

AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO PROTÉICA E AMINOACÍDICA DE FORRAGEIRAS TROPICAIS

Lídia Ferreira Miranda

*Zootecnista DSc., Insumos e Tecnologia Florestal / ITEFLOR, Rodovia MG 164, KM 156, Bom Despacho –
MG. Cep: 35600-000 email: lfmiranda@yahoo.com.br*

Elzania Sales Pereira

*Professora Adjunta, Universidade Federal do Ceara / UFC, Av. Mister Hill, s/n, Campus Universitário - PICI,
Fortaleza – CE. Cep: 60325-640 email: elzania@ufc.br*

Norberto Mario Rodriguez

*Professor Titular, Universidade Federal de Minas Gerais / UFMG, Campus Universitário, Caixa Postal 567,
Belo Horizonte – MG. Cep: 30123-970*

Miguel Marques Gontijo Neto

*Pesquisador DSc., Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária / EMBRAPA, Rodovia MG 424, KM 65, Sete
Lagoas – MG. Cep: 35700-000*

Alex Martins Varela de Arruda

*Professor Adjunto, Universidade Federal Rural do Semi-Árido / UFERSA, BR 110, KM 47, Pres. Costa e Silva,
Mossoró – RN. Cep: 59625-900*

Resumo - Objetivou-se neste estudo determinar a composição da proteína bruta e dos aminoácidos na mandioca (*Manihot esculenta*), rami (*Boehmeria nivea*), guandu (*Cajanus cajan*), leucena (*Leucaena leucocephala*) e soja perene (*Neonotonia wightii*). Os aminoácidos foram analisados por cromatografia líquida de alto desempenho (CLAD) após hidrólise ácida ou pré-oxidação. Os maiores e menores níveis de proteína bruta solúvel (fração A) foram obtidos com leucena e guandu (33,92 e 16,87%, respectivamente) e maiores e menores teores de proteína insolúvel em detergente neutro (PIDA) foram obtidos com guandu e rami (26,68 e 2,83%). Registrou-se maior concentração de aminoácidos essenciais no rami (48,06%) e menor na mandioca (42,20%), sendo verificado entre estes aminoácidos um maior nível de lisina e metionina para o rami (6,41 e 2,66%, respectivamente) e menores para a mandioca (5,49%) e para o guandu (2,02%) respectivamente. Registrou-se também maior concentração de aminoácidos não-essenciais para rami (47,11%) e menor para soja perene (42,40%). Portanto, para correta avaliação desses alimentos, deve-se considerar a composição de aminoácidos e as respectivas frações protéicas, uma vez que a simples análise de proteína bruta do alimento não reflete fidedignamente ou permite estimativa correta da disponibilidade de aminoácidos no intestino delgado dos animais e seu metabolismo.

Palavras-chave: alimentos fibrosos, análise de aminoácidos, nutrição de ruminantes.

EVALUATION OF PROTEIC AND AMINOACIDIC COMPOSITION IN THE TROPICAL FORAGES

Abstract - Objectified in this study to determine the composition of crude protein (CP) and amino acids (AA) in the perennial soy (*Neonotonia wightii*), leucaena (*Leucaena leucocephala*) and guandu (*Cajanus cajan*). The samples were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) after the acid hydrolyses or pre-oxidation. The higher and lower levels of soluble crude protein (A fraction) were obtained with leucaena and guandu (33.92 and 16.87%, respectively) and the higher and lower levels of acid detergent insoluble protein (ADIP) were obtained with guandu and rami (26.68 e 2.83%). It were registered higher concentration of essential amino acids in rami (48.06%) and lower concentration in cassava (42.20%), being verified with it the higher level in lysine and methionine to the rami (6.41 e 2.66%, respectively), and lower level to the cassava (5.49%) and to the guandu (2.02%) respectively. It were registered too higher concentration of non-essential amino acids to the rami (47.11%) and the lower level to the perennial soy (42.20%). Therefore, it can be concluded to the correct evaluation of these foods, should be considered the amino acid composition and fractionation of the crude protein, because the simply analysis of crude protein don't represent precisely and don't propitiate the correct estimative of the profile and biodisponibility of amino acids that them escape and flow to the intestinal tract of the animal and your metabolism.

Keywords: amino acid analysis, fiber food, ruminant nutrition.

INTRODUÇÃO

A proteína microbiana sintetizada no rúmen fornece 50% ou mais dos aminoácidos disponíveis para a absorção, em rações balanceadas, sendo considerada uma fonte de aminoácidos de alta qualidade (SCHWAB, 1996) e as diferentes porções das frações protéicas digestíveis que escapam à degradação ruminal constituem o total de aminoácidos que chegam ao intestino delgado. No entanto, o perfil de aminoácidos que chega ao intestino delgado para ser absorvido e disponibilizado ao metabolismo dos animais ruminantes, depende da composição e subsequente digestibilidade da proteína e suas frações. A quantidade e a disponibilidade dos aminoácidos limitantes na proteína não-degradada no rúmen desempenham um importante papel de suprir a exigência de aminoácidos dos animais de alta produção (SCHWAB et al., 1992). A razão entre aminoácidos essenciais e não-essenciais ganha importância na porção protéica que escapa à degradação ruminal, uma vez que o perfil de aminoácidos da proteína solúvel é transformado naquele verificado na proteína microbiana. Através da manipulação, por alguma forma de tratamento físico-químico das fontes protéicas ou pelo fornecimento de fontes protéicas que variem no grau de degradação, pode-se obter maior aporte de aminoácidos para o intestino delgado (BRODERICK, 1994; VAN SOEST, 1994). A degradação da proteína bruta tem sido usada para prever a degradação dos aminoácidos individuais e o seu suprimento para o duodeno (RULQUIN & VERITE, 1993; SKIBA et al., 1996). Isso significa que a degradação da proteína bruta é uma estimativa apropriada para prever a degradabilidade dos aminoácidos individuais e, portanto, do suprimento de aminoácidos no intestino delgado. Entretanto, existe um certo grau de variabilidade na degradação dos aminoácidos totais em relação ao da proteína bruta e entre aminoácidos individuais, ou seja, os aminoácidos disponíveis para absorção no intestino são derivados da proteína dietética que escapa à degradação ruminal, da proteína microbiana sintetizada no rúmen e da proteína endógena (O'CONNOR et al., 1993; SUSMEL et al., 1989; BOILA E INGALLS, 1995; SKORKO-SAJKO et al., 1994; COZZI et al., 1995; DAKOWSKI et al., 1996; FERNANDES, 2001).

Portanto, o presente estudo foi desenvolvido para avaliar a composição protéica de leguminosas tropicais, determinando-se os teores de proteína bruta e aminoácidos totais de mandioca

(*Manihot esculenta*), de rami (*Boehmeria nivea*), de guandu (*Cajanus cajan*), de leucena (*Leucaena leucocephala*) e de soja perene (*Neonotonia wightii*).

MATERIAL E MÉTODOS

As análises químico-bromatológicas das forrageiras tropicais selecionadas para o presente estudo foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, amostrando-se doze repetições de cada alimento, folhas desidratadas de mandioca (*Manihot esculenta*), de rami (*Boehmeria nivea*), de guandu (*Cajanus cajan*), de leucena (*Leucaena leucocephala*) e de soja perene (*Neonotonia wightii*). Os alimentos foram analisados para matéria seca (MS) e proteína bruta (PB), seguindo os procedimentos padrões (AOAC, 1995) e fibra em detergente neutro (FDN) e ácido (FDA), conforme Van Soest et al. (1991). A fração A (NNP) foi determinada pela diferença entre o nitrogênio total e o nitrogênio insolúvel em ácido tricloroacético, obtido através do tratamento de 500 mg da amostra, com 50 mL de água destilada, permanecendo por 30 minutos, e, posteriormente, adicionados 10 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 10 %, por 30 minutos (LICITRA et al., 1996). O resíduo remanescente foi filtrado em papel de filtro (Whatman, nº 54), lavado com 400 ml de água destilada, e o N residual determinado pelo método Kjeldahl, sendo armazenado para posterior determinação de aminoácidos. As amostras das forrageiras foram submetidas 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 (papel de filtro) e submetidas à evaporação em evaporador rotativo, e ultracentrifugados a 13.000 rpm por 3 minutos, posteriormente ultrafiltrados em membrana de teflon de 0,45 mm (LLAMES E FONTAINE, 1994).

Os aminoácidos sulfurados, metionina e cistina, foram analisados após oxidação com ácido perfórmico, para evitar degradação dos mesmos, durante o processo de hidrólise ácida, a qual foi realizada posteriormente, de forma que a metionina foi transformada em metionina sulfônica e a cistina em ácido cisteico (CUNNIFF, 1995). As análises foram realizadas por CLAD (Cromatografia Líquida de Alto Desempenho), modelo Shimadzu CL 10, seguindo a metodologia proposta por Ishida et al. (1981). O

sistema consistia em um gradiente binário de eluição, com coluna de troca-iônica tipo sódio, derivatização pós-coluna com o-fitalaldialdeído e hipoclorito de sódio, com detector de fluorescência com lâmpada de xênon. Os aminoácidos foram assim expressos como porcentagem da proteína bruta de cada resíduo das respectivas amostras das forrageiras tropicais.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A composição bromatológica da leucena (*Leucaena leucocephala*), soja perene (*Neonotonia wightii*), mandioca (*Manihot esculenta*), rami (*Boehmeria nivea*) e guandu (*Cajanus cajan*) encontra-se expressa na Tabela 1. Verifica-se considerável variação na fração

solúvel da proteína dos volumosos estudados, o que reforça a proposta de se utilizar, na alimentação dos ruminantes, o conceito mecanicista que procura evitar o emprego de entidades empíricas que estão geralmente associadas a predições errôneas e apresentam limitado espaço de inferência (FOX et al., 1992; RUSSELL et al., 1992; VAN SOEST, 1994). O denominado pensamento estático pode ser empregado quando se avalia os teores de PB entre os volumosos leucena (25,45%), soja perene (26,01%) e rami (27,58%), apenas sob a forma de valor absoluto. Nota-se que, embora semelhantes quanto ao teor de PB, apresentam-se diferentes sob o aspecto da proteína solúvel. Observa-se considerável variação no teor de proteína bruta e fibra em detergente neutro e ácido, e o guandu apresentou a menor e

Tabela 1. Composição nutricional dos alimentos expressos em base de matéria seca (%MS)

	Forrageiras Tropicais				
	Leucena	Soja perene	Mandioca	Rami	Guandu
(g / 100g MS)					
PB	25,45	26,01	37,63	27,58	19,98
FDN	37,06	50,06	43,74	26,18	58,22
FDA	12,47	23,79	21,84	15,74	33,97
(g /100 g PB)					
PB solúvel	33,92	26,93	27,01	33,69	16,87
PIDA	7,59	6,38	9,58	2,83	26,68
AA totais	87,72	87,23	87,50	95,17	92,20
AA essenciais	44,45	44,83	42,20	48,06	46,52
Arginina	6,37	5,98	7,19	6,73	5,71
Fenilalanina	5,52	5,25	4,54	5,46	5,53
Histidina	2,38	2,88	2,80	3,12	2,70
Isoleucina	4,48	4,54	4,50	4,95	5,06
Leucina	8,02	7,98	3,32	8,07	8,76
Lisina	5,89	6,36	5,49	6,41	5,86
Metionina	2,09	2,15	2,30	2,66	2,02
Treonina	4,13	4,25	3,47	4,79	4,63
Valina	5,58	5,44	8,58	5,89	6,26
AA não-essenciais	43,28	42,40	45,30	47,11	45,68
Alanina	5,25	5,44	4,65	5,69	5,96
Aspártico	8,21	9,11	11,71	11,96	9,43
Cistina	0,45	0,52	0,53	1,44	0,42
Glicina	4,99	5,06	4,08	5,48	5,28
Glutamina	11,73	10,57	11,72	5,48	10,21
Prolina	4,93	4,90	4,32	4,68	6,28
Serina	4,05	4,04	3,73	4,31	4,55
Tirosina	3,67	2,77	4,57	3,06	3,54

a maior concentração, respectivamente, em relação às forrageiras estudadas. A proteína bruta solúvel variou de 16,87% no guandu a 33,92% da PB na leucena, e o PIDA variou de 2,83 a 26,68% da PB para o rami e guandu, respectivamente. Portanto, aproximadamente 25% da proteína bruta do guandu não está disponível para o animal. Para a composição aminoacídica, pode-se ressaltar que a porcentagem de aminoácidos totais na proteína bruta variou de 87,23 para a soja perene a 95,17% para o rami. No entanto, para a leucena, soja perene e mandioca, o total de aminoácidos foi muito similar. As concentrações de lisina e metionina, entre as forrageiras estudadas, foram semelhantes, tendo como média 13,28 e 4,97% do total de aminoácidos essenciais, respectivamente. O NRC (2001) considera lisina e metionina como os dois aminoácidos essenciais limitantes, tanto para crescimento como para produção de leite, e descreve ainda que a maioria dos alimentos apresentam baixas concentrações de lisina e metionina, particularmente lisina, no total de aminoácidos essenciais. Os alimentos estudados destacaram-se na concentração dos referidos aminoácidos, pois apresentam concentrações 13,75 e 22,45% superiores à média apresentada para as concentrações de lisina e metionina (expressos em porcentagem do total de aminoácidos essenciais) das leguminosas e gramíneas, descritas no NRC (2001). As concentrações dos aminoácidos totais maior para rami e menor na soja perene, porém muito próxima na leucena e mandioca (95,17; 87,23; 87,72 e 87,50 g/100 g PB, respectivamente), permite inferir que a leucina foi o aminoácido essencial de maior concentração, com exceção para a mandioca, a qual apresentou uma concentração para a leucina de 40,45% menor em relação à média dos outros alimentos. O rami apresentou 14,35 e 22,31% a mais de lisina e metionina, respectivamente, comparativamente à mandioca e ao guandu, os quais apresentaram menores concentrações dos respectivos aminoácidos. De acordo com os relatos na literatura para os alimentos estudados, a degradação efetiva da proteína bruta deve ser menor em relação à degradação dos aminoácidos essenciais, não essenciais e individuais. A diferença entre a degradação efetiva dos aminoácidos totais e da PB apresenta variações, sendo maior para os aminoácidos totais da mandioca e soja perene e menor para o guandu. Assim, pode inferir que o uso da degradação da proteína bruta como uma estimativa da degradação dos aminoácidos poderá subestimar a degradabilidade e, portanto, superestimar a

proporção dos aminoácidos na PNDR que atingirá o intestino. No entanto, resultados contrários ao deste estudo foram obtidos por Skiba et al. (1996), que observaram degradação efetiva menor para o total de aminoácidos e degradações efetivas maiores para PB. Resultados de Skórko-Sajko et al. (1994) demonstraram valores similares para degradação de PB e de total de aminoácidos, sugerindo que diferenças podem ocorrer entre a degradação de PB e a do total de aminoácidos, bem como dos aminoácidos individuais.

Entre os aminoácidos essenciais, metionina e lisina, degradações muito próxima ou menor do que a dos aminoácidos totais tendem a um comportamento semelhante ao observado para os aminoácidos de cadeia ramificada como relatado por Skiba et al. (1996), os quais observaram que metionina e lisina, na maioria dos volumosos estudados, apresentaram degradação semelhante à degradação dos aminoácidos totais, especialmente para maiores tempos de incubação ruminal. No entanto, para a soja perene e mandioca, a metionina tende a ser o aminoácido de maior degradação, conforme relatado por Komprda e Standara (1992). A metionina foi considerada como aminoácido de maior resistência à degradação ruminal segundo Taminga (1979), embora Crooker et al. (1987) e Erasmus et al. (1994) sugeriram que a degradação seja dependente do fracionamento da proteína do alimento. Para leucena e guandu, a degradação efetiva da metionina foi menor quando comparada à degradação do total de aminoácidos, conforme observado por Weisbjerg et al. (1996), de modo que a menor degradação ruminal da metionina é uma informação importante para predizer a quantidade deste aminoácido disponível no intestino delgado dos ruminantes. As diferenças observadas entre as curvas de degradação da PB e dos aminoácidos e, entre aminoácidos, indicaram que a degradação dos aminoácidos não poderia ser estimada através da curva de degradação da PB, e que os aminoácidos não são degradados em uma mesma instância (FERNANDES, 2001). É interessante observar que as diferenças ocorrem, basicamente, durante as primeiras 24 horas de incubação ruminal e a tendência da alteração nas curvas de desaparecimento durante as primeiras 24 horas de incubação pode ser atribuída a fatores, como, ausência de mais pontos entre 24 e 48 horas ou superiores a este tempo e ao desaparecimento da maioria dos aminoácidos ao se aproximar da assíntota (VON KEYSERLINGK et al., 1998).

A degradação efetiva da lisina e metionina

Tabela 2. Composição aminoacídica da fração solúvel (A) da proteína bruta dos alimentos

(g/100g PB)	Forrageiras Tropicais				
	Leucena	Soja Perene	Guandu	Mandioca	Rami
AAE	56,68	43,38	37,82	48,23	56,98
Arginina	59,41	45,17	29,25	51,52	61,217
Fenilalanina	61,14	45,16	38,66	45,75	51,912
Histidina	61,39	37,79	38,56	63,85	58,657
Isoleucina	54,16	40,05	41,13	49,79	53,730
Leucina	57,94	42,56	40,95	13,46	51,732
Lisina	58,52	46,46	38,93	46,18	67,858
Metionina	39,64	49,02	37,84	76,88	59,903
Treonina	59,18	45,71	37,88	48,08	57,004
Valina	56,38	38,51	37,17	65,50	50,814
AAE	58,74	39,41	35,01	46,35	54,932
Alanina	54,80	35,87	29,38	16,70	55,591
Aspártico	56,71	42,77	39,22	53,73	63,782
Cistina	48,60	46,48	20,50	76,38	58,643
Glicina	53,77	40,40	33,72	37,83	52,639
Glutamina	60,57	40,65	31,65	54,22	48,713
Prolina	58,42	41,53	44,87	49,68	56,896
Serina	61,32	44,01	45,23	56,77	56,129
Tirosina	56,85	23,55	35,55	58,86	47,062

são de especial interesse, pois esses aminoácidos são considerados limitantes em certos estágios fisiológicos (RULQUIN *et al.*, 1993). De acordo com a literatura, a degradação efetiva da lisina tende a ser semelhante à degradação dos aminoácidos totais para leucena e mandioca, sendo que para a soja perene, rami e guandu a lisina tende a ser o aminoácido essencial de maior degradação. Para a leucena o comportamento de menor degradação para certos aminoácidos pode ser explicado em virtude da solubilidade viscosa quando polipeptídeos hidrofóbicos são umedecidos pelo fluido ruminal, reduzindo o desaparecimento da PB, porém, permitindo degradação seletiva de alguns aminoácidos pelos microrganismos

do rúmen (COZZI *et al.*, 1994). Para a mandioca a metionina e a cistina tendem a ser os aminoácidos de maior degradação, e a leucina, o de menor degradação. No entanto, conforme diversos relatos científicos, para leucena, soja perene, rami e guandu, a isoleucina, leucina e valina apresentam degradação muito próxima ou menor do que a dos aminoácidos totais, demonstrando que os aminoácidos de cadeia ramificada parecem ser mais resistentes à degradação ruminal (SUSMEL *et al.*, 1989; ERASMUS *et al.*, 1994; HARSTAD & PRESTLOKKEN, 2000). Com relação ao lag time, é importante observar que a degradação efetiva da proteína é dependente não apenas da cinética da degradação das partículas

protéicas no rúmen, mas também do tempo de retenção (ORSKOV E MCDONALD, 1979). No entanto, a interpretação deve ser ampliada para suplantar os resultados dos alimentos que apresentam fase lag antes do início da degradação da fração potencialmente degradável no rumen (McDONALD, 1981).

Entre os alimentos estudados, ressalta-se que as leguminosas normalmente apresentam valores consideravelmente elevados de lag time. Ao verificar os valores médios da fração solúvel (A) da proteína bruta das forrageiras tropicais na Tabela 2, as observações supra-citadas tornam-se extremamente coerentes, especialmente em relação aos estudos de Von Keyserlingk et al. (1998) e Fernandes (2001), que correlacionaram o material original e o resíduo após 12 horas de incubação ruminal, e observaram baixa relação entre as variáveis avaliadas para a maioria dos aminoácidos essenciais em gramíneas tropicais. O desaparecimento do material, durante as primeiras 18 horas de incubação, ocorreu, provavelmente, em função da solubilização dos aminoácidos individuais das ligações peptídicas ou pela solubilização de aminoácidos livres. Embora a quantidade de proteína associada à fração fibrosa seja baixa, a atividade das proteases nas ligações entre os aminoácidos da proteína e nos peptídeos que estão contidos na fibra, precisa ser precedida pela digestão da fração fibrosa. Portanto, como a extensão da degradação celulolítica pode variar, diferentes proteínas podem ser liberadas em diferentes taxas, influenciando o desaparecimento de aminoácidos.

Desta maneira, o conhecimento da composição protéica e aminoácida das forrageiras tropicais demonstram sua importância para precisa e acurada avaliação da degradação ruminal, a digestão da proteína bruta (PB), disponibilidade de aminoácidos essenciais (AAE) e de aminoácidos não essenciais (AANE), confirmando que existem diferenças entre os diversos tipos de alimentos volumosos, com atenção especial quando da elaboração de programas de alimentação com proporções significativas nas dietas, pois, podem levar a perdas significativas destes compostos nitrogenados no rúmen, tornando necessária a inclusão de fontes energéticas de rápida degradação como os carboidratos solúveis, evidentemente, a partir do conhecimento das taxas de degradação e sincronização entre estas fontes, possivelmente utilizando estratégias nutricionais que abordem a suplementação dietética com fontes de alto escape ruminal.

CONCLUSÃO

A análise de aminoácidos dos alimentos deve se tornar rotina laboratorial, já que constituem análises de excelente custo-benefício, permitem estabelecer parâmetros mecanicistas precisos para avaliação de alimentos, elaboração de programas de alimentação e aspectos decisórios em estratégias nutricionais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. 1990. **Official methods of analysis**. 15.ed., Virginia: Arlington. 1117p.

BOILA, R. J., INGALLS, J. R. Prediction of rumen undegradable amino acids that are digested post-ruminally. **Can. J. Anim. Sci.**, v.75, n.4, p.583-592, 1995.

BRODERICK, G.A. Quantifying forage protein quality. Chap. V. In: FAHEY JR., G.C. (Ed.) **Forage quality, evaluation and utilization**. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, 1994, p.200-228.

COZZI, G., I. ANDRIGHETTO, P. BERZAGHI, et al. In situ ruminal disappearance of essential amino acids in protein feedstuffs. **J. Dairy Sci.**, v.78, n.1, p.161-71, 1995.

CROOKER, B.A., CLARK, J.H., SHANKS, R.D., et al. Effects of ruminal exposure on the amino acid profile of feeds. **Can. J. Anim. Sci.**, v.67, n.4, p.1143-1148, 1987.

CUNNIFF, P. **Official methods of analysis of AOAC International**. 16^o ed., Arlington: AOAC International, supp. 1, 1995.

DAKOWSKI, P., M. R. WEISBJERG, T. HVELPLUND The effect of temperature during processing of rape seed meal on amino acid degradation in the rumen and digestion in the intestine. **Anim. Feed Sci. Technol.**, v.58, n.3-4, p.213-226, 1996.

ERASMUS, L. J., P. M. BOTHA, C. W. CRUY-WAGEN, et al. Amino acid profile and intestinal digestibility in dairy cows of rumen-undegradable protein from various feedstuffs. **J. Dairy Sci.**, v.77, n.2, p.541-51, 1994.

- FERNANDES, P.C.C. **Modelagem da digestão da proteína e aminoácidos de alguns alimentos concentrados em ruminantes.** Belo Horizonte: UFMG, Escola de Veterinária, 2001. 95p. Tese (Doutorado em Ciência Animal).
- FOX, D.G., SNIFFEN, C.J., O'CONNOR, J.D., RUSSELL, J.B., VAN SOEST, P.J. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets III. Cattle requirements and diet adequacy. **J. Anim. Sci.**, v.70, n.12, p.3578-3596, 1992.
- HARSTAD, O. M., E. PRESTLOKKEN Effective rumen degradability and intestinal indigestibility of individual amino acids in solvent-extracted soybean meal (SBM) and xylose-treated SBM (SoyPass) determined in situ. **Anim. Feed Sci. Technol.**, v.83, n.1, p.31-47, 2000.
- ISHIDA, Y., FUJITA, T., ASAI, K. New detection and separation method for amino acids by high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, v.204, s.n., p.143-148, 1981.
- KOMPRDA, T., S. STANDARA Degradability of amino acids of lucerne hay in the rumen of cattle. **Zivoc. Vyr.**, v.37, n.9, p.727-734, 1992.
- LICITRA, G., HERNANDEZ, T.M.; VAN SOEST, P.J. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. **Anim. Feed Sci. Technol.**, v.57, p.347-358, 1996.
- LLAMES, T. R., FONTAINE, J. Determination of amino acids in feeds: Collaborative study. **J. AOAC International**, v.77, n.6, 1994.
- MCDONALD, I. A revised model for the estimation of protein degradability in the rumen. **J. Agric. Sci.**, v.96, p.251-252, 1981.
- NRC - **Nutrient requirements of dairy cattle.** 7^o ed. Washington: National Reserch Council, 2001. 356p.
- O'CONNOR, J.D., SNIFFEN, C.J., FOX, D.G., CHALUPA, W. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: IV. Predicting amino acid adequacy. **J. Anim. Sci.**, v.71, n.5, p.1298-1311, 1993.
- ORSKOV, E.R., McDONALD, I. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. **J. Agric. Sci.**, v.92, n.2, p.499-503, 1979.
- RULQUIN, H., VÉRITÉ, R., et al. Milk production and composition as a function of post-ruminal lysine and methionine supply: A nutrient-response approach. **Livest. Prod. Sci.**, v.37, n.1-2, p.69-90, 1993.
- RUSSELL, J.B., O'CONNOR, J.D., FOX, D.G., VAN SOEST, P.J., SNIFFEN, C.J. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminant fermentation. **J. Anim. Sci.**, v.70, n.12, p.3551-3561, 1992.
- SCHWAB, C. G., BOZAK, C. K., WHITEHOUSE, N. L., OLSON, V.M. Amino acid limitation and flow to the duodenum at four stages of lactation. II. Extent of lysine limitation. **J. Dairy Sci.**, v.75, n.9, p.3503-3512, 1992.
- SCHWAB, C.G. Rumen-protected amino acids for dairy cattle: progress towards determining lysine and methionine requirements. **Anim. Feed Sci. Technol.**, v.59, n.1-3, p.87-101, 1996.
- SKIBA, B., WEISBJERG, M. R. HVELPLUND, T. Rumen and total intestinal tract digestibility of protein and amino acids from different roughages, determined in situ. **J. Anim. Feed Sci.**, v.65, n.5, p.347-363, 1996.
- SKÓRKÓ-SAJKO, H., HVELPLUND, T., WEISBJERG, M. R. Rumen degradation and intestinal digestibility of amino acids in different roughages estimated by nylon bag techniques. **J. Anim. Feed Sci.**, v., n.3, p1-10, 1994.
- SUSMEL, P., B. STEFANON, C. R. MILLS, et al. Change in amino acid composition of different protein sources after rumen incubation. **Anim. Prod.**, v.49, p.375-383, 1989.
- TAMMINGA, S. Protein degradation in the fore-stomachs of ruminants. **J. Anim. Sci.**, v.49, n.2, p.375-384, 1979.
- VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant.** 2 ed. Ithaca: Cornell University Press. 1994. 476p.
- VAN SOEST, P.J., ROBERTSON, J.B., LEWIS, B.A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **J. Dairy Sci.**, v.74, n.10, p.3583-3597, 1991.
- VON KEYSERLINGK, M. A., J. A. SHELFORD, R. PUCHALA, et al. In situ disappearance of amino acids from grass silages in the rumen and intestine of cattle. **J. Dairy Sci.**, v.81, n.1, p.140-149, 1998.
- WEISBJERG, M. R., T. HVELPLUND, S. HELLBERG, et al. Effective rumen degradability and intestinal digestibility of individual amino acids in different concentrates determined in situ. **Anim. Feed Sci. Technol.**, v.62, n.2-4, p.179-188, 1996.