.

LANA, P. R. et. al. Desenvolvimento de uma Técnica para Determinação da Degradabilidade da Proteína dos Alimentos para Ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 29, n. 6, p. 2119-2127, ago., 2000 (Suplemento 1).

LANA, P. R. et. al. Parâmetros da degradação protéica ruminal de diferentes alimentos e rações estimados por técnica *in vitro*. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte, v. 59, n. 2, p. 414-422, abr., 2007.

LICITRA, G.; HERNANDEZ, T. M.; VAN SOEST, P. J. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. **Animal Feed Science Technology**, Amsterdam, v. 57, n. 4, p. 347-358, mar., 1996.

LÓPEZ, S. *In Vitro* and *In Situ* Techniques for Estimating Digestibility. In. **Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism**. Jan Dijkstra, J.; Forbes, J. M.; France, J. 2005, 2 ed.

LUCHINI, N. D.; BRODERICK, G. A.; COMBS, D. K. Characterization of the Proteolytic Activity of Commercial Proteases and Strained Ruminal Fluid. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 74, n. 3, p. 685-692, mar., 1996.

MACAULAY LAND USE RESEARCH INSTITUTE. 2004. *The 'Neway' Curve Fitting Program*, Version 6. **International Feed Resources Unit** homepage on the internet. Disponível em URL: <http://www.macaulay.ac.uk/IFRU/resrc_fcurve.html>

MAHADEVAN, S.; ERFLE, J. D.; SAUER, F. D. Degradation of soluble and insoluble proteins by *Bacteroides amylophilus* protease and by rumen organisms. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 50, n. 6, p. 723-728, may, 1980.

MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Purine quantification in digesta from ruminants by spectrophotometric and HPLC methods. **British Journal of Nutrition**, London, v. 81, n. 2, 107-112, feb., 1999.

MAURÍCIO, R. M. et. al. A semi – automated in vitro gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. **Animal Feed Science Technology**, Amsterdam, v. 79, n. 4, p. 321-330, jun., 1999.

MCDUGALL, E. I. Studies on ruminant saliva. I. The composition and output of sheep's saliva. **Biochemistry Journal**, Edinburgh, v. 43, n. 1, p. 99-109, jan., 1948.

MEHREZ, A. Z.; ØRSKOV, E. R. A study of the artificial fibre bag technique for determining the digestibility of feed in the rumen. **Journal of Agricultural Science**, Tokyo v. 88, n. 1, p. 645-650, may, 1977.

MEHREZ, A. Z., ØRSKOV, E. R., MCDONALD, I. Rates of rumen fermentation in relation to ammonia concentration. **British Journal of Nutrition**. London, v. 38, n. 3, p. 437-443, nov., 1977.

MENKE, K. H. et al. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feed-ingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. **Journal of Agricultural Science**, Tokyo, v. 93, p. 217-222, apr., 1979.

MICHALET-DOREAU, B.; NOZIERE, P. Validation of in situ nitrogen degradation measurements: comparative proteolytic activity of solid-adherent microorganisms isolated from rumen content and nylon bags containing various feeds. **Animal Feed Science and Technology**. Amsterdam, v. 70, n. 1-2, p. 41-47, jan., 1998.

MILLER, E. L., Evaluation of foods as sources of nitrogen and amino acids. **Proceedings of the Nutrition Society**, England, v. 32, n. 2, p. 79-84, sep., 1973.

NAGADI S.; HERRERO M.; JESSOP N. S. The effect of fermentable nitrogen availability on in vitro gas production and degradability of NDF. **Animal Feed Science and Technology**. Amsterdam, v. 87, n. 3-4, p. 241-251, oct., 2000.

NEUTZE, S. A.; SMITH, R. L.; FORBES, W. A. Application of an inhibitor in vitro method for estimating rumen degradation of feed protein. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 40, n. 2, p. 251-265, jan., 1993.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Ruminant nitrogen usage**. Washington, DC: National Academy Press, 1985, 138 p.

_____. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 6.ed. Washington, DC: National Academy Press, 1989, 157 p.

_____. **Nutrient requirements of beef cattle**. 7.ed. Washington, DC: National Academy Press, 1996, 242 p.

_____. **Nutrient requirements of beef cattle**. updated 7.ed. Washington, DC: National Academy Press, 2000, 242 p.

_____. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7.ed. Washington, DC: National Academy Press, 2001, 381 p.

NOCEK, J.E.; RUSSEL, J.B. Protein and Energy as an Integrated System. Relationship of Ruminant Protein and Carbohydrate Availability to Microbial Synthesis and Milk Production. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 71, n. 8, p. 2070-2107, nov., 1988.

NOCEK, J. E. *In situ* and other methods to estimate ruminal protein and energy digestibility: a review. **Journal of dairy science**, Savoy, v. 71, n. 8, p. 2051 – 2069, apr., 1988.

ØRSKOV, E. R.; McDONALD, I. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. **Journal Agricultural Science**, Tokyo, v. 92, n. 1, p. 499-503, mar., 1979.

PALMER, D. W.; PETERS JR., T. Automated determination of free amino groups in serum and plasma using 2, 4, 6 trinitro-benzene sulfonate. **Clinical Chemistry**, Washington v. 15, n. 9, p. 891-901, sep., 1969.

PELL, A. N., SCHOFIELD, P., STONE, W. C. Rates of digestion of feeds measured in vitro with computers. **Proc. Cornell Nutr. Conf.**, 1994, p. 74-81.

PELL, A. N.; SCHOFIELD, P. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion in vitro. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 76, n. 4, p. 1063-1073, apr., 1993.

PONCET, C. B.et. al. Dietary compounds escaping rumen digestion. In M. Journet, E. Grenet, M.-H. Farce, M. Theriez, and C. Demarquilly, ed. **Recent Development in the Nutrition of Herbivores**. INRA Editions, Paris. 1995, p. 167.

RAAB, L.; CAFANTARIS, B.; JILG, T.; MENKE, K. H. Rumen protein degradation and biosynthesis 1. A new method for determination of protein degradation in rumen fluid in vitro **British Journal of Nutrition**, London, v. 50, n. 3, p. 569-582, nov., 1983.

REYNOLDS, C. K.; HARMON, D. L.; CECAVA, M. J. Absorption and delivery of nutrients for milk protein synthesis by portal-drained viscera. **Journal of dairy science**. Savoy, v. 77, n. 9, p. 2787-2808, sep., 1994.

RYMER, C. et. al. In vitro cumulative gas production techniques: History, methodological considerations and challenges. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 123-124, parte 1, p. 9-30, sep., 2005.

RUSSEL, J. B. et al. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminal fermentation. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 70, n. 11, p. 3551-3561, nov., 1992.

RUSSEL, J. B. Strategies that ruminal bacteria use to handle excess carbohydrate. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 76, n. 7, p. 1955-1963, nov., 1998.

SAS. **Statistical Analysis Systems User's Guide**. Version 2001, SAS Institute, Cary, NC.

SANTOS, F. P. Metabolismo da proteína. In: **Nutrição de ruminantes**. Berchielli. T. T.; Pirez, A.V.; Oliveira, S. G. Jaboticabal: Funep, 2006, 583 p.

SATTER, L. D., SLYTER, L. L. Effect of ammonia concentration on rumen microbial production in vitro. **British Journal of Nutrition**, London, v. 32, n. 2, p. 199-208, sep., 1974.

SENGER, C. C. D. **Comparação de técnicas na avaliação da qualidade de silagens de milho**. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005, 126f.

SENGER, C. C. D. et. al. Evaluation of autoclave procedures for fibre analysis in forage and concentrate feedstuffs. **Animal Feed Science and Technology**. Amsterdam, v. 146, n. 1-2, p. 169-174, sep., 2008.

STERN, M. D. et. al. Evaluation of chemical and physical properties of feeds that affect protein metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science**. Savoy, v. 77, n. 9, p. 2762-2786, sep., 1994.

SUTTON, J. D.; OLDHAM, J. D. Feed evaluation by measurement of sites of digestion in cannulated ruminants. **Proceeding Nutrition Society**. Reino Unido, v. 36, n. 2, p. 203-209, apr, 1977.

TAMMINGA, S.; CHEN, X. B. Animal-based techniques for the estimation of protein value of forages. In **Forage Evaluation in Ruminant Nutrition**. (eds D.I Givens, E. Owen, R.F.E. Axford and H.M. Omed). CAB International, 2000, p. 215- 232.

TEDESCHI, L. O. et. al. Mathematical models in ruminant nutrition. **Scientia Agricola Piracicaba**, v. 62, n. 1, p. 76-91, jan./feb, 2005.

THEODOROU, M. K.et. al. A simple gas production using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 48, n. 3-4, p. 185-197, aug, 1994.

VAN SOEST, P. J. Nutritional ecology of the ruminant. 2nd ed. New York: **Cornell University Press**, 1994, 476 p.

VAZANT, E. S.; COCHRAN, R.C.; TITGEMEYER, E.C. Standardization of in situ techniques for ruminant feedstuff evaluation. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 76, n. 10, p. 2717-2729, aug, 1998.

WEATHERBURN, M.W. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 39, n. 8, p. 971-974, jul, 1967.

WHITEHOUSE, N. L. et. al. Improved techniques for dissociating particle-associated mixed ruminal microorganisms from ruminal digesta solids. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 72, n. 5, p. 1335-1343, jan, 1994.

APÊNDICES

Apêndice A – Valores individuais de degradabilidade do farelo de soja, farinha de carne e azevém as 24 e 48 horas, nos cinco ensaios

Ensaio ¹	Corrida	Amostra	Repetição	D24hsa ²	D24hca ³	D48hsa ⁴	D48hca ⁵
1	1	farelo de soja	1	19,28	.	48,53	.
1	1	farelo de soja	2	17,74	.	50,11	.
1	1	farelo de soja	3	16,84	.	49,02	.
1	1	farinha de carne	1	17,05	.	94,59	.
1	1	farinha de carne	2	18,78	.	36,73	.
1	1	farinha de carne	3	17,18	.	31,85	.
2	1	farelo de soja	1	28,60	31,5	59,73	53,8
2	1	farelo de soja	2	28,97	31,4	62,93	62,1
2	1	farelo de soja	3	44,73	44,7	59,47	56,6
2	1	farinha de carne	1	24,49	41,7	52,40	50,9
2	1	farinha de carne	2	31,17	68,0	44,64	38,7
2	1	farinha de carne	3	35,37	39,4	50,24	43,8
2	1	azevém	1	48,52	87,4	70,35	108,4
2	1	azevém	2	44,69	76,7	75,93	112,1
2	1	azevém	3	46,03	60,9	83,06	107,7
3	1	farelo de soja	1	43,68	40,9	70,71	66,1
3	1	farelo de soja	2	49,25	43,1	75,92	76,7
3	1	farelo de soja	3	49,29	44,3	65,61	64,9
3	1	farinha de carne	1	14,15	31,6	26,97	83,8
3	1	farinha de carne	2	35,82	24,0	64,17	54,1
3	1	farinha de carne	3	32,51	19,8	76,96	53,5
3	1	azevém	1	27,40	35,8	55,02	62,6
3	1	azevém	2	36,13	45,1	56,12	71,7
3	1	azevém	3	25,42	33,2	50,30	57,1
3	2	farelo de soja	1	43,55	54,53	80,52	85,70
3	2	farelo de soja	2	37,88	45,23	77,02	80,49
3	2	farelo de soja	3	44,77	51,64	78,11	82,13
3	2	farinha de carne	1	36,43	36,50	63,88	54,72
3	2	farinha de carne	2	39,62	33,29	64,63	64,19
3	2	farinha de carne	3	38,28	38,93	64,53	53,60
3	2	azevém	1	13,15	21,20	28,14	71,42
3	2	azevém	2	13,63	23,86	27,00	68,80
3	2	azevém	3	15,05	25,46	31,66	59,43
3	3	farelo de soja	1	25,90	26,88	46,84	47,99
3	3	farelo de soja	2	26,59	28,50	49,55	47,71
3	3	farelo de soja	3	26,26	29,61	50,97	51,71
3	3	farinha de carne	1	36,84	36,59	62,30	63,67
3	3	farinha de carne	2	40,02	35,94	70,98	66,65
3	3	farinha de carne	3	52,00	43,71	75,05	71,37
3	3	azevém	1	29,54	43,26	55,99	68,61

3	3	azevém	2	32,61	43,46	59,67	70,17
3	3	azevém	3	34,24	45,97	62,12	73,01
4	1	farelo de soja	1	59,07	72,62	96,40	137,11
4	1	farelo de soja	2	53,34	73,63	102,53	128,52
4	1	farelo de soja	3	54,24	73,62	98,06	111,39
4	1	farinha de carne	1	22,89	18,63	51,67	45,49
4	1	farinha de carne	2	16,61	12,78	45,65	37,20
4	1	farinha de carne	3	22,58	19,77	46,91	46,88
4	1	azevém	1	26,28	58,85	63,79	94,13
4	1	azevém	2	12,76	128,90	39,79	-25,34
4	1	azevém	3	38,22	86,25	46,12	142,90
5	1	farelo de soja	1	27,48	28,3	36,90	60,4
5	1	farelo de soja	2	11,81	13,1	12,69	-17,2
5	1	farelo de soja	3	19,20	22,0	23,43	-5,7
5	1	farinha de carne	1	9,91	7,6	14,16	26,4
5	1	farinha de carne	2	10,90	7,0	24,54	41,2
5	1	farinha de carne	3	1,00	1,6	25,56	20,3
5	1	azevém	1	-21,48	-4,0	-20,34	41,3
5	1	azevém	2	-24,23	-5,6	-20,42	31,0
5	1	azevém	3	-25,29	-4,5	-20,10	39,5
5	2	farelo de soja	1	32,87	37,2	67,82	81,1
5	2	farelo de soja	2	34,94	49,2	69,68	91,3
5	2	farelo de soja	3	40,24	47,9	74,18	81,5
5	2	farinha de carne	1	16,24	14,3	38,90	40,1
5	2	farinha de carne	2	17,14	14,7	42,98	42,5
5	2	farinha de carne	3	19,44	17,1	51,02	49,9
5	2	azevém	1	-5,02	17,0	-4,72	81,0
5	2	azevém	2	3,88	27,3	-4,49	62,0
5	2	azevém	3	5,38	38,0	-1,63	81,3

¹Ensaio 1 = Incubação com 1g de amostra, somente sem amido; Ensaio 2 = presença de bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3) na solução tampão; Ensaio 3 = solução tampão do meio de incubação sem bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3); Ensaio 4 = Amostra submetida à solubilização por 3 horas e imediatamente incubada; Ensaio 5 = Amostra submetida à solubilização e secagem previamente a incubação.

²D24hsa = Degradabilidade às 24 horas de incubação obtida sem amido.

³D24hca = Degradabilidade às 24 horas de incubação obtida com amido.

⁴D48hsa = Degradabilidade às 48 horas de incubação obtida sem amido.

⁵D48hca = Degradabilidade às 48 horas de incubação obtida com amido.

Apêndice B – Valores individuais de degradabilidade do farelo de soja, farinha de carne e azevém as 72 e 96 horas, nos cinco ensaios

Ensaio ¹	Corrida	Amostra	Repetição	D72hsa ²	D72hca ³	D96hsa ⁴	D96hca ⁵
1	1	farelo de soja	1	66,00	.	66,02	.
1	1	farelo de soja	2	65,22	.	73,79	.
1	1	farelo de soja	3	62,40	.	70,37	.
1	1	farinha de carne	1	131,70	.	.	.
1	1	farinha de carne	2	50,73	.	51,35	.
1	1	farinha de carne	3	43,91	.	48,68	.
2	1	farelo de soja	1	58,40	44,5	71,78	79,0
2	1	farelo de soja	2	70,00	58,1	80,30	61,4
2	1	farelo de soja	3	62,65	58,0	65,83	51,3
2	1	farinha de carne	1	61,81	67,4	68,98	81,9
2	1	farinha de carne	2	60,91	71,3	59,78	58,1
2	1	farinha de carne	3	59,23	47,2	64,31	60,8
2	1	azevém	1	94,12	145,8	107,10	142,5
2	1	azevém	2	90,79	128,0	99,53	129,4
2	1	azevém	3	97,32	117,0	114,10	155,8
3	1	farelo de soja	1	80,34	81,3	79,56	83,3
3	1	farelo de soja	2	93,98	91,2	97,73	95,2
3	1	farelo de soja	3	84,32	83,8	88,35	85,4
3	1	farinha de carne	1	65,86	74,5	.	108,5
3	1	farinha de carne	2	70,94	29,0	76,61	96,0
3	1	farinha de carne	3	88,42	43,6	99,87	86,0
3	1	azevém	1	62,10	71,1	88,32	91,7
3	1	azevém	2	64,57	92,3	71,00	85,7
3	1	azevém	3	58,73	72,4	67,16	73,1
3	2	farelo de soja	1	99,23	105,40	119,22	124,30
3	2	farelo de soja	2	97,92	97,95	111,25	109,22
3	2	farelo de soja	3	100,75	99,72	117,81	118,50
3	2	farinha de carne	1	92,01	68,60	103,33	82,14
3	2	farinha de carne	2	85,82	83,10	103,35	104,21
3	2	farinha de carne	3	93,52	91,89	93,16	94,16
3	2	azevém	1	49,81	59,55	58,38	69,15
3	2	azevém	2	51,11	66,55	55,46	69,45
3	2	azevém	3	44,10	93,40	56,53	67,59
3	3	farelo de soja	1	69,03	62,48	72,53	74,70
3	3	farelo de soja	2	65,47	60,48	72,67	63,76
3	3	farelo de soja	3	72,48	61,56	81,28	69,32
3	3	farinha de carne	1	92,99	92,45	108,54	106,92
3	3	farinha de carne	2	97,90	90,21	110,43	106,17
3	3	farinha de carne	3	101,73	91,26	122,54	116,61
3	3	azevém	1	73,84	89,82	84,36	98,31

3	3	azevém	2	71,51	79,78	87,50	96,70
3	3	azevém	3	82,96	91,95	93,29	95,90
4	1	farelo de soja	1	107,40	136,20	120,39	146,85
4	1	farelo de soja	2	106,15	145,65	117,74	133,94
4	1	farelo de soja	3	93,35	107,52	99,87	126,87
4	1	farinha de carne	1	70,31	67,96	75,53	72,08
4	1	farinha de carne	2	59,01	51,08	72,37	70,63
4	1	farinha de carne	3	69,36	69,53	76,24	74,30
4	1	azevém	1	87,58	173,79	94,99	151,97
4	1	azevém	2	83,72	244,03	85,26	173,56
4	1	azevém	3	76,15	124,66	95,92	154,72
5	1	farelo de soja	1	47,02	108,2	41,57	123,3
5	1	farelo de soja	2	20,30	191,1	27,92	65,0
5	1	farelo de soja	3	36,59	93,7	49,75	71,4
5	1	farinha de carne	1	18,95	33,3	27,89	53,6
5	1	farinha de carne	2	34,92	26,6	36,22	51,9
5	1	farinha de carne	3	29,77	17,6	42,90	24,5
5	1	azevém	1	-10,68	46,0	-2,00	78,8
5	1	azevém	2	-11,09	36,6	-17,50	-16,4
5	1	azevém	3	-12,87	29,8	-5,16	47,0
5	2	farelo de soja	1	68,36	76,3	94,81	113,0
5	2	farelo de soja	2	86,90	102,0	94,35	109,7
5	2	farelo de soja	3	135,57	159,0	153,91	180,5
5	2	farinha de carne	1	57,41	58,6	72,66	75,8
5	2	farinha de carne	2	61,26	62,2	71,08	73,2
5	2	farinha de carne	3	64,70	62,5	78,76	84,2
5	2	azevém	1	10,51	149,3	16,01	179,1
5	2	azevém	2	4,78	85,5	13,30	134,7
5	2	azevém	3	6,36	133,7	13,22	167,3

¹Ensaio 1 = Incubação com 1g de amostra, somente sem amido; Ensaio 2 = presença de bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3) na solução tampão; Ensaio 3 = solução tampão do meio de incubação sem bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3); Ensaio 4 = Amostra submetida à solubilização por 3 horas e imediatamente incubada; Ensaio 5 = Amostra submetida à solubilização e secagem previamente a incubação.

²D72hsa = Degradabilidade às 72 horas de incubação obtida sem amido.

³D72hca = Degradabilidade às 72 horas de incubação obtida com amido.

⁴D96hsa = Degradabilidade às 96 horas de incubação obtida sem amido.

⁵D96hca = Degradabilidade às 96 horas de incubação obtida com amido.

Apêndice C – Valores individuais de taxa de degradação protéica e seus coeficientes de determinação (r^2) do farelo de soja, farinha de carne e azevém, nos cinco ensaios

Ensaio ¹	Corrida	Amostra	Repetição	TxDsa ²	r2	TxDca ³	r2
1	1	farelo de soja	1	1,53	97,35	.	.
1	1	farelo de soja	2	1,49	98,15	.	.
1	1	farelo de soja	3	1,37	98,29	.	.
1	1	farinha de carne	1	2,59	87,63	.	.
1	1	farinha de carne	2	0,88	95,58	.	.
1	1	farinha de carne	3	0,77	98,35	.	.
2	1	farelo de soja	1	1,58	93,25	1,74	95,31
2	1	farelo de soja	2	2,06	97,26	1,43	80,91
2	1	farelo de soja	3	1,53	75,73	1,65	75,72
2	1	farinha de carne	1	1,53	92,6	1,82	98,36
2	1	farinha de carne	2	1,18	87,07	1,12	86,88
2	1	farinha de carne	3	1,3	91,19	1,17	84,77
2	1	azevém	1	3,42	93,44	2,04	75,96
2	1	azevém	2	3,22	97,93	5,14	96,33
2	1	azevém	3	3,47	92	2,24	79,97
3	1	farelo de soja	1	2,01	92,89	2,15	96,47
3	1	farelo de soja	2	4,07	98,7	3,45	99,06
3	1	farelo de soja	3	2,54	96,31	2,34	95,25
3	1	farinha de carne	1	0,65	80,33	1,71	96,06
3	1	farinha de carne	2	1,53	94,47	1,54	96,01
3	1	farinha de carne	3	2,97	93,4	1,89	93,22
3	1	azevém	1	1,8	87,98	2,19	91,93
3	1	azevém	2	1,27	95,76	2,02	96,54
3	1	azevém	3	1,2	92,34	1,73	90,16
3	2	farelo de soja	1	4,59	85,24	4,69	85,57
3	2	farelo de soja	2	4,75	89,17	4,75	91,45
3	2	farelo de soja	3	5,71	80,64	4,91	84,3
3	2	farinha de carne	1	4,78	88,06	1,85	98,71
3	2	farinha de carne	2	4,62	84,59	4,42	83,01
3	2	farinha de carne	3	3,31	94,21	3,27	94,3
3	2	azevém	1	1,08	98,9	1,4	98,85
3	2	azevém	2	1,02	97,87	1,47	97,73
3	2	azevém	3	1,02	98,8	1,43	91,4
3	3	farelo de soja	1	1,6	96,52	1,59	98,89
3	3	farelo de soja	2	1,54	98,16	1,28	93,52
3	3	farelo de soja	3	1,93	99,7	1,44	94,71
3	3	farinha de carne	1	2,65	96,18	2,77	96,21
3	3	farinha de carne	2	4,49	87,56	4,52	86,81
3	3	farinha de carne	3	4,92	80,96	4,93	77,87

3	3	azevém	1	2,01	99,78	4,08	95,68
3	3	azevém	2	2,12	98,21	3,24	93,56
3	3	azevém	3	2,81	97,85	3,49	99,09
4	1	farelo de soja	1	5,1	90,42	6,82	87,48
4	1	farelo de soja	2	3,85	94,85	2,73	86,73
4	1	farelo de soja	3	4,21	98,64	3,3	82,21
4	1	farinha de carne	1	1,64	97,95	1,46	96,6
4	1	farinha de carne	2	1,31	91,88	1,35	96,43
4	1	farinha de carne	3	1,61	98,3	1,51	95,65
4	1	azevém	1	3,86	99,25	1,82	83,25
4	1	azevém	2	2,73	91,74	7,29	94,21
4	1	azevém	3	3,23	85,3	5,38	62,03
5	1	farelo de soja	1	0,81	61,3	2,31	86,71
5	1	farelo de soja	2	1,5	95,87	1,23	97,66
5	1	farelo de soja	3	0,77	75,91	1,47	94,71
5	1	farinha de carne	1	0,36	91,85	0,93	95,88
5	1	farinha de carne	2	0,77	89,65	0,97	85,99
5	1	farinha de carne	3	0,81	96,39	0,52	74,97
5	1	azevém	1	0,4	96,37	2,34	92,21
5	1	azevém	2	0,19	61,24	1,29	82,01
5	1	azevém	3	0,29	97,66	0,9	87,81
5	2	farelo de soja	1	1,88	92,27	1,94	86,76
5	2	farelo de soja	2	3,19	98,39	4,02	96,68
5	2	farelo de soja	3	2,86	87,8	2,81	86,6
5	2	farinha de carne	1	1,41	98,88	1,52	98,06
5	2	farinha de carne	2	1,37	98,85	1,48	98,84
5	2	farinha de carne	3	1,72	99,45	1,93	96,21
5	2	azevém	1	0,16	23,05	1,26	77,09
5	2	azevém	2	0,02	0,39	1,46	92,91
5	2	azevém	3	0,02	0,42	1,53	97,72

¹Ensaio 1 = Incubação com 1g de amostra, somente sem amido; Ensaio 2 = presença de bicarbonato de amônio (NH₄HCO₃) na solução tampão; Ensaio 3 = solução tampão do meio de incubação sem bicarbonato de amônio (NH₄HCO₃); Ensaio 4 = Amostra submetida à solubilização por 3 horas e imediatamente incubada; Ensaio 5 = Amostra submetida à solubilização e secagem previamente a incubação.

²TxDsa = Taxa de degradação obtida sem amido (%/h).

³TxDca = Taxa de degradação obtida com amido (%/h).

Apêndice D – Valores individuais de degradabilidade e taxa de degradação protéica do farelo de soja, farinha de carne e azevém, nos métodos *in situ*, *in vitro* sem amido e *in vitro* com amido

Método	Amostra	Degradabilidades	Taxa de degradação (%/h)
<i>in situ</i>	farelo de soja	74,89	18,0
<i>in situ</i>	farelo de soja	68,06	11,0
<i>in situ</i>	farelo de soja	77,69	13,4
<i>in situ</i>	farinha de carne	51,82	4,1
<i>in situ</i>	farinha de carne	52,14	3,0
<i>in situ</i>	farinha de carne	59,23	4,3
<i>in situ</i>	azevém	80,12	14,3
<i>in situ</i>	azevém	80,97	18,0
<i>in situ</i>	azevém	72,3	9,0
<i>in vitro</i> sem amido	farelo de soja	30,52	0,81
<i>in vitro</i> sem amido	farelo de soja	37,43	1,5
<i>in vitro</i> sem amido	farelo de soja	30,07	0,77
<i>in vitro</i> sem amido	farinha de carne	30,29	0,36
<i>in vitro</i> sem amido	farinha de carne	35,11	0,77
<i>in vitro</i> sem amido	farinha de carne	35,54	0,81
<i>in vitro</i> sem amido	azevém	44,92	0,4
<i>in vitro</i> sem amido	azevém	43,19	0,19
<i>in vitro</i> sem amido	azevém	44,03	0,29
<i>in vitro</i> sem amido	farelo de soja	40,64	1,88
<i>in vitro</i> sem amido	farelo de soja	49,43	3,19
<i>in vitro</i> sem amido	farelo de soja	47,49	2,86
<i>in vitro</i> sem amido	farinha de carne	41,40	1,41
<i>in vitro</i> sem amido	farinha de carne	41,05	1,37
<i>in vitro</i> sem amido	farinha de carne	44,02	1,72
<i>in vitro</i> sem amido	azevém	42,93	0,16
<i>in vitro</i> sem amido	azevém	41,67	0,02
<i>in vitro</i> sem amido	azevém	41,67	0,02
<i>in vitro</i> com amido	farelo de soja	43,87	2,31
<i>in vitro</i> com amido	farelo de soja	34,91	1,23
<i>in vitro</i> com amido	farelo de soja	37,16	1,47
<i>in vitro</i> com amido	farinha de carne	36,81	0,93
<i>in vitro</i> com amido	farinha de carne	37,22	0,97
<i>in vitro</i> com amido	farinha de carne	32,25	0,52
<i>in vitro</i> com amido	azevém	56,26	2,34
<i>in vitro</i> com amido	azevém	50,99	1,29
<i>in vitro</i> com amido	azevém	48,56	0,90
<i>in vitro</i> com amido	farelo de soja	41,12	1,94
<i>in vitro</i> com amido	farelo de soja	53,68	4,02
<i>in vitro</i> com amido	farelo de soja	47,18	2,81
<i>in vitro</i> com amido	farinha de carne	42,36	1,52
<i>in vitro</i> com amido	farinha de carne	42,02	1,48
<i>in vitro</i> com amido	farinha de carne	45,66	1,93
<i>in vitro</i> com amido	azevém	50,81	1,26
<i>in vitro</i> com amido	azevém	51,96	1,46
<i>in vitro</i> com amido	azevém	52,34	1,53

Apêndice E – Valores individuais de taxa de degradação protéica do farelo de soja, farinha de carne e azevém, nos métodos *in situ* e *in vitro*, do ensaio 3, calculadas sem amido e com amido

Método	Amostra	Taxa de degradação (%/h)
<i>in situ</i>	farelo de soja	18,00
<i>in situ</i>	farelo de soja	11,02
<i>in situ</i>	farelo de soja	13,42
<i>in situ</i>	farinha de carne	4,11
<i>in situ</i>	farinha de carne	3,03
<i>in situ</i>	farinha de carne	4,34
<i>in situ</i>	azevém	14,32
<i>in situ</i>	azevém	17,99
<i>in situ</i>	azevém	8,96
<i>in vitro</i> sem amido	farelo de soja	2,01
<i>in vitro</i> sem amido	farelo de soja	4,07
<i>in vitro</i> sem amido	farelo de soja	2,54
<i>in vitro</i> sem amido	farinha de carne	0,65
<i>in vitro</i> sem amido	farinha de carne	1,53
<i>in vitro</i> sem amido	farinha de carne	2,97
<i>in vitro</i> sem amido	azevém	1,8
<i>in vitro</i> sem amido	azevém	1,27
<i>in vitro</i> sem amido	azevém	1,2
<i>in vitro</i> sem amido	farelo de soja	4,59
<i>in vitro</i> sem amido	farelo de soja	4,75
<i>in vitro</i> sem amido	farelo de soja	5,71
<i>in vitro</i> sem amido	farinha de carne	4,78
<i>in vitro</i> sem amido	farinha de carne	4,62
<i>in vitro</i> sem amido	farinha de carne	3,31
<i>in vitro</i> sem amido	azevém	1,08
<i>in vitro</i> sem amido	azevém	1,02
<i>in vitro</i> sem amido	azevém	1,02
<i>in vitro</i> sem amido	farelo de soja	1,6
<i>in vitro</i> sem amido	farelo de soja	1,54
<i>in vitro</i> sem amido	farelo de soja	1,93
<i>in vitro</i> sem amido	farinha de carne	2,65
<i>in vitro</i> sem amido	farinha de carne	4,49
<i>in vitro</i> sem amido	farinha de carne	4,92
<i>in vitro</i> sem amido	azevém	2,01
<i>in vitro</i> sem amido	azevém	2,12
<i>in vitro</i> sem amido	azevém	2,81
<i>in vitro</i> com amido	farelo de soja	2,15
<i>in vitro</i> com amido	farelo de soja	3,45
<i>in vitro</i> com amido	farelo de soja	2,34

<i>in vitro</i> com amido	farinha de carne	1,71
<i>in vitro</i> com amido	farinha de carne	1,54
<i>in vitro</i> com amido	farinha de carne	1,89
<i>in vitro</i> com amido	azevém	2,19
<i>in vitro</i> com amido	azevém	2,02
<i>in vitro</i> com amido	azevém	1,73
<i>in vitro</i> com amido	farelo de soja	4,69
<i>in vitro</i> com amido	farelo de soja	4,75
<i>in vitro</i> com amido	farelo de soja	4,91
<i>in vitro</i> com amido	farinha de carne	1,85
<i>in vitro</i> com amido	farinha de carne	4,42
<i>in vitro</i> com amido	farinha de carne	3,27
<i>in vitro</i> com amido	azevém	1,4
<i>in vitro</i> com amido	azevém	1,47
<i>in vitro</i> com amido	azevém	1,43
<i>in vitro</i> com amido	farelo de soja	1,59
<i>in vitro</i> com amido	farelo de soja	1,28
<i>in vitro</i> com amido	farelo de soja	1,44
<i>in vitro</i> com amido	farinha de carne	2,77
<i>in vitro</i> com amido	farinha de carne	4,52
<i>in vitro</i> com amido	farinha de carne	4,93
<i>in vitro</i> com amido	azevém	4,08
<i>in vitro</i> com amido	azevém	3,24
<i>in vitro</i> com amido	azevém	3,49

Apêndice F – Valores individuais de desaparecimento de N solúvel em tampão borato-fosfato em 3 horas e seus respectivos valores transformados em logaritmo

Amostra	Tempo (h)	Desaparecimento ¹	Resíduo ²	Log (resíduo)
farelo de soja	0,017	43,1	0,569	-0,564
farelo de soja	0,25	62,4	0,376	-0,978
farelo de soja	0,5	81,7	0,183	-1,696
farelo de soja	0,75	78,9	0,211	-1,556
farelo de soja	1	89,9	0,101	-2,293
farelo de soja	1,5	86,2	0,138	-1,983
farelo de soja	2	90,8	0,092	-2,389
farelo de soja	2,5	103,7	-0,037	.
farelo de soja	3	100,0	0,000	.
farinha de carne	0,017	27,3	0,727	-0,318
farinha de carne	0,25	56,7	0,433	-0,837
farinha de carne	0,5	49,7	0,503	-0,688
farinha de carne	0,75	55,1	0,449	-0,800
farinha de carne	1	78,6	0,214	-1,542
farinha de carne	1,5	81,3	0,187	-1,676
farinha de carne	2	100,0	0,000	.
farinha de carne	2,5	89,3	0,107	-2,235
farinha de carne	3	94,1	0,059	-2,833
azevém	0,017	30,4	0,696	-0,363
azevém	0,25	64,1	0,359	-1,025
azevém	0,5	71,7	0,283	-1,264
azevém	0,75	71,7	0,283	-1,264
azevém	1	91,3	0,087	-2,442
azevém	1,5	93,5	0,065	-2,730
azevém	2	98,9	0,011	-4,522
azevém	2,5	96,7	0,033	-3,423
azevém	3	100,0	0,000	.

¹Desaparecimento = % do N total solúvel que desapareceu no respectivo tempo de tratamento com solução tampão.

²Resísuo = fração do N total solúvel ainda não solubilizado no respectivo tempo de tratamento com solução tampão.

Apêndice G – Valores individuais de degradabilidade de forragens, calculados com base na taxa de degradação da proteína obtida *in vitro*, no fracionamento do nitrogênio, com 2% de taxa de passagem

Alimento ¹	Frações N (%)			Tx. Degradação (%/h)	Degradabilidade <i>in vitro</i>
	A	B	C		
AZExp.1 P1	43,3	52,5	4,2	1,1	96
AZExp 3 P1	70,8	23,2	6,0	0,61	78
CYExp.2 P1	8,0	81,5	10,5	0,49	35
CYExp.2 P4	35,2	53,4	11,4	0,071	37

¹AZExp.1 P1= amostra de azevém do experimento 1, correspondente ao período 1; AZExp.3 P1= amostra de azevém do experimento 1, correspondente ao período 1; CYExp.2 P1= amostra de grama-paulista do experimento 2, no período 1; CYExp.2 P4= amostra de grama-paulista do experimento 2, no período 4.

ANEXOS

ANEXO A - Composição do meio de cultura ¹

Composição do Meio	
Ingredientes:	Mililitro/Litro
Água destilada	520,30
Sol. Tampão	208,10
Sol. Macrominerais	208,10
Sol. Microminerais	0,11
Sol. Rezasurim	1,00
Meio B	62,40
Total	1000
Solução Tampão	
Reagentes	Gramas/Litro
NH ₄ HCO ₃	4,0
NaHCO ₃	35,0
Solução de Macrominerais	
Reagentes	Gramas/Litro
Na ₂ HPO ₄	9,45
KH ₂ PO ₄	3,32
MgSO ₄ 7 H ₂ O	0,60
Solução de Microminerais	
Reagentes	Gramas/Litro
CaCl ₂ .2H ₂ O	132,00
MnCl ₂ .4H ₂ O	100,00
CoCl ₂ .6H ₂ O	10,00
FeCl ₃ .6H ₂ O	80,00
Meio B	
Reagentes	Quantidade/1000mL
Cysteine HCl (gramas)	6,25
Água destilada (mL)	950
NaOH 1M (mL)	40
Na ₂ S (gramas)	6,25
Solução de rezasurina	
Reagentes	g/l
Rezasurina	1,0

¹ Adaptado de Theodorou et al., (1994).

ANEXO B - Composição do meio de cultura ¹

Composição do Meio	
Ingredientes:	Mililitro/Litro
Água destilada	520,30
Sol. Tampão	208,10
Sol. Macrominerais	208,10
Sol. Microminerais	0,11
Sol. Rezasurim	1,00
Meio B	62,40
Total	1000
Solução Tampão	
Reagentes	Gramas/Litro
NaHCO ₃	35,0
Solução de Macrominerais	
Reagentes	Gramas/Litro
Na ₂ HPO ₄	9,45
KH ₂ PO ₄	3,32
MgSO ₄ 7 H ₂ O	0,60
Solução de Microminerais	
Reagentes	Gramas/Litro
CaCl ₂ .2H ₂ O	132,00
MnCl ₂ .4H ₂ O	100,00
CoCl ₂ .6H ₂ O	10,00
FeCl ₃ .6H ₂ O	80,00
Meio B	
Reagentes	Quantidade/1000mL
Cysteine HCl (gramas)	6,25
Água destilada (mL)	950
NaOH 1M (mL)	40
Na ₂ S (gramas)	6,25
Solução de rezasurina	
Reagentes	g/l
Rezasurina	1,0

¹ Adaptado de Menke et. al., (1979).

ANEXO C - Composição do meio de cultura ¹

Composição do Meio	
Ingredientes:	Mililitro/Litro
Água destilada	520,30
Sol. Tampão	208,10
Sol. Macrominerais	208,10
Sol. Microminerais	0,11
Sol. Rezasurim	1,00
Meio B	62,40
Total	1000
Solução Tampão	
Reagentes	Gramas/Litro
NH ₄ HCO ₃	2,88
NaHCO ₃	35,0
Solução de Macrominerais	
Reagentes	Gramas/Litro
Na ₂ HPO ₄	9,45
KH ₂ PO ₄	3,32
MgSO ₄ 7 H ₂ O	0,60
Solução de Microminerais	
Reagentes	Gramas/Litro
CaCl ₂ .2H ₂ O	132,00
MnCl ₂ .4H ₂ O	100,00
CoCl ₂ .6H ₂ O	10,00
FeCl ₃ .6H ₂ O	80,00
Meio B	
Reagentes	Quantidade/1000mL
Cysteine HCl (gramas)	6,25
Água destilada (mL)	950
NaOH 1M (mL)	40
Na ₂ S (gramas)	6,25
Solução de rezasurina	
Reagentes	g/l
Rezasurina	1,0

¹ Adaptado de Dryhurst & Wood (1998).

ANEXO D – Descrição da metodologia adotada para determinação de aminoácidos no líquido ruminal.

Preparação da amostra:

Coletar o 0,5 ml de fluido ruminal do interior dos frascos de incubação, transferir para eppendorfes e adicionar 1,5 ml de ácido tricloroacético (TCA) numa diluição que permita uma concentração final de 5% de TCA (amostra + ácido). Centrifugar em 3000×g por 10 minutos, coletar o sobrenadante e armazenar em congelador até posterior análise.

Equipamentos e vidrarias:

- Seringas de 1ml com agulha;
- Eppendorfes com capacidade de 2ml;
- Centrífuga de até 3000×g;
- Balança analítica;
- Balão volumétrico de 50 e 1000 mL;
- Becker de 50, 100 e 250 mL;
- Tubo de ensaio de 15 mL;
- Pipetas automáticas (10 a 1000µL);
- Cronômetro;
- Agitador de tubo de ensaio;
- Banho Maria
- Espectrofotômetro para leitura na do visível em 420 nm;

Reagentes:

1. Ácido tricloroacético (TCA) 50%

Pesar 500 g de TCA, diluir em ± 400ml/ H₂O destilada, transferir o conteúdo para balão volumétrico de um litro e completar o volume com água destilada.

2. NaOH 0,1N

Pesar 4 gramas de hidróxido de sódio (NaOH) PA, diluir e \pm 800ml/ H₂O destilada, transferir o conteúdo para balão volumétrico de um litro e completar o volume com água destilada.

3. TNBS 0,1%

Pipetar 1ml de TNBS em um balão e completar o volume com 50 ml de água destilada. Manter no refrigerador por até uma semana.

4. Solução salina (0,9% NaCl)- Tampão Borato

Pesar 19,07 gramas de Borato de Sódio (Na₂B₄O₇·10 H₂O) em \pm 800ml/ H₂O destilada, transferir o conteúdo para balão volumétrico de um litro e completar o volume com água destilada.

5. HCl 1N:

Utilizando um ácido com 37% de pureza e 1,19 de densidade, pipetar 82,8 ml de ácido clorídrico PA (HCL) em um balão volumétrico de 1 litro e completar com água destilada.

6. Solução padrão:

Serina 1mM = pesar 0,1051 gramas diluir e \pm 800ml/ H₂O destilada, transferir o conteúdo para balão volumétrico de um litro e completar o volume com água destilada.

Procedimentos:

- 50 μ l de fluído ruminal
- 550 μ l de água destilada;
- 500 μ l de Solução Tampão Borato;
- 250 μ l de TNBS;
- Levar ao banho Maria de 37° C durante 20 minutos;
- Adicionar 500 μ l de HCl 1N após a incubação;
- Ler absorbância em 420 nm de comprimento de onda;

Ex. de Curva Padrão:

Tubo	Padão (μL) Serina 1Mm	Concentração (μg serina)	H ₂ O μl	Tampão μl	TNBS μl	HCl 1N μl	Leitura (Absorbância) (420nm)
B	-	0	600	500	250ul	500	
1	25	2,627	575	500	250ul	500	0,0665
2	50	5,254	550	500	250ul	500	0,128
3	100	10,508	500	500	250ul	500	0,255
4	150	15,763	450	500	250ul	500	0,3965

A obtenção da concentração de aminoácidos totais na amostra é obtida pelo produto entre a leitura de absorbância, fator de diluição e o fator de cálculo (FC):

$$\text{Aminoácidos totais} = \text{Absorbância da amostra} \times \text{fator de diluição} \times \text{FC}$$

O FC, por sua vez, é obtido pelo cociente entre a concentração de serina e sua respectiva leitura de cada ponto da curva padrão.