

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

Matheus Lehnhart de Moraes

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS PARA ESTIMAR A DEGRADAÇÃO
RUMINAL DAS PROTEÍNAS: IN SITU, IN VITRO/GASES E RUSITEC**

Santa Maria, RS
2019

Matheus Lehnhart de Moraes

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS PARA ESTIMAR A DEGRADAÇÃO
RUMINAL DAS PROTEÍNAS: IN SITU, IN VITRO/GASES E RUSITEC**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Zootecnia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Vilmar Kozloski

Coorientador: Prof. Dr. Alejandro Britos (UDELAR)

Santa Maria, RS
2019

de Moraes, Matheus Lehnhart
AVALIAÇÃO DE MÉTODOS PARA ESTIMAR A DEGRADAÇÃO RUMINAL
DAS PROTEÍNAS: IN SITU, IN VITRO/GASES E RUSITEC /
Matheus Lehnhart de Moraes.- 2019.
38 p.; 30 cm

Orientador: Gilberto Kozloski
Coorientadora: Cecília Cajarville
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Zootecnia, RS, 2019

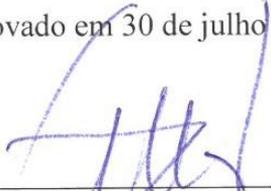
1. Degradabilidade proteica 2. Taxa de passagem 3.
Metodologia 4. Produção de amônia I. Kozloski , Gilberto
II. Cajarville, Cecília III. Título.

Matheus Lehnhart de Moraes

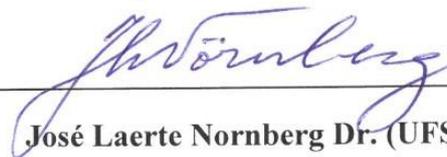
**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS PARA ESTIMAR A DEGRADAÇÃO RUMINAL
DAS PROTEÍNAS: IN SITU, IN VITRO/GASES E RUSITEC**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Zootecnia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

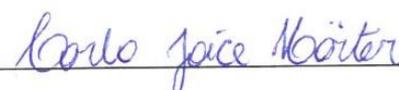
Aprovado em 30 de julho de 2019:



Gilberto Vilmar Kozloski Dr. (UFSM)
(Presidente, Orientador)



José Laerte Nornberg Dr. (UFSM)



Carla Joice Härter Dr. (UFPEL)

Santa Maria, RS
2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por sempre me acompanhar.

Aos meus pais pela dedicação em me proporcionar sempre o melhor.

A minha esposa Franciely Alves Costa, pelo companheirismo de sempre.

Ao professor Dr. Gilberto Vilmar Kozloski, pela orientação e por todos os ensinamentos.

A professora PhD Cecília Cajarville e a todos os amigos do Instituto de Produção animal Veterinária (IPAV) pertencente a UDELAR, pela oportunidade e ajuda na realização deste trabalho.

Aos estagiários, técnicos e colegas de pós-graduação do Laboratório de Bromatologia e Nutrição de Ruminantes pelo convívio e por estarem sempre dispostos a ajudar.

A Fundação CAPES pelo apoio financeiro na realização deste trabalho.

A todos, **MUITO OBRIGADO!**

RESUMO

AVALIAÇÃO DE MÉTODOS PARA ESTIMAR A DEGRADAÇÃO RUMINAL DAS PROTEÍNAS: IN SITU, IN VITRO/GASES E RUSITEC

AUTOR: Matheus Lehnhart de Moraes
ORIENTADOR: Dr. Gilberto Vilmar Kozloski

O objetivo deste estudo foi avaliar os parâmetros de degradação ruminal dos compostos nitrogenados estimados nos métodos *in situ*, *in vitro/gases* e Rusitec, com o intuito de identificar uma superestimação da degradabilidade ruminal estimada pelo método *in situ*. Amostras de uma dieta composta por silagem de milho (60%), grão de milho (18,6%), farelo de soja (20,2%), fosfato-bicálcio (0,2%), calcário calcítico (0,5), sal comum (0,2%) e ureia (0,3%), foram incubadas em ensaios utilizando os métodos *in situ*, *in vitro/gases* e Rusitec. Nos métodos *in situ* e *in vitro* foram estimadas as taxas de degradação (kd) e a degradabilidade da proteína. No método Rusitec foram realizados três ensaios com duração de 9 dias cada, utilizando cinco fermentadores. Cada fermentador recebeu diariamente 10 g da dieta em bolsas de nylon com porosidade de 41 µm. O efluente líquido foi recolhido diariamente e alíquotas foram coletadas para posteriores análises de N amoniacal, N peptídico e N aminoácido. O efeito linear da taxa de passagem da fração líquida, obtidos no ensaio com o Rusitec foram analisados utilizando um modelo misto, que incluiu os efeitos fixos da taxa de passagem, os efeitos aleatórios de período e dos vasos de fermentação, usando o procedimento MIXED do SAS. As diferenças entre os parâmetros de degradabilidade estimados pelos métodos *in situ* e *in vitro* foram verificados pelo teste “F”. O método *in situ* apresentou valores significativamente ($P < 0,05$) maiores de degradabilidade em comparação ao método *in vitro*. O escape de N no método Rusitec apresentou efeito linear crescente com o aumento da taxa de passagem, isto evidencia um escape considerável de N, atingindo valores de 67% do N que desapareceu das bolsas de nylon nas taxas de 7%/h. Em conclusão, com o presente estudo foi possível verificar que frações de N da dieta incubadas em bolsas de nylon escapam da degradação ruminal sem sofrerem a ação das bactérias e este escape é acentuado pelo aumento da taxa de passagem.

Palavras-chave: aminoácidos, amônia, degradabilidade, peptídeos, taxa de passagem

ABSTRACT

EVALUATION OF METHODS TO ESTIMATE RUMINAL DEGRADATION OF PROTEINS: IN SITU, IN VITRO / GASES E RUSITEC

AUTHOR: MATHEUS LEHNHART DE MORAES
ADVISOR: GILBERTO VILMAR KOZLOSKI

The objective of this study was to evaluate ruminal degradation parameters of the nitrogen compounds estimated in the in situ, in vitro / gas and Rusitec methods, in order to identify an overestimation of ruminal degradability estimated by the in situ method. Samples of a diet composed of corn silage (60%), corn grain (18.6%), soybean meal (20.2%), phosphate-bicalcium (0.2%), calcitic limestone (0.5%), common salt (0.2%) and urea (0.3%) were incubated in assays using the in situ, in vitro / gas and Rusitec methods. In situ and in vitro methods, degradation rates (kd) and protein degradability were estimated. In the Rusitec method, three trials were carried out for 9 days each, using five fermenters. Each fermenter received 10 g of the diet daily in nylon bags with porosity of 41 μm . The liquid effluent was collected daily and aliquots were collected for further analysis of ammoniacal N, peptidic N and aminoacid N. The linear effect of the rate of passage of the liquid fraction obtained in the Rusitec assay was analyzed using a mixed model, which included fixed effects of passage rate, random effects of period and fermentation vessels, using the MIXED procedure of SAS. The differences between the degradability parameters estimated by the in situ and in vitro methods were verified by the "F" test. The in situ method showed significantly higher values of degradability ($P < 0.05$) compared to the in vitro method. The N escape in the Rusitec method presented a linear effect increasing with the increase of the passage rate, this shows a considerable escape of N, reaching values of 67% of the N that disappeared from the nylon bags at rates of 7% / h. In conclusion, with the present study it was possible to verify that N fractions of the diet incubated in nylon bags escape ruminal degradation without undergoing the action of the bacteria and this escape is accentuated by the increase of the passage rate.

Key words: amino acids, ammonia, degradability peptides, passage rate

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ilustração mostrando as frações que compõem a PB dos alimentos.....	10
Figura 2 - Diagrama esquemático do metabolismo dos compostos nitrogenados em ruminantes.	11
Figura 3 - Esquema sequencial da degradação proteica no rúmen.....	12
Figura 4 – Esquema geral do metabolismo dos compostos nitrogenados pelas bactérias.....	13
Figura 5 - Diagrama esquemático de incubação utilizando a Técnica de Simulação de Rúmen.	18
Figura 6 - Valores médios de taxa de passagem (kd) e desvio padrão (barras sobre as colunas) estimados pelos métodos in vitro e in situ.	28
Figura 7 - Valores médios de degradabilidade da proteína (%) estimados pelos métodos in vitro e in situ em três taxas de passagens (%/h). *Indica diferença significativa (P<0,05) entre os métodos em cada taxa de passagem.	29
Figura 8 - Valores médios da degradabilidade da proteína (%) estimados in vitro em comparação aos valores estimados in situ corrigidos através da proporção de N escape obtidos no Rusitec. *Indica diferença significativa (P<0,05) entre os métodos em cada taxa de passagem.	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Ingredientes e composição bromatológica da dieta utilizada (% na matéria seca). 22	
Tabela 2 - Efeito da taxa de passagem da fração líquida sobre os produtos da degradação dos compostos nitrogenados (mg/dia), no método Rusitec.	27

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1. NUTRIÇÃO PROTEICA EM RUMINANTES.....	10
2.2. DEGRADAÇÃO DAS PROTEÍNAS, AMINOÁCIDOS E PRODUÇÃO DE AMÔNIA NO RÚMEN	12
2.3. MODELOS MATEMÁTICOS DE PREDIÇÃO	14
2.4. MÉTODOS PARA ESTIMAR A DEGRADAÇÃO DAS PROTEÍNAS.....	15
2.4.1. Método <i>In situ</i>	15
2.4.2. Método <i>in vitro/gases</i>	17
2.4.3. Método Rusitec	18
3. HIPÓTESE	20
4. OBJETIVOS	21
4.1 OBJETIVO GERAL.....	21
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
5. MATERIAIS E MÉTODOS	22
5.1 LOCAL E ÉPOCA	22
5.2 DIETA	22
5.3 <i>IN SITU</i> - ANIMAIS E PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	23
5.4 <i>IN VITRO</i> GASES - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL E AMOSTRAGEM	23
5.5 RUSITEC: PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL E AMOSTRAGEM	24
5.6 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS.....	25
5.7 CÁLCULOS E ESTIMATIVAS	25
5.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	26
6. RESULTADOS	27
6.1 FLUXO DOS COMPOSTOS NITROGENADOS ESTIMADOS NO RUSITEC	27
6.2 COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS.....	28
7. DISCUSSÕES	30
7.1 ESCAPE DOS COMPOSTOS NITROGENADOS	30
7.2 AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS	32
8. CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

1. INTRODUÇÃO

A proteína é um nutriente essencial de extrema importância na produção animal, está relacionada com diversas funções vitais no organismo, onde seu suprimento significa aos animais garantir a manutenção de sua homeostase, propiciando também a produção de carne e leite de forma eficiente (ANDRIGUETTO e PERLY, 2002). Em se tratando de ruminantes, a proteína é um dos nutrientes mais pesquisados atualmente, devido a sua complexidade relacionada a digestão ocorrida nos diferentes compartimentos do trato gastrointestinal, como por exemplo a ação dos microrganismos presentes no rúmen.

O metabolismo ruminal possui a capacidade de modificar a proteína bruta (PB) da dieta de forma quantitativa e qualitativa, tornando a avaliação do valor proteico de alimentos mais complexos em ruminantes do que em outros animais. Isso porque as bactérias ruminais utilizam parte da PB para seu desenvolvimento e posteriormente os próprios microrganismos serão digeridos e absorvidos no intestino do animal (VAGA, 2017).

A estimativa da degradabilidade proteica no rúmen é a informação básica necessária para otimizar os recursos alimentares usados na nutrição de ruminantes, potencializando os ganhos, além de auxiliar na garantia do bem-estar animal (AMARAL, 2012; RIBEIRO et al., 2014; REZAEI et al., 2015). Esta estimativa também representa a fração que estará disponível para ser metabolizada pelos microrganismos ruminais e será utilizada para síntese de proteína microbiana (Pmic) que irá compor a maior parte da proteína que será absorvida no intestino.

Atualmente, existem várias metodologias para prever a extensão e as taxas de degradação proteica dos alimentos em ruminantes. As mais representativas são os métodos *in vivo*, *in situ* e *in vitro*. Embora sendo o método mais antigo, a técnica *in vivo* apresenta certas limitações como a baixa repetitividade e a necessidade, em alguns protocolos, de animais fistulados no rúmen e duodeno, o que é problemático por razões que as amostras tomadas por cânulas às vezes não são representativas e a contaminação microbiana é inevitável durante o manuseio (VELASQUEZ et al., 2016).

O método *in vitro/gases*, através da concentração de amônia (NH₃) no meio de incubação, tem sido estudado como um indicador da degradação microbiana da proteína. Estudos (HÄRTER, 2009; TURREN, 2016) conduzidos no Laboratório de Bromatologia e Nutrição de Ruminantes pertencente ao Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Santa Maria, objetivaram simplificar esta metodologia *in vitro* para estimar a degradabilidade de proteínas no nível ruminal, os quais propuseram reduzir significativamente

a demanda analítica em relação ao método proposto por Raab et al. (1983) e adaptado por Karlsson et al. (2009).

Härter (2009) propôs estimar a taxa de degradação de compostos nitrogenados ao nível ruminal a partir da taxa de produção de amônia no meio ambiente, concluindo que não foi necessário incorporar níveis crescentes de amido para estimar a degradabilidade ruminal das proteínas *in vitro*. Posteriormente, Turren (2016) verificou que a produção de gás não possui correlação com a biomassa microbiana, ou seja, que não é necessário corrigir os valores de concentração de N amoniacal pela produção de gás, otimizando ainda mais esta metodologia.

Entretanto, o método mais utilizado pelos sistemas nutricionais para avaliar a cinética de degradação proteica no rúmen é o método *in situ*. Esta técnica possui limitações teóricas que colocam sua precisão em questão (BRODERICK et al., 1991). Duas grandes preocupações são: 1) que as taxas de degradação ruminal da fração solúvel de nitrogênio (N) de todas as rações incubadas *in situ* são assumidas como infinitas e 2) que a porção da proteína da dieta que é degradada no rúmen é assumido como sendo totalmente utilizado para a síntese de proteína microbiana ou produção de amônia. Desse modo, se uma porção destas frações escaparem à degradação ruminal como proteína solúvel, peptídeos e aminoácidos (AA) livres, a validade destes pressupostos pode não ser verdadeira (REYNAL, 2007).

Contudo, objetivou-se com este estudo avaliar os parâmetros de degradação ruminal dos compostos nitrogenados estimados pelos métodos *in situ*, *in vitro*/gases e Rusitec, com o intuito de identificar uma possível superestimação da degradabilidade ruminal estimados pelo método *in situ*.

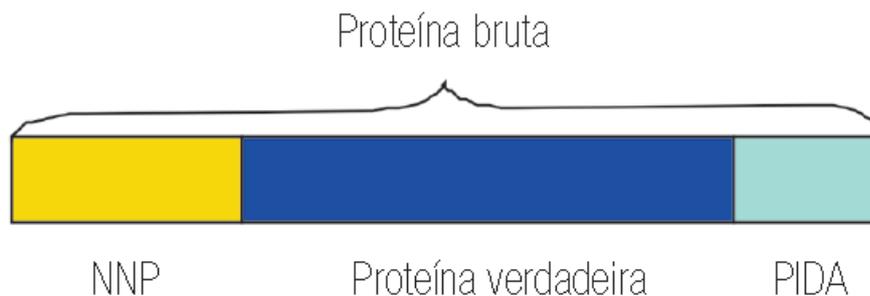
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. NUTRIÇÃO PROTEICA EM RUMINANTES

A nutrição proteica em ruminantes evoluiu de forma considerável nas últimas décadas através do desenvolvimento e aprimoramento das pesquisas de metabolismo. As exigências proteicas evoluíram em termos de PB para proteína metabolizável (PM), levando em consideração a degradação ruminal da proteína e separando as necessidades dos microrganismos do rúmen das necessidades do animal (NRC, 2000).

Para sabermos o teor de proteína de um determinado alimento simplesmente determinamos o N da amostra. A conversão de N total para proteína é feita pelo fator 6,25. Esse fator baseia-se na premissa que, em média, o N corresponde a 16% do peso da proteína total dos alimentos. Por não diferenciar as frações de N que fazem parte desta, foi dado o nome de PB para esse componente do alimento. Sendo este constituído por proteína verdadeira, nitrogênio não proteico (NNP) e proteína insolúvel em detergente ácido (PIDA), conforme mostrado na Figura 1.

Figura 1 - Ilustração mostrando as frações que compõem a PB dos alimentos.



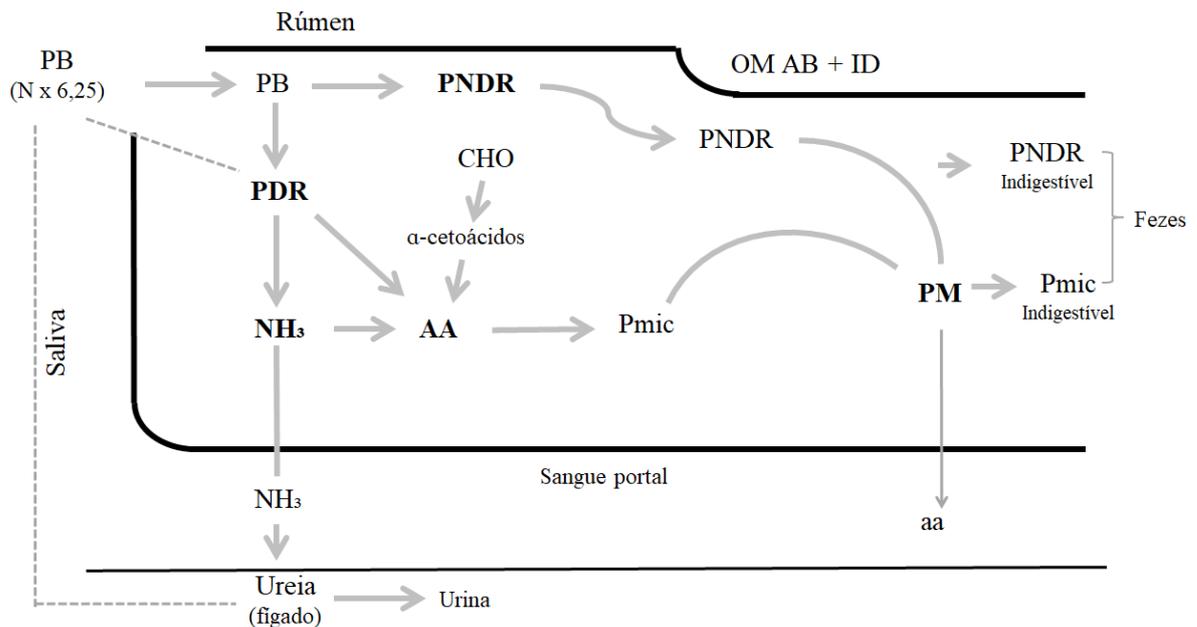
Fonte: Medeiros e Marino (2015).

Para estimar as exigências, os sistemas nutricionais de ruminantes dividem a PB em uma fração de proteína degradável no rúmen (PDR) e outra de proteína não degradável no rúmen (PNDR). A fração PDR é a proteína que, potencialmente, está disponível para ser usada pelos microrganismos ruminais. A maior parte desta se transforma em amônia (NH_3) no rúmen, sendo que uma pequena parte é proteolisada a AA e pequenos peptídeos que também são utilizados pelos microrganismos do rúmen (MEDEIROS e MARINO, 2015). A fração não degradável é a proteína da dieta que passa pelo rúmen sem sofrer a ação dos microrganismos.

A PDR é composta por proteína verdadeira e NNP. A proteína verdadeira é decomposta em peptídeos e AA, que podem ser desaminados em NH₃ ou incorporados na proteína microbiana. O NNP é composto de ácidos nucleicos, ureia, AA e pequenos peptídeos, sendo a fonte de N para os microrganismos NH₃ e AA (BACH et al., 2008).

As exigências de proteína dos animais ruminantes são atendidas pelos AA absorvidos no intestino delgado, denominadas de exigências de PM. A proteína que chega ao intestino delgado consiste da fração de Pmic, da PNDR e uma pequena parte da proteína endógena como apresentado na Figura 2. A estabilidade relativa do perfil de AA da proteína microbiana torna difícil a alteração do perfil de AA da digesta duodenal, sendo necessário para essa alteração, o fornecimento de fontes de proteína não degradada em proporções substanciais de proteína dietética (SALES PEREIRA et al., 2005).

Figura 2 - Diagrama esquemático do metabolismo dos compostos nitrogenados em ruminantes.



Fonte: Adaptado de Kozloski (2011).

Deste modo, para se obter um perfil adequado de AA absorvidos, que atenda as exigências, é necessário o fornecimento de fontes balanceadas de PDR e PNDR. Neste sentido, a precisão dos atuais sistemas proteicos, baseados nas exigências em proteína metabolizável, é atualmente dependente de informações precisas destas frações dos alimentos.

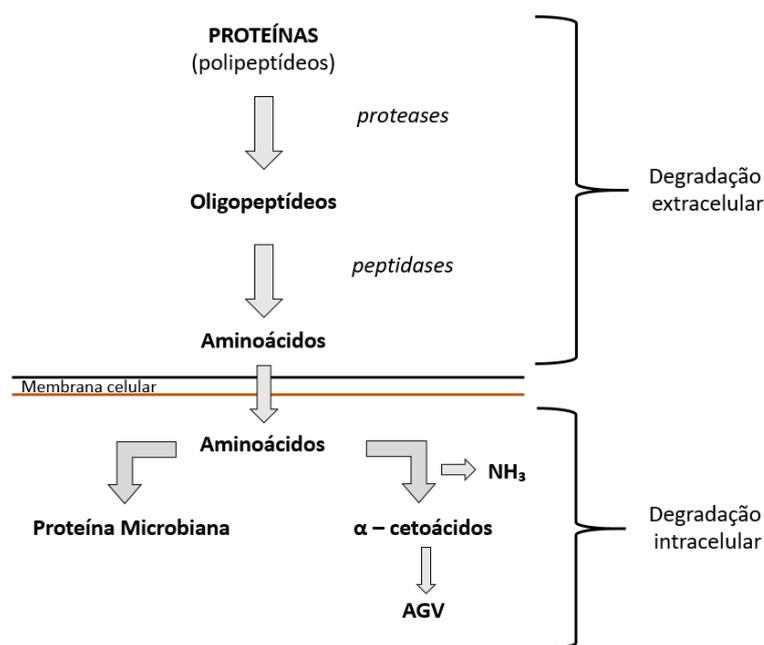
2.2. DEGRADAÇÃO DAS PROTEÍNAS, AMINOÁCIDOS E PRODUÇÃO DE AMÔNIA NO RÚMEN

O conhecimento sobre a utilização e transformações da PDR pelos microrganismos ruminais é fundamental para potencializar o crescimento microbiano, ou seja, um equilíbrio na oferta de PDR garante uma menor perda de compostos nitrogenados, e mantém um fluxo de Pmic para o intestino do animal.

No ambiente ruminal, as bactérias são as principais responsáveis pela degradação da proteína oriunda da dieta. O primeiro passo para a degradação da proteína no rúmen é a adsorção desta pela bactéria, pois a maior parte da atividade das proteases bacterianas ocorre associada a superfície da parede celular e apenas 10% ou menos dessa atividade ocorre livre da célula (CLARINDO, 2006).

Segundo Kozloski (2011), a degradação das proteínas no rúmen é efetuada por sistemas multienzimáticos (proteases, peptidases e deaminases) associados à membrana celular bacteriana. Inicialmente, as moléculas proteicas são hidrolisadas em oligopeptídeos, os quais são hidrolisados por aminopeptidases, liberando dipeptídeos e estes, são hidrolisados por dipeptidases, liberando AA. Os AA adentram as bactérias onde serão incorporados a Pmic ou são desaminados e metabolizados a ácidos graxos voláteis, como podemos observar na Figura 3.

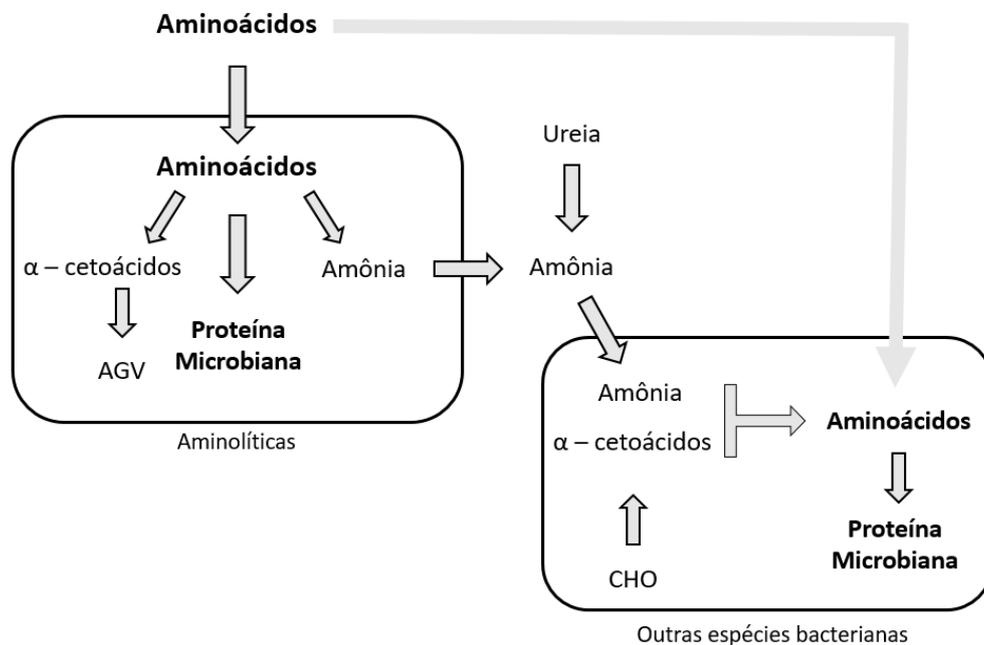
Figura 3 - Esquema sequencial da degradação proteica no rúmen.



Fonte: Adaptado de Kozloski (2011).

O destino dos AA livres na célula bacteriana depende de vários fatores, incluindo espécie bacteriana, taxa de crescimento, disponibilidade de substratos energéticos e perfil de AA disponíveis. Um esquema geral das possíveis rotas dos compostos nitrogenados pelas bactérias é apresentado na Figura 4. A maior parte das espécies bacterianas possuem baixa capacidade desaminativa e, raramente usam AA como fonte de energia, porém outras poucas espécies possuem alta capacidade desaminativa, e são capazes de crescer usando AA como fonte de energia, sendo as principais produtoras de amônia no rúmen (KOZLOSKI, 2011).

Figura 4 – Esquema geral do metabolismo dos compostos nitrogenados pelas bactérias.



Fonte: Kozloski (2011).

Fatores de âmbito ruminal como taxa de passagem e pH também afetam a degradabilidade da PB. O aumento da taxa de passagem, causado por aumento no consumo de matéria seca ou pelo processamento do alimento diminui o tempo de retenção do alimento no rúmen e assim pode aumentar seu teor de PNDR. O pH ruminal pode alterar a solubilidade da PB, assim como afetar a digestão ruminal da fibra e interferir com o acesso microbiano à molécula de proteína (CLARINDO, 2006).

Apesar de menos numerosos, os protozoários representam uma porção significativa da massa microbiana ruminal e são ativos na degradação de proteína. Porém, seu mecanismo de ação difere das bactérias pois estes, ao invés de formarem um complexo com a proteína,

ingerem principalmente bactérias, fungos e partículas pequenas de alimentos, que são digeridos no interior da célula. A digestão da proteína libera peptídeos e estes são degradados a AA livres que são então incorporados na proteína dos protozoários. Apesar de também desaminarem AA, os protozoários não são capazes de utilizar a NH_3 para a síntese de novos AA. Devido à pequena taxa de passagem destes microrganismos para o intestino, estes contribuem pouco para o fluxo de proteína microbiana para o intestino (NRC, 2001).

2.3. MODELOS MATEMÁTICOS DE PREDIÇÃO

Para se determinar cada uma das frações do metabolismo dos compostos nitrogenados, os sistemas nutricionais utilizam modelos matemáticos (sequência de equações) que têm como objetivo estimar com precisão as exigências nutricionais dos ruminantes, objetivando a maior eficiência na utilização dos nutrientes, a fim de reduzir os custos e os impactos ambientais provocados pelas criações (TEDESCHI et al., 2005).

Com o objetivo de estimar com mais detalhes e manipular dietas com maior precisão, um dos importantes avanços científicos empregados para a obtenção das exigências proteicas dos ruminantes como visto anteriormente, foi a introdução do conceito de PM para prever a produção de Pmic pelos sistemas de 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). Estes modelos estimam o consumo de proteína metabolizável (CPM) com base nas seguintes equações:

$$CPM = PMm + PMpndr \quad (1)$$

onde, a PMm é a proteína metabolizável de origem microbiana (g/dia), e PMpndr é a proteína metabolizável oriunda da PNDR (g/dia), estimada pela equação:

$$PMpndr = PNDR \times 0,80 \quad (2)$$

onde a PNDR é a proteína não degradável no rúmen (g/dia), estimada pelas equações:

$$PDR = A + B\left(\frac{kd}{kd + kp}\right) \quad (3)$$

$$PNDR = 100 - PDR + C \quad (4)$$

onde a PDR (% da PB) é estimada com base nos valores das frações A (nitrogênio não proteico e proteínas prontamente solúveis), B (proteína insolúvel em tampão borato-fosfato, mas potencialmente degradável estimada pela equação: $B=100 - A + C$) e C (proteína indigestível: $PIDA = NIDA \times 6,25$) expressas em porcentagem da PB e das taxas de digestão (kd) e de passagem (kp).

E a PMm é predita pela equação:

$$PMm = PBm \times 0,80 \times 0,80 \quad (5)$$

onde a PBm é a proteína bruta microbiana (g/dia) estimada pela equação: $PBm = 0,13 \times NDT$, pressupondo que 80% da PBm é proteína verdadeira e, desta, 80% é digerida e absorvida como AA no intestino delgado.

2.4. MÉTODOS PARA ESTIMAR A DEGRADAÇÃO DAS PROTEÍNAS

Os modelos matemáticos vistos anteriormente, necessitam de estimativas confiáveis dos parâmetros de degradação proteica, para que seja possível balancear as dietas e atender às exigências nutricionais. Atualmente, existem várias metodologias para prever a extensão e as taxas de degradação proteica dos alimentos no rúmen. Embora o método mais utilizado seja o *in situ*, vários autores aperfeiçoaram uma metodologia *in vitro/gases*, para estimar a degradabilidade da proteína. Entretanto, estes métodos utilizam parâmetros questionáveis para estimar a degradabilidade proteica. Menos popularmente, existe a Técnica de Simulação de Rúmen (Rusitec) que permite manter um ambiente estável durante semanas.

2.4.1. Método *In situ*

O método *in situ*, foi proposto por Mehrez e Orskov (1977), é a técnica mais utilizada nos estudos de degradabilidade das frações proteicas dos alimentos nos sistemas nutricionais para ruminantes. O método consiste na incubação de pequenas quantidades de alimento em bolsas de nylon dentro do rúmen e verificado o desaparecimento do nitrogênio desta amostra em diferentes períodos (0, 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48 e 72 horas).

Os mesmos autores propuseram um modelo para estimar a cinética da degradação dos alimentos, expresso pela seguinte equação não-linear:

$$P = a + b * (1 - \exp^{-c*t}) \quad (6)$$

onde, P é a degradabilidade potencial da proteína, A é a proporção de PB degradada no tempo = 0, B é a fração de proteína que é degradável em tempo infinito, c é a taxa de degradação da fração B e t é o tempo de incubação.

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

$$\text{Degradabilidade efetiva} = a + \left(\frac{b * c}{c + k} \right) \quad (7)$$

onde, k é a taxa de passagem das partículas sólidas do rúmen. Com base nas equações acima descritas, após determinar as frações A, B e C, além da taxa de passagem (kp) e da taxa de degradação (kd) é possível prever as frações de PDR e PNDR utilizando as equações 3 e 4.

O conceito geral do método *in situ* é simples comparado com outros tipos de métodos, além de ser de fácil aplicabilidade e oferecer a possibilidade de avaliar muitos alimentos rotineiramente, o que contribui para a popularidade de uso desse método. No entanto, fatores importantes são mencionados por alguns autores, sendo associados a este método, como, a porosidade e tamanho das bolsas, frequência de alimentação do animal fistulado e tamanho de partícula de alimento incubado (SILVEIRA, 2006).

A porosidade das bolsas é uma característica importante, dela depende a troca de material entre o ambiente ruminal e o meio interno da bolsa onde estão amostras do alimento, permitindo em determinadas porosidades a saída de material não degradado. Huntington e Givens (1995) indicam que, para permitir o fluxo microbiano sem excessiva perda de amostra, o tamanho do poro deve ser entre 30 a 50 μm .

Outra questão importante são os alimentos incubados, as amostras não sofrem os efeitos da mastigação e ruminação, portanto, é necessário que este tenha um tamanho de partícula que permita o acesso dos microrganismos a uma grande área do alimento. A moagem do alimento reduz o tamanho da partícula e aumenta a área superficial para a ação microbiana. Porém, a moagem exagerada pode resultar na saída de pequenas partículas pelos poros da bolsa. Vanzant

et al. (1998) recomendam moer os alimentos em peneira com crivos de 2 mm para todos os tipos de alimentos.

De acordo com López (2005), outras limitações podem ser relatadas, pois nem todo o material que deixa as bolsas de nylon pode ser considerado degradável pelos microrganismos do rúmen, assim como nem todo o material que permanece nas bolsas é considerado não utilizado.

2.4.2. Método *in vitro*/gases

O método *in vitro*/gases é comumente utilizado para estimar a degradação da MO, através da produção total de gás liberado pela fermentação de uma amostra incubada em tubos de ensaio com líquido ruminal tamponado. Esta técnica tem se mostrado promissora, e tem sido largamente utilizada, por necessitar de uma menor quantidade de amostra para realizar as avaliações e permitir a obtenção de resultados mais rapidamente (OLIVEIRA, 2015).

Descrito por Theodorou et al. (1994), este método consiste na incubação de amostras de alimentos em frascos de vidro escuro de 120 ml com 40 ml de solução tampão e 10 ml de inoculo ruminal. Os frascos são vedados e mantidos em banho-maria a 39°C, em sistema de agitação lenta. A pressão dos gases no interior dos frascos é medida nos tempos 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48 e 72 horas após a incubação. Adicionalmente, em cada um destes tempos, é coletado amostras para determinação de N amoniacal.

A concentração de N amoniacal tem sido estudada como um indicador da degradação microbiana da proteína *in vitro*/gases (KARLSSON et al., 2009; RAAB et al., 1983). No entanto, quantificar a extensão e a taxa de degradação, medindo a amônia produzida *in vitro*, apresenta várias dificuldades, as quais destaca-se que espécies bacterianas utilizam a amônia oriunda de degradação para a síntese de N microbiano, o que pode resultar na subestimação da degradação (VAGA, 2017).

Raab et al. (1983) propuseram uma metodologia baseada na inclusão de níveis crescentes de carboidratos fermentáveis no meio de incubação para determinar a fração de N amoniacal usada pelas bactérias. Relacionando estes valores com os diferentes níveis de inclusão de carboidratos alcançou-se um valor de liberação de N-NH₃ quando a produção de gás foi igual a zero. Este valor de N amoniacal foi considerado proveniente da degradação da proteína.

Härter (2009) propôs estimar a taxa de degradação de compostos nitrogenados ao nível ruminal a partir da taxa de produção de NH₃ no meio ambiente, concluindo que não foi

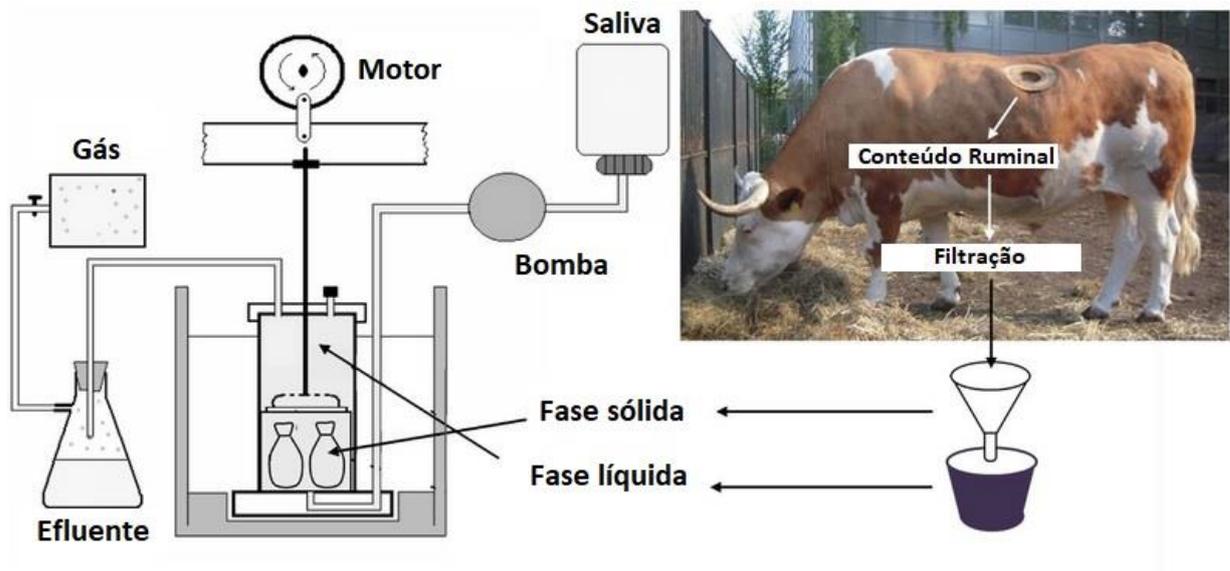
necessário incorporar níveis crescentes de amido para estimar a degradabilidade ruminal das proteínas *in vitro*. Posteriormente, Turren (2016) verificou que a produção de gás não possui correlação com a biomassa microbiana, ou seja, que não é necessário corrigir os valores de concentração de N amoniacal pela produção de gás, otimizando ainda mais esta metodologia.

Porém, como as demais técnicas de degradabilidade, a produção de gás está sujeita a fatores que determinam variações nos resultados. Dentre estes fatores, a anaerobiose, a temperatura, o pH e um adequado tampão são de suma importância, já que todos eles podem contribuir para a diminuição da população microbiana, e assim influenciar a produção de gás *in vitro* (SILVEIRA, 2006).

2.4.3. Método Rusitec

A Técnica de Simulação de Rúmen (Rusitec) é um método pouco conhecido, mas que permite medir os parâmetros de degradação ruminal da proteína. Esta técnica foi desenvolvida por Czerkawski e Breckenridge (1977), com o propósito de simular de maneira mais representativa o ambiente ruminal (Figura 5).

Figura 5 - Diagrama esquemático de incubação utilizando a Técnica de Simulação de Rúmen.



Fonte: Riede et al., 2016.

Este método é capaz de simular condições de agitação, pH, temperatura e diferentemente de outros métodos *in vitro*, é possível manter a entrada e saída de substratos, o que mantém os microrganismos vivos durante semanas, sendo mais próximo da cinética do rúmen. Porém, a

passagem de substratos neste sistema é mais simples do que no rúmen, porque as condições são estáveis, sem efeitos de matéria endógena, sem absorção e a passagem de sólidos ser fixa, ou seja, a alimentação é fornecida em bolsas de nylon trocadas uma vez a cada 48 horas.

Os vasos de fermentação possuem um volume efetivo que variam em torno de 800 ml. Estes são preenchidos com inoculo ruminal obtido a partir de bovinos ou ovinos fistulados no rúmen. O fluxo (taxa de passagem da fração líquida) através destes fermentadores é mantido constante por infusão contínua de saliva artificial a taxas (%/h) controladas. O ambiente se mantém estável durante semanas, no entanto, é necessário um período de adaptação após a inoculação da cultura para alcançar as condições do estado de equilíbrio.

Uma vantagem desse método é a possibilidade de se medir os produtos da fermentação ruminal, uma vez que o efluente líquido é recolhido diariamente onde o volume total é medido e alíquotas podem ser coletadas para serem analisadas. As bolsas de nylon com alimento de cada recipiente são recolhidas diariamente, para verificar o desaparecimento de nutrientes a partir da diferença de peso antes e após a incubação.

Para que o equilíbrio da população de microrganismos se mantenha estável, mesmo após o período de adaptação, é necessário levar em consideração alguns aspectos como a taxa de diluição (taxa de passagem) nos fermentadores. Quando operados com taxa de diluição maior que 1,0 volume do fermentador/dia, o número de protozoários declina, porque o tempo de geração de muitas espécies é maior do que o tempo de residência no fermentador, ocorrendo o carreamento de protozoários, enquanto que a taxa de diluição menor que 1,0 pode causar uma diminuição no número de protozoários devido ao aumento das concentrações de produtos finais da fermentação e consequente queda no pH do meio (ABE e KUMENO, 1973).

3. HIPÓTESE

O método *in situ* superestima a degradabilidade ruminal da proteína e este é acentuado pelo aumento da taxa de passagem da digesta pelo rúmen.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Identificar o escape dos compostos nitrogenados das bolsas incubadas no Rusitec e o efeito de diferentes taxas de passagem.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o impacto da taxa de passagem da fase líquida da digesta sobre a degradabilidade dos compostos nitrogenados através do método Rusitec.

Avaliar os parâmetros de degradabilidade da proteína estimados nos métodos *in situ*, *in vitro/gás* e Rusitec.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 LOCAL E ÉPOCA

Os ensaios e análises laboratoriais foram realizados no período de julho de 2018 a junho de 2019 na Faculdade de Veterinária na Universidade da República no Uruguai, e no Laboratório de bromatologia e nutrição de ruminantes pertencente ao Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Santa Maria, RS.

5.2 DIETA

A dieta utilizada foi formulada para atender as exigências de uma vaca com 500 kg de peso vivo, produzindo 25 kg/d de leite (NRC, 2001). Amostra da silagem de milho passou por processo de secagem em estufa a 55°C por 48 horas, posteriormente, foi moída a 2 mm. O concentrado passou por um processo de peletização, onde após serem moídos (1 mm) foram misturados juntamente com os minerais e água, e após passarem pelo processo de peletização foram moídos novamente em peneiras de 2 mm. As dietas apresentaram relação volumoso:concentrado de 60:40. Os ingredientes e a composição química das dietas são descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Ingredientes e composição bromatológica da dieta utilizada (% na matéria seca).

Ingrediente	%
Silagem de milho	60,0
Milho	18,6
Farelo de soja	20,2
Fosf. bicálcio	0,2
Calcário calc.	0,5
Sal comum	0,2
Ureia	0,3
Composição bromatológica	
MS	91,72
MO	94,62
FDN	25,82
FDA	12,71
N total	2,66
N solúvel	0,55
NIDA	0,11

5.3 *IN SITU* - ANIMAIS E PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Foram utilizadas três vacas secas equipadas com fístulas ruminais mantidas sob pastagem de alfafa recebendo suplementação a base de silagem de milho, farelo de soja, milho moído e minerais, numa quantidade de 1% do peso vivo (com base na MS). Cinco gramas de amostra foram pesados em sacos de nylon (10 x 10 cm e porosidade de 41 μ m), os quais foram selados e incubados no rúmen em duplicatas por horário. As amostras foram incubadas sequencialmente durante 3, 6, 9, 12, 24, 36, 72 horas (h), com retirada conjunta de todas as amostras ao final das 72 h de incubação. Deste modo, em cada animal foram incubados 16 saquinhos (1 alimento \times 8 tempos \times 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 nylon. 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. Posteriormente, foram colocados em estufa com ar forçado à 55° C por 72 h, pesados e armazenados para posteriores análises.

5.4 *IN VITRO/GASES* - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL E AMOSTRAGEM

Foram conduzidos três ensaios utilizando a técnica semi-automatizada de produção de gases *in vitro* (MAURÍCIO et al., 1999). Incubou-se em quadruplicada aproximadamente 0,5g de amostras solubilizadas da dieta em frascos de vidro escuro de 120 ml com 40 ml de solução tampão (MOULD et al., 2005) e 10 ml de inoculo ruminal. Os frascos foram vedados e mantidos em banho-maria a 39°C, em sistema de agitação lenta. Todas as etapas de preparação dos tampões, coleta e manipulação do inoculo foram feitas com gaseificação contínua de CO². O inoculo foi coletado com sistema de vácuo do rúmen de bovino com fístula ruminal e mantido em pastagem com suplementação. A pressão dos gases no interior dos frascos foi medida nos tempos 0, 6, 9, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48 e 72 horas após a incubação, utilizando uma agulha acoplada a uma torneira de três vias e a uma coluna graduada de 25 ml contendo solução de etanol 10% e corante (fenolftaleína). O volume de gases (ml) foi medido pelo deslocamento do líquido na coluna em função da pressão dos gases no frasco. Adicionalmente, nos tempos 0, 6, 12, 24, 36, 48 e 72, foi coletada uma alíquota de 0,5 ml de fluído, o qual foi misturado com 4,5 ml de solução de ácido sulfúrico 2% (p/v) e congelado (-20°C) para posterior análise.

5.5 RUSITEC: PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL E AMOSTRAGEM

Foram realizadas três incubações com duração de 9 dias cada, sendo 4 dias de adaptação e 5 dias de amostragem, utilizando cinco fermentadores do tipo Rusitec descrito por Czerkawski e Breckenridge (1977). Os tratamentos avaliados foram três taxas de passagem da fase líquida sendo 3, 5 e 7 %/h, controladas pela infusão contínua de saliva artificial (pH = 8,2; constituído de 9,8 g de NaHCO_3 , 3,72 g de Na^2HPO_4 , 0,47 g de NaCl, 0,57 g de KCl, 0,053 g de $\text{CaCl}^2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 0,128 g de $\text{MgCl}^2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ / L; (MCDOUGALL, 1948)), em arranjo experimental em quadrado latino 3x3 incompleto. O inoculo ruminal foi obtido a partir de duas vacas fistuladas no rúmen, mantidas em pastejo de alfafa recebendo suplementação a base de farelo de soja, milho moído e silagem de milho. Os conteúdos ruminais de cada bovino foram coletados 3h após a alimentação diária, espremidos através de duas camadas de gaze cirúrgica para separar as frações líquidas e sólidas, misturados e transferidos para os fermentadores após de 20 minutos de coleta. No primeiro dia de cada ensaio, cada fermentador foi preenchido com 500 ml de líquido de rúmen, 250 ml de saliva artificial e 10 g de conteúdo sólido de rúmen fornecido em uma bolsa de nylon e outra bolsa com 10 g de amostra parcialmente seca (APS) da dieta formulada. A bolsa de nylon (11 × 5 cm com tamanho de poro de 41 μm) com conteúdo sólido do rúmen foi substituída após 24 h de incubação por outra bolsa contendo a dieta. As bolsas com amostras da dieta foram alteradas após 48 h, de modo que duas bolsas estavam sempre presentes no fermentador. Diariamente durante a troca das bolsas de alimento o pH de dentro dos fermentadores era medido utilizando um medidor portátil.

O efluente líquido era recolhido diariamente em recipientes apropriados e mantidos resfriados (aproximadamente 0°C) aferido o volume e duas alíquotas eram coletadas. Uma alíquota de 9 ml foi adicionada à 1 ml de TCA 50% (p/v), centrifugada (4000 x g) e o sobrenadante armazenado sob refrigeração para posterior análise, e a outra alíquota de 1,35 ml foi adicionada à 0,15 ml de uma solução de ácido sulfúrico 50% (v/v) e congeladas (-20°C) para posteriormente análise. No período de amostragem, uma bolsa de nylon de cada recipiente foi recolhida diariamente, lavada duas vezes com 40 ml de saliva artificial e depois lavadas com água corrente, e congeladas (-20°C), posteriormente foram secadas em estufa de ar forçado a 55°C por 48 h para posterior análise de MS, MO e PB.

5.6 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS

Das amostras coletadas no Rusitec foi realizada uma mescla dos cinco dias de coletas de cada fermentador. A MS foi determinada secando as amostras a 105 °C durante 12 h. O conteúdo de cinzas e MO foi determinado por combustão a 550 °C durante 2 h em forno mufla. O N total foi determinado pelo método Kjeldahl (AOAC, 1997), modificado por Kozloski et al. (2003). A análise da concentração de FDN e FDA foram realizadas em autoclave a 110°C, por 40 minutos, conforme Senger et al. (2008). O N solúvel e N insolúvel em detergente ácido (NIDA) foram determinados de acordo com Licitra et al. (1996).

A solubilização da dieta utilizada no método *in vitro* foi realizada através da incubação da amostra dentro de bolsas de nylon por 3 horas em água destilada com agitação lenta à temperatura ambiente para remoção da fração solúvel de N.

A concentração de N amoniacal no efluente e no meio de incubação *in vitro*, após centrifugação (12.000 x g por 15 min), foi determinada colorimetricamente conforme Weatherburn (1967). As amostras acidificadas com TCA após centrifugação (12.000 x g por 15 min), foram analisadas quanto a aminoácidos (PALMER e PETERS, 1969) antes e após hidrólise com HCl 6N (2 ml de amostra e 2ml de HCl 6N), a 100°C por 24 h. O N peptídico foi calculado pela diferença entre os conteúdos de aminoácidos antes e depois da hidrólise ácida.

5.7 CÁLCULOS E ESTIMATIVAS

O desaparecimento de MS, MO e PB foi calculado através da diferença de peso das amostras antes e após a incubação. A fração A da PB utilizada *in vitro* foi determinada pela diferença entre a concentração de N da amostra original e aquela obtida após a incubação da amostra por 3 horas em água destilada, com agitação lenta à temperatura ambiente (LICITRA et al., 1996), e lavagem subsequente com água corrente. A fração C da proteína *in vitro* foi considerada igual ao valor de proteína insolúvel em detergente ácido (PIDA = NIDA x 6,25). A fração B foi calculada pela diferença (B=100-(A+C)).

A proporção degradável de N estimada em cada tempo de incubação *in vitro* (DNIV) foi calculada através da seguinte equação: $DNIV = ([N-NH_3] \times \text{Volume saliva artificial} + \text{inoculo}) / NI$, sendo o DNIV= degradabilidade de N *in vitro*; N-NH₃ = concentração de N amoniacal (mg) e, NI= N incubado (mg). A taxa de degradação proteica *in vitro* foi estimada com o coeficiente de regressão entre o logaritmo natural da proporção indegradável (Ln (1 – DNIV)) e o tempo (horas) de incubação (HÄRTER, 2009). No método *in situ*, a taxa de

degradação (kd), assim como as frações A, B e C da proteína foi obtida através do modelo proposto por Orskov e McDonald (1979) utilizando o software estatístico SAS®, de acordo com a seguinte equação: $DPB = a + b \cdot (1 - \exp(-kd \cdot \text{hora}))$, sendo: DPB= degradabilidade da proteína do, a= fração solúvel e rapidamente degradável (%); b=fração insolúvel, mas potencialmente degradável (%); kd = taxa constante da fração b (%/h) e, hora= tempo de incubação (h).

Após obtido os valores de A, B e kd nos métodos *in situ* e *in vitro*, foi calculada a degradabilidade da proteína (DP) da dieta utilizando as taxas de passagem (kp) de 3, 5 e 7 %/h, através da seguinte equação: $DP = A + B \cdot (kd / (kd + kp))$, sendo: A = representa a fração solúvel e rapidamente degradável (%); B = representa a fração insolúvel, mas potencialmente degradável (%); c = taxa constante de função B e, k = taxa de passagem das partículas através do rúmen (% / h).

O N amoniacal, N aminoacídico e N peptídico foram calculados multiplicando a concentração (mg/ml) pelo volume total diário de efluente (ml total). O N de escape foi calculado pela soma do N amoniacal, N aminoacídico e N peptídico. E o valor da degradabilidade *in situ* foi corrigido pelo valor de N de escape obtido no Rusitec ($DP = \text{Deg in situ} - [\text{Deg in situ} \cdot (N \text{ escape} / N \text{ desaparecido})]$).

5.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O efeito linear da taxa de passagem da fração líquida, obtidos no ensaio com o Rusitec foram avaliados utilizando um modelo misto, que incluiu os efeitos fixos da taxa de passagem, os efeitos aleatórios de período e dos vasos de fermentação, usando o procedimento MIXED do SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC) de acordo com o seguinte modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + F_j + P_k + e_{ijk},$$

onde Y_{ijk} = variável dependente; μ = constante geral; F_j = efeito do fermentador j; P_k = efeito do período k; T_i = efeito do tratamento i; e_{ijk} = erro aleatório associado a cada observação ijk .

Os valores de kd e degradabilidade estimados nos métodos *in situ* e *in vitro* foram comparados pelo teste “F”.

6. RESULTADOS

6.1 FLUXO DOS COMPOSTOS NITROGENADOS ESTIMADOS NO RUSITEC

As variáveis analisadas no método Rusitec estão apresentadas na Tabela 2. Dentre as variáveis analisadas o pH apresentou efeito linear crescente. O desaparecimento MS, PB e MO (DMS, DPB e DMO, respectivamente) não apresentaram diferença entre as taxas de passagem testadas. O escape dos compostos nitrogenados foi identificado através da análise de N amoniacal, N aminoacídico e N peptídico presentes no efluentes. O N de escape aumentou linearmente ($P < 0,001$) conforme aumentou a taxa de passagem, sendo esta fração composta principalmente por N peptídico. O escape total de N representou 21 % e 54% do N desaparecido nas taxas de passagem de 3 e 7 %/h. O N amoniacal não apresentou diferença ($P > 0,05$) entre os tratamentos.

Tabela 2 - Efeito da taxa de passagem da fração líquida sobre os produtos da degradação dos compostos nitrogenados (mg/dia), no método Rusitec.

Variáveis	Tx de passagem (%/h)			EPM ¹	Pr>F ²
	3	5	7		
Efluente	568,8	927,6	1275,6	9,85	<0,001
pH	6,83	7,03	7,15	0,03	<0,001
DMS (%)	49,83	49,31	49,70	1,14	0,871
DMO (%)	48,90	48,32	48,73	1,13	0,849
N incubado	245,5	245,4	245,5	0,07	0,423
Fluxo de N (mg/dia)					
N desaparecido	114,03	111,49	113,88	2,69	0,535
N peptídico	22,56	49,36	60,63	4,06	<0,001
N aminoacídico	1,97	1,40	1,29	0,20	0,004
N amoniacal	15,39	11,96	13,83	1,64	0,183
N escape³	24,53	50,74	61,93	4,07	<0,001
NE/ND⁴	0,21	0,45	0,54	0,04	<0,001

¹Erro padrão das médias, onde n=5 por tratamento;

²Probabilidade de efeito linear;

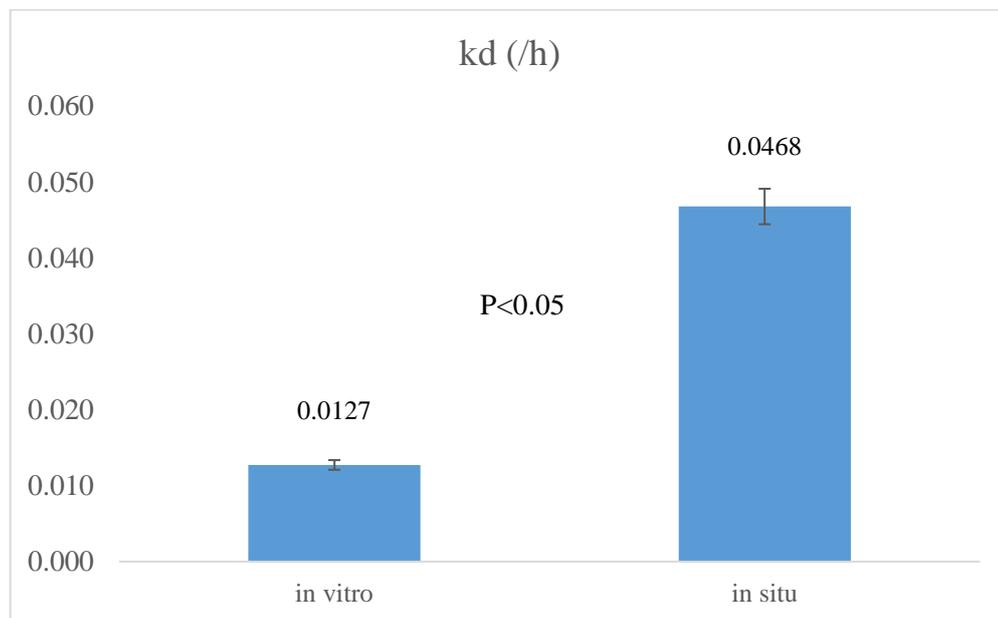
³Total de nitrogênio que escapou sem ser degradado (N escape = N peptídico + N aminoacídico);

⁴Proporção de nitrogênio de escape em relação ao nitrogênio desaparecido (N escape/ N desaparecido);

6.2 COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS

Os valores de kd e degradabilidade da proteína obtidos nos métodos *in situ* e *in vitro* estão apresentados na Figura 6. O método *in situ* apresentou valor de kd maior que o método *in vitro*.

Figura 6 - Valores médios de taxa de passagem (kd) e desvio padrão (barras sobre as colunas) estimados pelos métodos *in vitro* e *in situ*.



A comparação dos valores de degradabilidade da proteína estimados entre os métodos *in situ* e *in vitro* estão apresentados na Figura 7. O método *in situ* apresentou valores maiores de degradabilidade em comparação aos valores estimados *in vitro* nas diferentes taxas de passagem.

Os valores médios da degradabilidade da proteína estimada *in situ*, foram corrigidos com base nos valores proporcionais de N de escape nas taxas de passagem dos ensaios do Rusitec e também foram comparados com os valores estimados *in vitro*, sendo apresentados na Figura 8. Os valores de degradabilidade proteica foram diferentes em todas as taxas de passagem, porém nas taxas 5 e 7 o método *in vitro* apresentou valores maiores em comparação aos valores obtidos no método *in situ*. E também é possível observar uma maior aproximação das retas em comparação com a Figura 7.

Figura 7 - Valores médios de degradabilidade da proteína (%) estimados pelos métodos *in vitro* e *in situ* em três taxas de passagens (%/h). *Indica diferença significativa ($P < 0,05$) entre os métodos em cada taxa de passagem.

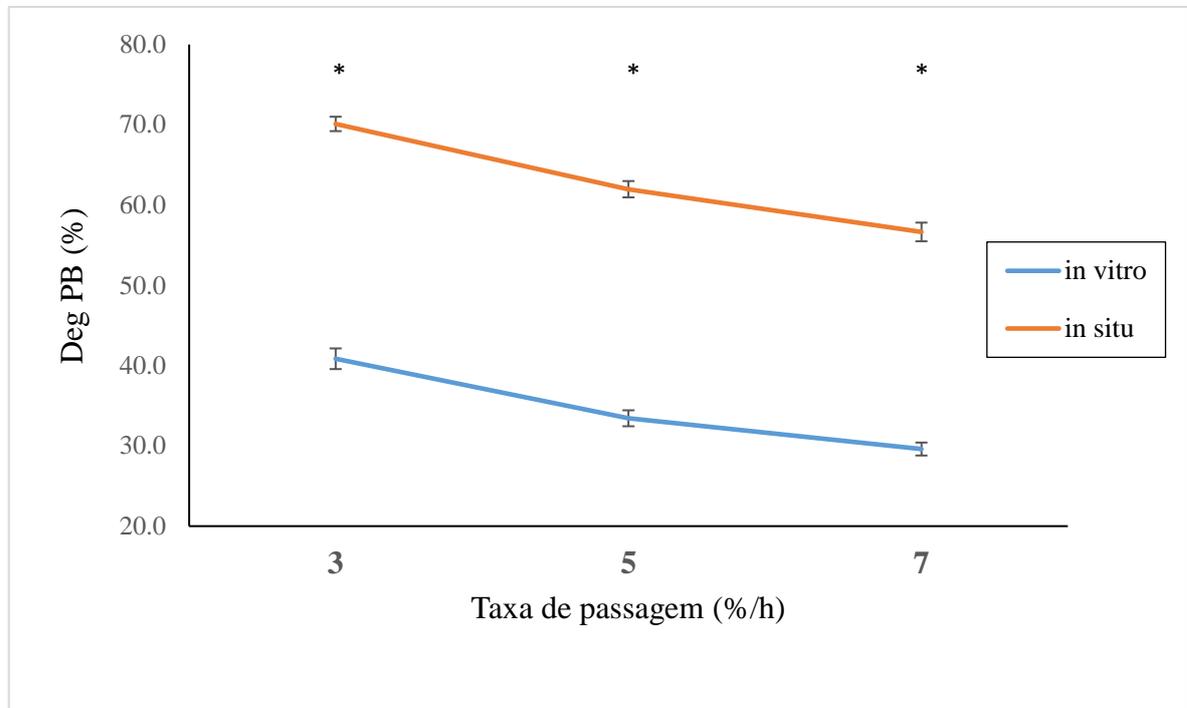
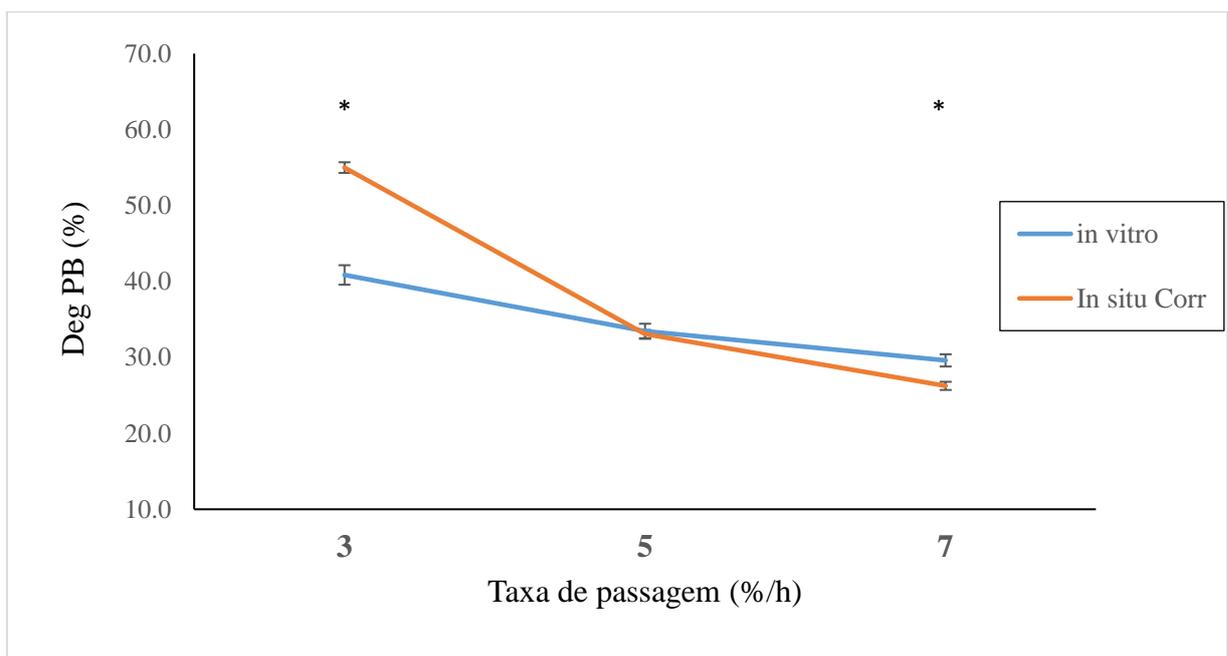


Figura 8 - Valores médios da degradabilidade da proteína (%) estimados *in vitro* em comparação aos valores estimados *in situ* corrigidos através da proporção de N escape obtidos no Rusitec. *Indica diferença significativa ($P < 0,05$) entre os métodos em cada taxa de passagem.



7. DISCUSSÕES

7.1 EFEITO DA TAXA DE PASSAGEM

Através dos ensaios realizados no Rusitec foi possível verificar a influência ou não da taxa de passagem sobre algumas variáveis. A taxa de passagem não influenciou os desaparecimentos de MS e MO, este comportamento está de acordo com os de Czerkawski e Breckemidge (1977), que não encontraram efeitos sobre a degradabilidade da MS após 48 h de incubação, quando compararam taxas de diluição de 1,5, 2,5 e 3,3% / h. Hoover et al. (1984) também relataram que o aumento da taxa de diluição de 4 para 16%/h não teve efeito sobre a degradabilidade da MO após 24 h de incubação.

A degradação das proteínas está inversamente relacionada à taxa de passagem através do rúmen (ORSKOV e MCDONALD, 1979), porém o desaparecimento de N não apresentou diferença estatística ($P > 0,05$) entre as taxas testadas, o que pode ser explicado pelo fato que no método Rusitec, apenas a taxa de passagem da fração líquida foi alterada. Entretanto, parte considerável deste N que desapareceu das bolsas de nylon passou pelos fermentadores sem sofrer ação dos microrganismos e apresentou efeito linear crescente ($P < 0,001$) conforme o aumento da taxa de passagem, chegando a representar 54% do N desaparecido na taxa de 7 %/h.

O escape de N foi identificado por outros autores em estudos utilizando uma técnica de amostragem omasal (CHOI et al., 2002; REYNAL et al., 2007), demonstraram que até 30%, do N solúvel não amoniacal da dieta escapa da degradação ruminal (HRISTOV e BRODERICK, 1996). Este escape de N também foi identificado por Bach et al. (2008) avaliando a degradabilidade das frações solúveis da PB do farelo de soja e de canola e verificaram que apenas 70 e 63%, das frações solúveis destas fontes escaparam da degradação, respectivamente.

Neste estudo, maior parte do N que escapou foi representado pelos peptídeos, que apresentou efeito linear crescente, comportamento inverso ao verificado nas concentrações de N aminoacídico. Este comportamento inverso pode ser explicado pela maior velocidade na renovação do conteúdo de dentro dos fermentadores, ou seja, em maiores taxas as partículas de alimento que escapavam das bolsas rapidamente eram removidas dos fermentadores, o que nas taxas menores permaneciam mais tempo para ação das enzimas proteolíticas.

A quantidade diária de N amoniacal apresentou valores baixos neste estudo, o que vai em desacordo com o que foi encontrado por Carro et al. (1995), no qual observaram valores de

65,7 mg/dia de N amoniacal a uma taxa de 3,5 %/h em fermentadores Rusitec. As concentrações ótimas de N amoniacal para apresentar um crescimento microbiano máximo é relatada como sendo de pelo menos 50 mg/L *in vitro* (SATTER e SLYTER, 1974) ou 85 mg/L em condições *in vivo* (KANG-MEZNARICH e BRODERICK, 1980). Embora, a maior parte N bacteriano seja oriundo do N amoniacal, frações consideráveis de AA e peptídeos (5 a 60%) podem ser incorporados diretamente a proteína microbiana (KOZLOSKI, 2011) o que pode explicar os valores de 26,3 mg/L (15 mg/dia na taxa de 3%/h) encontrados neste trabalho.

Adicionalmente, o fato da taxa de passagem não apresentar efeito linear significativo ($P > 0,05$) sobre os valores de N amoniacal é explicado por um provável equilíbrio entre as taxas de produção e a captação de NH_3 pela população bacteriana, ou seja, na taxa de 3%/h houve maior produção e também captação de NH_3 , enquanto na taxa de 7%/h embora houvesse menor desaminação, também houve menor incorporação de NH_3 pelas bactérias.

7.2 AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS

A diferença apresentada na degradabilidade da proteína estimada nos métodos *in situ* e *in vitro*, coincide com o que foi relatado por outros autores (HARTER, 2009; TURREN, 2016; SEHGAL e MAKKAR, 1994; DEWHURST et al., 1995), o que pode ser explicado devido à perda de alimento através dos poros das bolsas incubados no rúmen. Como visto anteriormente, o método *in situ* baseia seus cálculos no desaparecimento do substrato, considerando que o alimento que falta nas bolsas de nylon incubadas foi degradado pelas bactérias ruminais. Através deste desaparecimento em diferentes horários, permite-se calcular a taxa de degradação dos alimentos. Por outro lado, o método *in vitro* pode ter subestimado as taxas de degradação, uma vez que os microrganismos usam NH_3 para síntese de Pmic (KOZLOSKI, 2011).

Estas suposições foram confirmadas ao se corrigir os valores de degradabilidade *in situ* pela proporção N de escape obtidos no Rusitec. Uma vez que os valores corrigidos se apresentaram mais próximos aos valores estimados *in vitro*, sendo que o aumento das taxas de passagem (de 3 para 5 e 7%/h) proporcionou valores menores para a degradabilidade corrigida *in situ*, o que pode ser explicado pelo maior escape de N na forma de peptídeos e AA.

Questões como a porosidade das bolsas e taxa de passagem de líquidos adotadas no método Rusitec, poderiam ter influenciado na representatividade do método (CARRO, 2005). Em termos de porosidade, a metodologia adotada neste estudo procurou utilizar as mesmas adotadas pelo método *in situ*, utilizando bolsas com porosidade de 41 μm . Em relação as taxas de passagem de líquidos, Burger et al., (2000) avaliaram os efeitos de diferentes níveis de concentrado sobre as taxas de passagem de fluidos através do Co-EDTA em bezerros e verificaram uma taxa de passagem de líquidos de 8,15 %/h em dieta com 45% de concentrado. Estes valores seriam elevados para o método Rusitec, uma vez que altas taxas removeriam todos os microrganismos de dentro dos fermentadores (ABE e KUMENO, 1973).

8. CONCLUSÕES

Com o presente estudo é possível afirmar que frações de N da dieta incubadas em bolsas de nylon escapam da degradação ruminal sem sofrerem a ação das bactérias e este escape é acentuado pelo aumento da taxa de passagem da fração líquida em fermentadores Rusitec.

Este resultado comprova as imprecisões dos métodos *in situ* e *in vitro/gases*, e ressalta a importância de metodologias que levem em consideração o maior número de fatores que possam influenciar o metabolismo dos compostos nitrogenados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AOAC. **Official Methods of Analysis**. 16ed. Gaithersburg, MD: AOAC International, 1997.
- ABE, M.; KUMENO, F. In vitro simulation of rumen fermentation: apparatus and effects of dilution rate and continuous dialysis on fermentation and protozoal population. **Journal of animal science**, v. 36, n. 5, p. 941-948, 1973.
- ANDRIGUETTO, J. M.; PERLY, L. **Nutrição animal: bases e fundamentos**. NBL Editora, 2002.
- AMARAL, P. M. et al. Desempenho e exigências nutricionais de bovinos mestiços Holandês x zebu alimentados com dietas contendo diferentes níveis de proteína. Viçosa-MG. 2012.
- ARC - AGRICULTURAL RESEARCH COUNCIL. **The nutrient requirements of ruminants Livestock**. London: The Gresham Press, 351 p. 1980.
- BACH, A. et al. Evaluation of the fermentation dynamics of soluble crude protein from three protein sources in continuous culture fermenters I. **Journal of animal science**, v. 86, n. 6, p. 1364-1371, 2008.
- BRODERICK, G. A.; WALLACE, R. J.; ØRSKOV, E. R. Control of rate and extent of protein degradation. In: **Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants**. 1991. p. 541-592.
- BÜRGER, P. J. et al. Taxas de passagem e cinética da degradação ruminal em bezerros holandeses alimentados com dietas contendo diferentes níveis de concentrado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 1, p. 225-235, 2000.
- CARRO, M. D.; LEBZIEN, P.; ROHR, K. Effects of pore size of nylon bags and dilution rate on fermentation parameters in a semi-continuous artificial rumen. **Small Ruminant Research**, v. 15, n. 2, p. 113-119, 1995.
- CLARINDO, R. L. **Fontes energéticas e protéicas para bovinos confinados em fase de terminação**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2006.
- CHOI, C. W. et al. Quantitation of the flow of soluble non-ammonia nitrogen entering the omasal canal of dairy cows fed grass silage based diets. **Animal Feed Science and Technology**, v. 96, n. 3-4, p. 203-220, 2002.
- CZERKAWSKI, J. W.; BRECKENRIDGE, G. Design and development of a long-term rumen simulation technique (Rusitec). **British Journal of Nutrition**, v. 38, n. 3, p. 371-384, 1977.
- DEWHURST, R. J.; HEPPEL, D.; WEBSTER, A. J. F. Comparison of in sacco and in vitro techniques for estimating the rate and extent of rumen fermentation of a range of dietary ingredients. **Animal Feed Science and Technology**, v. 51, n. 3-4, p. 211-229, 1995.

HÄRTER, C. J. **Desenvolvimento e avaliação de um método in vitro para estimar a degradabilidade das proteínas no rúmen**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

HOOVER, W. H. et al. Effects of solids and liquid flows on fermentation in continuous cultures. IV. pH and dilution rate. **Journal of Animal Science**, v. 58, n. 3, p. 692-699, 1984.

HUNTINGDON, J. A.; GIVENS, D. I. The in situ technique for studying the rumen degradation of feeds: a review of the procedure. **Nutrition Abstracts and Reviews. Series B, Livestock Feeds and Feeding (United Kingdom)**, 1995.

HRISTOV, A. N.; BRODERICK, G. A. Synthesis of microbial protein in ruminally cannulated cows fed alfalfa silage, alfalfa hay, or corn silage. **Journal of Dairy Science**, v. 79, n. 9, p. 1627-1637, 1996.

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

KANG-MEZNARICH, J. H.; BRODERICK, G. A. Effects of incremental urea supplementation on ruminal ammonia concentration and bacterial protein formation. **Journal of Animal Science**, v. 51, n. 2, p. 422-431, 1980.

KARLSSON, L. et al. New methodology for estimating rumen protein degradation using the in vitro gas production technique. **Animal feed science and technology**, v. 153, n. 3-4, p. 193-202, 2009.

KOZLOSKI, G. V. **Bioquímica dos ruminantes**. Fundação de Apoio a Tecnologia e Ciencia- Editora UFSM, 2011.

KOZLOSKI, G. V. et al. Potential nutritional assessment of dwarf elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schum. cv. Mott) by chemical composition, digestion and net portal flux of oxygen in cattle. **Animal Feed Science and Technology**, v. 104, n. 1-4, p. 29-40, 2003.

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. **Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism**, 2nd edn. CAB International, Wallingford, UK, p. 87-121, 2005.

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

MCDougall, E. I. Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. **Biochemical journal**, v. 43, n. 1, p. 99, 1948.

MEDEIROS, S. R.; MARINO, C. T. Proteínas na nutrição de bovinos de corte. **Embrapa Gado de Corte-Capítulo em livro científico**, 2015.

- MEHREZ, A. Z.; ØRSKOV, E. R. A study of artificial fibre bag technique for determining the digestibility of feeds in the rumen. **The Journal of Agricultural Science**, v. 88, n. 3, p. 645-650, 1977.
- MOULD, F. L. et al. A review and simplification of the in vitro incubation medium. **Animal Feed Science and Technology**, v. 123, p. 155-172, 2005.
- NRC - National Research Council. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 6.ed. Washington, DC: National Academy Press, 157 p. 1989.
- NRC - National Research Council. **Nutrient requirements of beef cattle**. Updated 7th. ed. Washington, DC: National Academy Press, 242p, 2000.
- NRC - National Research Council. **Nutrient requirements of beef cattle**, 8.ed.. Washington, DC: National Academies Press, 2016.
- NRC - National Research Council. **Nutrient requirements of dairy cattle**. Updated 7th. ed. Washington, DC: National Academy Press, 2001.
- NRC - National Research Council. **Nutrient requirements of small ruminants**. Washington, DC: National Academies Press, 362p. 2007.
- NRC - National Research Council. **Ruminant nitrogen usage**. Washington, DC: National Academy Press, 138 p. 1985.
- OLIVEIRA, V. et al. Utilização da técnica de produção de gás in vitro para estimar a digestibilidade dos alimentos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 23, n. 1, p. 1-11, 2015.
- ØRSKOV, E. R.; MCDONALD, I. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. **The Journal of Agricultural Science**, v. 92, n. 2, p. 499-503, 1979.
- PALMER, D. W.; PETERS, T. Automated determination of free amino groups in serum and plasma using 2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonate. **Clinical Chemistry**, v. 15, n. 9, p. 891-901, 1969.
- PELTEKOVA, V. D.; BRODERICK, G. A. In vitro ruminal degradation and synthesis of protein on fractions extracted from alfalfa hay and silage. **Journal of dairy science**, v. 79, n. 4, p. 612-619, 1996.
- RAAB, L. et al. Rumen protein degradation and biosynthesis: 1. A new method for determination of protein degradation in rumen fluid in vitro. **British Journal of Nutrition**, v. 50, n. 3, p. 569-582, 1983.
- REYNAL, S. M. et al. Omasal Flow of Soluble Proteins, Peptides, and Free Amino Acids in Dairy Cows Fed Diets Supplemented with Proteins of Varying Ruminant Degradabilities1. **Journal of dairy science**, v. 90, n. 4, p. 1887-1903, 2007.

REZAEI, J. et al. Effects of dietary substitution of maize silage by amaranth silage on feed intake, digestibility, microbial nitrogen, blood parameters, milk production and nitrogen retention in lactating Holstein cows. **Animal Feed Science and Technology**, v. 202, p. 32-41, 2015.

RIEDE, S. et al. Investigations on the possible impact of a glyphosate-containing herbicide on ruminal metabolism and bacteria in vitro by means of the 'Rumen Simulation Technique'. **Journal of applied microbiology**, v. 121, n. 3, p. 644-656, 2016.

RIBEIRO, P. R.; MACEDO, G. L.; SILVA, S. P. Aspectos nutricionais da utilização da proteína pelos ruminantes. **Veterinária Notícias**. v.20, n. 2, p.1-14, 2014.

SALES PEREIRA, E. et al. Importância da inter-relação carboidrato e proteína em dietas de ruminantes. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 26, n. 1, 2005.

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

SATTER, L. D.; SLYTER, L. L. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vitro. **British journal of nutrition**, v. 32, n. 2, p. 199-208, 1974.

SEHGAL, J. P.; MAKKAR, G. S. Protein evaluation in ruminants in vitro, in sacco, in vivo protein degradability and microbial efficiency of different protein supplements in growing buffalo calves. **Animal feed science and technology**, v. 45, n. 2, p. 149-165, 1994.

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.

SILVEIRA, M. F. **Comparação de métodos in vivo e laboratoriais para estimar o valor nutritivo de dietas para bovinos de corte**. Tese de Doutorado. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)-Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 2006.

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

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

TURREN, G. F. **Evaluación de un método in vitro para estimar tasa de degradación ruminal de los compuestos nitrogenados**. Dissertação (Maestría en nutrición de rumiantes) – Facultad de Veterinaria, Universidad de la República. Uruguay, p. 62. 2016.

VAGA, M. **Investigating ruminal nitrogen metabolism**. Tese de Doutorado - Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science. Suécia. 2017.

VANZANT, E. S.; COCHRAN, R. C.; TITGEMEYER, E. C. Standardization of in situ techniques for ruminant feedstuff evaluation. **Journal of animal science**, v. 76, n. 10, p. 2717-2729, 1998.

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

ZHANG, Y. L. et al. Effects of supplementation of Simmental steers with 2-methylbutyrate on rumen microflora, enzyme activities and methane production. **Animal Feed Science and Technology**, v. 199, p. 84-92, 2015.