

PERFIL AMINOACÍDICO DA LEUCENA (*Leucaena leucocephala*), RAMI (*Boehmeria nivea*) E DE SEUS RESÍDUOS APÓS INCUBAÇÃO NO RÚMEN, EM SOLUÇÃO TAMPÃO BORATO-FOSFATO, EM SOLUÇÃO FDA E APÓS DIGESTÃO INTESTINAL

AUTORES

LIDIA FERREIRA MIRANDA¹, NORBERTO MÁRIO RODRIGUEZ², ROBERTO SAINZ³, ELZÂNIA SALES PEREIRA⁴, CRISTINA MATOS VELOSOS⁵, ELOÍSA OLIVEIRA SALIBA², MIGUEL MARQUES GONTIJO NETO⁶, PAULO CAMPOS CHISTO FERNANDES⁷

¹ Professora FEAD-Minas; Este trabalho é parte da Tese de Doutorado desenvolvida na Escola de Veterinária - UFMG;

² Professor Titular UFMG;

³ Professor University of California - USA;

⁴ Professora UNIOESTE ;

⁵ Professora Universidade Estadual do Sul da Bahia - UESB, Itapetinga;

⁶ Pesquisador EMBRAPA Gado de Corte;

⁷ Consultor Técnico Alltech do Brasil;

RESUMO

Perfil dos aminoácidos (AAs) do alimento original, AAs não degradados no rúmen -NDR, AAs obtidos após incubação em solução tampão borato-fosfato (TBF) e AAs não-degradados no rúmen indigestíveis no intestino foram determinados usando procedimentos “in situ” e “in vitro” em amostras de leucena (*Leucaena leucocephala*) e rami (*Boehmeria nivea*). Os alimentos tratados com TBF e os resíduos obtidos da incubação foram analisados para AAs, por HPLC, após hidrólise ácida ou pré-oxidação, seguida de hidrólise. Para obtenção do perfil dos AAs NDR, os volumosos foram incubados por 18 horas, usando-se sacos de náilon. A simulação da digestão intestinal seguiu a técnica de três estágios. Os aminoácidos de cadeia ramificada, fenilalanina, lisina, treonina e glicina, apresentaram menor degradação em relação à média dos aminoácidos na leucena, após 18 horas de incubação ruminal. A incubação intestinal apresentou efeito sobre o perfil de aminoácidos não degradados no rúmen e digeridos no intestino em relação ao alimento original para leucena. Dentre os alimentos estudados, pequenas diferenças foram registradas entre o perfil de aminoácidos não digeridos no intestino e o perfil obtido após 18 horas de incubação ruminal. O uso do perfil de AAs do alimento original para prever os aminoácidos essenciais (AAE) disponíveis para absorção apresentou acurácia para o rami, não apresentando predição realística para a leucena, sendo o perfil de AA da proteína sobrepassante diferente daquela do alimento original.

PALAVRAS-CHAVE

perfil de aminoácidos, forrageira tropical

TITLE

AMINO ACIDS PROFILES OF LEUCENA (*Leucaena leucocephala*), RAMI (*Boehmeria nivea*) AND OF THEIR RESIDUES AFTER RUMINAL INCUBATION, BORATE-PHOSPHATE BUFFER SOLUTION, ADF SOLUTION AND AFTER INTESTINAL DIGESTION

ABSTRACT

Amino acids (AAs) profiles of the feed, of AAs non degradable in the rumen, residual AAs after incubation in phosphate-borate buffer (BFB) and rumen undegradable AAs undigested in the intestine, were determined using “in situ” and “in vitro” procedures in samples leucaena (*Leucaena leucocephala*) and ramie (*Boehmeria nivea*). Feeds were treated with BFB and, in the residues of incubation as well as the original feeds AAs were analyzed by HPLC, after acid hydrolysis or peroxidation followed by acid hydrolysis. To obtain the profile of rumen undegradable AA, forages were incubated during 18h, using nylon bags. To simulate the intestinal digestion a three stages procedure was used. Branched amino acids phenylalanine, lysine, treonine and glycine,

had lower degradations when compared to the average of amino acids in leucaena, after 18 hours of incubation in the rumen. Intestinal incubation showed effects on the amino acids profile non degraded in the rumen and digested in the intestine original food for leucaena. Among the studied feeds small differences were registered between amino acid profile not digested in the intestine and the profile obtained after 18 hours of ruminal incubation. The use of the AA profile of the original feed to predict essential amino acids available for absorption were accurate for rami. They were not realistic for prediction for leucaena. The profile of amino acids of bypass protein was different than that of the original feed.

KEYWORDS

amino acid profile, tropical forage

INTRODUÇÃO

Nos sistemas usuais de produção, o ruminante obtém a maioria dos nutrientes a partir de volumosos. Daí a necessidade do entendimento e da utilização de modelos mecanicistas para descrever o relacionamento entre a composição bromatológica dos alimentos consumidos e a predição do desempenho animal. A proteína microbiana sintetizada no rúmen, as diferentes frações protéicas do alimento ou da dieta que escapam à degradação ruminal e a proteína de origem endógena, constituem o total de aminoácidos que chegam ao intestino delgado dos ruminantes. A absorção intestinal deste total de aminoácidos depende dos coeficientes de digestibilidade de cada uma das fontes protéicas. Dessa forma, as exigências de proteína dos animais ruminantes são atendidas pelo total de aminoácidos absorvidos pelo animal, sendo correspondentes à proteína verdadeira microbiana e às proteínas dietéticas digestíveis que escaparam à degradação ruminal (NRC 2001). A predição das exigências e das características de utilização dos alimentos pelos ruminantes, numa determinada situação, requer o uso de modelos que integrem o conhecimento relativo ao alimento, ao consumo de matéria seca e aos efeitos das taxas de degradação e de passagem sobre o valor energético dos alimentos, sobre o escape de proteína dietética e sobre a eficiência de crescimento dos microrganismos ruminais.

Como significativa parte da porção protéica dos alimentos, particularmente forrageiras são degradadas pela microbiota ruminal, a composição aminoacídica que escapa à degradação e chega no intestino delgado pode diferir consideravelmente em relação à composição do alimento original.

Diante disso, o presente estudo objetivou determinar a composição dos aminoácidos, perfil de aminoácidos não-degradados no rúmen, perfil obtido após incubação em solução tampão borato-fosfato, perfil de aminoácidos na fibra em detergente ácido, perfil de aminoácidos não degradados no rúmen indigestíveis, e verificar a possibilidade de predição das concentrações dos aminoácidos que chegam no intestino a partir do perfil de aminoácido dietético da leucena (*Leucaena leucocephala*) e rami (*Boehmeria nivea*).

MATERIAL E MÉTODOS

Os alimentos estudados foram folhas de leucena (*Leucaena leucocephala*) e rami (*Boehmeria nivea*) e seus respectivos resíduos do estudo de degradação ruminal.

Os alimentos foram analisados para matéria seca (MS) e proteína bruta (PB). Obteve-se a fração insolúvel de proteína bruta através do tratamento das forrageiras originais com solução tampão borato-fosfato. O nitrogênio insolúvel total foi determinado a partir do tratamento da amostra com tampão borato-fosfato ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ à 12,2 g/L + $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ à 8,91 g/L + 100 mL/L de álcool butílico terciário e 1mL de solução de azida sódica a 10%) durante 3 horas (LICITRA et al., 1996). O resíduo remanescente foi filtrado e lavado com água destilada.

Para determinação da digestibilidade intestinal da proteína não degradada no rúmen, utilizou-se os volumosos após incubação ruminal por 18 horas. A simulação da digestão intestinal da PNDR foi realizada conforme CALSAMIGLIA e STERN (1995). Os resíduos da incubação ruminal foram incubados com solução de HCL contendo 1 g/L de pepsina (pH=1,9) durante 1 hora a 38° C. Posteriormente, foram adicionados solução 1 N de NaOH e solução de pancreatina, contendo 50 ppm de thymol, para inibir o crescimento microbiano durante 24 horas. Ao final da digestão, os resíduos foram imediatamente filtrados e lavados com água destilada.

Os volumosos e os resíduos remanescentes, após incubação ruminal por 18 horas, e os resíduos da incubação com tampão borato-fosfato e digestão intestinal, foram submetidos à pulverização,

em moinho de porcelana, e tamização, em peneira de 0,25 mm (60 mesh). Em seguida foram hidrolisados com ácido clorídrico 6 N a 110° C por 24 horas sob uma atmosfera de N. Após a hidrólise, as amostras foram filtradas e submetidas a evaporação.

Os aminoácidos sulfurados foram analisados após oxidação com ácido per fórmico seguida de hidrólise. As análises foram realizadas por HPLC (Cromatografia líquida de alta performance).

Os aminoácidos foram expressos como porcentagem da proteína bruta de cada resíduo das respectivas forragens. Dentro de cada forragem e seus resíduos, as concentrações de aminoácidos foram avaliadas em delineamento inteiramente casualizado (quatro tratamentos com três repetições), por meio de análise de variância, utilizando-se o programa SAS (1985) e o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O perfil de AA da forrageira original e seus resíduos remanescentes após incubação com tampão borato-fosfato, incubação ruminal por 18 horas e após digestão intestinal estão apresentados nas Tabelas 1 e 2.

O conteúdo de aminoácidos no resíduo do FDA, para o rami, foi menor em relação à composição apresentada pela forrageira original, assim como, quando incubados em TBF, 18 horas de incubação ruminal, e nos resíduos remanescentes da digestão intestinal (17,67 vs 48,06; 51,89; 46,68 e 50,10), respectivamente. Estes resultados estão coerentes às observações de Tedeschi et al. (2001), sugerindo que a maior parte do N determinado na fração do FDA do alimento ou dos resíduos não seja proteína verdadeira. Já para a leucena observou-se maior concentração de aminoácidos no resíduo do FDA, em relação à forrageira original, resíduos de incubação em TBF, 18 horas de incubação ruminal, e da digestão intestinal. Provavelmente, em virtude de tais forrageiras apresentarem maior percentual de proteína insolúvel em detergente ácido (PIDA).

Segundo o NRC (2001), a avaliação química dos alimentos deveria descrever, pelo menos, uma forma de predição da fração solúvel das proteínas, sendo que a metodologia mais utilizada tem sido a incubação com tampão borato-fosfato. Embora a identificação da solubilidade do nitrogênio não seja sinônimo de degradação da proteína bruta no rúmen, existe uma correlação positiva entre solubilidade do N e degradação.

O perfil de aminoácidos, após 18 horas de incubação ruminal, apresentou diferenças significativas em relação à composição apresentada pela leucena. Os aminoácidos de cadeia ramificada, fenilalanina, lisina, treonina e glicina apresentaram menor degradação em relação à média dos aminoácidos na leucena, após 18 horas de incubação ruminal (Tabela 1). Os AA ramificados, especialmente isoleucina, demonstraram maior resistência à degradação ruminal, na leucena. Alguns autores relatam que aminoácidos ramificados, geralmente, apresentam menor degradação em relação à média dos demais aminoácidos que compõem a porção protéica dos alimentos.

Pelo fato de não existir ainda um consenso na literatura em relação às variações apresentadas pelo perfil de aminoácidos na proteína não degradada no rúmen, o efeito da exposição ruminal dos aminoácidos tem sido constantemente estudado. As variações apresentadas no perfil de aminoácidos e nas suas degradações têm sido atribuídas à composição particular de cada alimento (Rulquin et al., 1998).

Vários autores sugerem lisina e metionina são aminoácidos limitantes para ruminantes arraçados com dietas à base de forragem. Observou-se que metionina não diferiu, mas tendeu a diminuir sua concentração em relação ao material original. Já a lisina, aminoácido limitante (NRC 2001), diferiu ($P < 0,05$) em suas concentrações entre os resíduos de incubação ruminal, na leucena.

A incubação "in vitro" para estimar a digestibilidade intestinal apresentou efeito significativo sobre o perfil de aminoácidos não degradados no rúmen e digeridos no intestino em relação à leucena. Para a leucena, os aminoácidos, fenilalanina, leucina, lisina, treonina, glicina e serina

apresentaram digestão intestinal menor em relação à média dos demais aminoácidos, além de apresentarem maior concentração no resíduo (Tabela 1).

É importante ressaltar que, no presente estudo, notou-se que a degradação ruminal influenciou o fornecimento de aminoácidos absorvíveis específicos mais do que a digestão pós-ruminal.

CONCLUSÕES

O uso do perfil de aminoácidos do alimento original para predizer os aminoácidos essenciais disponíveis para absorção apresentou acurácia apenas para o rami, não apresentando uma predição realística para a leucena, pois o perfil de AA da proteína sobrepassante foi diferente daquela do alimento original.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CALSAMIGLIA, S., STERN, M. D. A three-step in vitro procedure for estimating intestinal digestion of protein ruminates. *J. Anim. Sci.*, v.78, n.9, p.1999-2007, 1995.
2. LICITRA, G., HERNANDEZ, T.M.; VAN SOEST, P.J. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Techn.*, v.57, n.4, p.347-358, 1996.
3. NRC. Nutrient requirement of dairy cattle. 7º ed. Washington: National Reserch Council, 2001. 356p.
4. RULQUIN, H., GUINARD, J., VERITE, R. Variation of amino acid content in the small intestine digesta of cattle: development of a prediction model. *Livest. Prod. Sci.*, v.53, n.1, p.1-13, 1998.
5. STATISTICAL ANALYSES SYSTEMS INSTITUTE - SAS. *Users Guide* (version 6.03 Ed.). SAS inst. Inc., v.1, 1985. 956p.
6. TEDESCHI, L. O., A. N. PELL, D. G. FOX, et al. The amino acid profiles of the whole plant and of four plant residues from temperate and tropical forages. *J. Anim. Sci.*, v.79, n.2, p.525-32, 2001.

41ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia

19 de Julho a 22 de Julho de 2004 - Campo Grande, MS

Tabela 1 - Composição de aminoácido (g / 100 g PB) da leucena e de seus resíduos obtidos em incubação com TBF, após 18 horas de incubação ruminal, FDA e resíduos da digestão intestinal.

Aminoácido	Resíduos				
	Leucena	TBF	18 h	PIDA	Dig intestinal
AAE ²	44,45 c	46,28 bc	51,86 ab	56,49 a	50,89 abc
Arg	6,37 a	4,9 a	7,75 a	6,91 a	7,86 a
Fen	5,52 c	5,43 c	6,24 b	7,67 a	6,54 b
His	2,38 b	2,47 b	2,91 b	6,39 a	2,98 b
Iso	4,48 b	4,64 b	5,48 a	5,63 a	5,04 ab
Leu	8,02 b	8,1 b	9,27 a	9,72 a	9,29 a
Lis	5,89 b	5,37 c	7,01 a	5,63 bc	6,74 a
Met	2,09 c	5,51 a	1,83 c	3,8 b	1,69 c
Tre	4,13 b	4,1 b	4,62 a	4,6 a	4,72 a
Val	5,58 b	5,76 b	6,76 a	6,14 ab	6,03 b
AANE	43,28 ab	39,87 b	45,77 a	43,47 ab	45,98 a
Ala	5,25 a	4,79 a	6,3 a	4,34 a	6,1 a
Asp	8,21 ab	8,04 ab	8,79 a	7,16 b	8,73 a
Cis	0,45 a	0,83 a	0,43 a	0,77 a	0,33 a
Gli	4,99 b	4,65 b	5,79 a	4,86 b	5,77a
Glu	11,73 a	9,55 a	10,49 a	9,21 a	10,58 a
Pro	4,93 b	4,82 b	5,41 b	7,16 a	5,52 b
Ser	4,05 cd	3,9 d	4,39 bc	5,63 a	4,78 b
Tir	3,67 ab	3,29 b	4,18 a	4,35 a	4,17 ab
AAT	87,72 b	86,14 b	97,64 a	99,97 a	96,87 a

¹ Médias com letras diferentes na mesma linha diferem (P<0,05) pelo teste de Tukey;² Aminoácidos essenciais (AAE); Arginina (Arg); Fenilalanina (Fen); Histidina (His); Isoleucina (Iso); Leucina (Leu); Lisina (Lis); Metionina (Met); Treonina (Tre); Valina (Val); Aminoácidos não-essenciais (AANE); Alanina (Ala); Asparagina (Asp); Cistina (Cis); Glicina (Gli); Glutamina (Glu); Prolina (Pro); Serina (Ser); Tirosina (Tir); Aminoácidos Totais (AAT).

41ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia

19 de Julho a 22 de Julho de 2004 - Campo Grande, MS

Tabela 2 - Composição de aminoácido (g 100 / g PB) do rami e de seus resíduos obtidos em incubação com TBF, após 18 horas de incubação ruminal, FDA e resíduos da digestão intestinal.

Aminoácido	Resíduos				
	Rami	TBF	18 h	PIDA	Dig intestinal
AAE	48,06 a	51,89 a	46,68 a	17,67 b	50,10 a
Arg	6,73 a	6,48 a	6,58 a	2,83 b	6,58 a
Fen	5,46 a	6,5 a	5,44 a	0,35 b	6,07 a
His	3,12 a	3,38 a	2,78 a	2,3 a	3,07 a
Iso	4,95 a	5,88 aa	5,01 a	2,47 b	5,73 a
Leu	8,07 a	9,32 a	8,21 a	1,94 b	9,04 a
Lis	6,41 a	5,01 a	6,00 a	2,65 b	6,08 a
Met	2,66 ab	3,29 a	2,23 b	1,24 c	2,35 b
Tre	4,79 a	4,91 a	4,40 a	1,94 b	4,87 a
Val	5,89 a	7,12 a	6,03 a	1,94 b	6,43 a
AANE	47,11 ab	49,29 a	40,62 b	18,36 c	46,29 ab
Ala	5,69 b	7,26 a	5,91 b	0,35 c	6,56 ab
Asp	11,96 a	9,64 a	8,672 a	7,05 a	9,39 a
Cis	1,44 a	0,97 ab	0,48 bc	0,53 bc	0,36 c
Gli	5,48 ab	6,44 a	4,93 b	1,59 c	6,29 ab
Glu	10,50 a	11,41 a	9,00 a	2,29 b	11,56 a
Pro	4,68 a	5,48 a	4,54 a	2,83 b	5,38 a
Ser	4,31 a	4,67 a	4,1 a	1,59 b	4,53 a
Tir	3,06 a	3,42 a	2,98 a	2,12 a	2,21 a
AAT	95,17 a	101,18 a	87,29 a	36,02 b	96,40 a

¹ Médias com letras diferentes na mesma linha diferem ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey;² Aminoácidos essenciais (AAE); Arginina (Arg); Fenilalanina (Fen); Histidina (His); Isoleucina (Iso); Leucina (Leu); Lisina (Lis); Metionina (Met); Treonina (Tre); Valina (Val); Aminoácidos não-essenciais (AANE); Alanina (Ala); Asparagina (Asp); Cistina (Cis); Glicina (Gli); Glutamina (Glu); Prolina (Pro); Serina (Ser); Tirosina (Tir); Aminoácidos Totais (AAT).