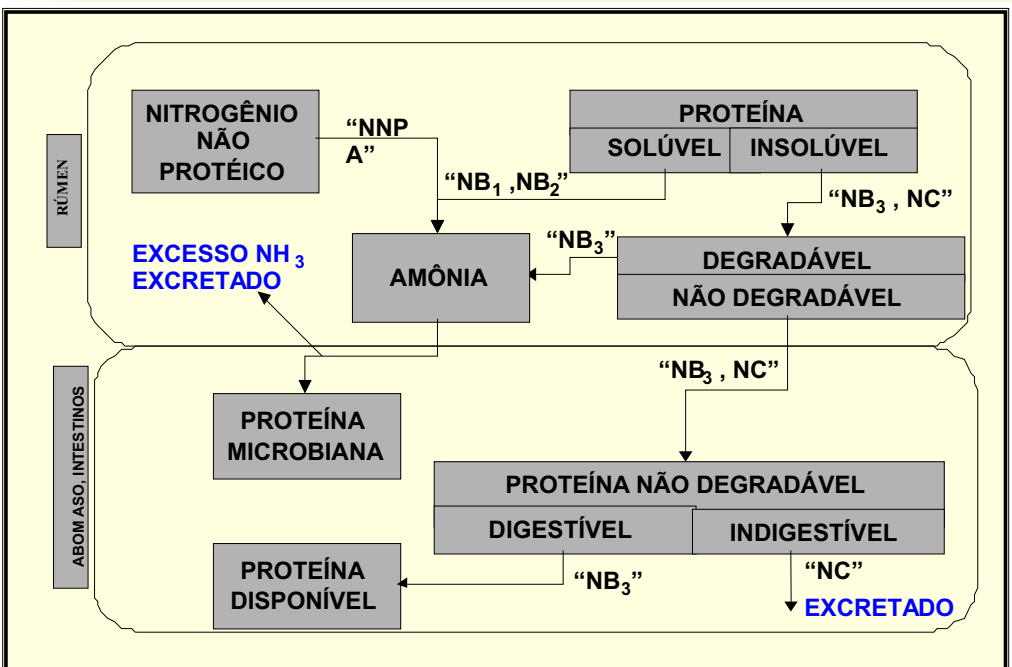


Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 4

ISSN 1981-2078
Dezembro, 2006

Avaliação e aplicação de métodos de análise para o fracionamento do nitrogênio em amostras de alimentos para animais



Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 4

Avaliação e aplicação de métodos de análise para o fracionamento do nitrogênio em amostras de alimentos para animais

Gilberto Batista de Souza
Ana Rita de Araujo Nogueira
Luiz Alberto Rocha Batista

Embrapa Pecuária Sudeste

Rod. Washington Luiz, km 234

Caixa Postal 339

Fone: (16) 3361-5611

Fax: (16) 3361-5754

Home page: www.cppse.embrapa.br

E-mail: sac@cppse.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Alberto C. de Campos Bernardi

Secretário-Executivo: Edison Beno Pott

Membros: Carlos Eduardo da Silva Santos, Maria Cristina C.

Brito, Odo Primavesi, Sônia Borges de Alencar

Revisor de texto: Edison Beno Pott

Normalização bibliográfica: Sônia Borges de Alencar

Fotos da capa: Gilberto Batista de Souza

Editoração eletrônica: Maria Cristina Campanelli Brito

1ª edição on-line (2006)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação - CIP Embrapa Pecuária Sudeste

Gilberto Batista de Souza

Avaliação e aplicação de métodos de análise para o fracionamento do nitrogênio em amostras de alimentos para animais / Gilberto Batista de Souza, Ana Rita de Araujo Nogueira, Luiz Alberto Rocha Batista. — São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2006.

26 p. ; 21 cm.— (Embrapa Pecuária Sudeste. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 4).

ISSN: 1981-2078

1. Nutrição animal 2. Análise de alimento 3. Nitrogênio. I. Souza, G.B. de. II. Nogueira, A.R. de. III. Batista, L.A.R. IV. Título. V. Série.

CDD 636.085

© Embrapa 2006

Sumário

Introdução	9
Materiais e Métodos	15
Resultados e Discussão	20
Conclusão	24
Referências Bibliográficas	25

Avaliação e aplicação de métodos de análise para o fracionamento do nitrogênio em amostras de alimentos para animais

Gilberto Batista de Souza¹

Ana Rita de Araujo Nogueira²

Luiz Alberto Rocha Batista³

Resumo

A quantificação dos nutrientes presentes nos alimentos para bovinos proporciona melhor conhecimento do seu valor nutritivo. Isso possibilita adequar as dietas, tornando-as mais eficientes, e racionalizar a utilização dos recursos nos sistemas de produção. Neste enfoque, é proposto um procedimento simplificado para a extração e a quantificação das frações nitrogenadas em amostras de forrageiras e de alimentos concentrados para ruminantes, para uso no "Sistema de Proteínas e Carboidratos de Cornell", que leva em conta a disponibilidade nutricional e a taxa de degradação ruminal dos nutrientes. As frações são classificadas em nitrogênio não-protéico (NNP), nitrogênio protéico (NB₁, NB₂ e NB₃) e nitrogênio indisponível (NC). A fração NNP é determinada pela diferença entre o nitrogênio total e o nitrogênio insolúvel em

¹ Químico, Ms., Embrapa Pecuária Sudeste, Rod. Washington Luiz, km 234, CEP 13560-970, São Carlos, SP. Endereço eletrônico: <gilberto@cnpse.embrapa.br>.

² Química, Dra., Pesquisadora da Embrapa Pecuária Sudeste, Rod. Washington Luiz, km 234, CEP 13560-970, São Carlos, SP. Endereço eletrônico: <anarita@cnpse.embrapa.br>.

³ Eng. Agr., Dr., Pesquisador da Embrapa Pecuária Sudeste, Rod. Washington Luiz, km 234, CEP 13560-970, São Carlos, SP. Endereço eletrônico: <lbatisa@cnpse.embrapa.br>.

ácido tricloroacético a 10% (m/v). A fração NB_1 é determinada pela diferença entre o nitrogênio solúvel em tampão de borato-fosfato (TBF) com pH 6,8 e o nitrogênio não-protéico. As proteínas da fração NB_2 foram determinadas pela diferença entre o nitrogênio residual, insolúvel em TBF e o nitrogênio insolúvel em solução detergente neutra (N_{IDN}). Por meio da diferença entre o N_{IDN} e o nitrogênio insolúvel em detergente ácido (N_{IDA}), foi determinada a fração NB_3 , de degradação lenta. Finalmente, a fração indisponível (NC) foi determinada considerando-se a porcentagem de N_{IDA} em relação ao teor total de nitrogênio. As análises foram utilizadas para a caracterização de duas espécies de gramíneas, *Brachiaria decumbens* cv. Basilisk e *Panicum maximum* cv. Tanzânia 1, em três épocas de corte e em cinco níveis de adubação nitrogenada. Os resultados indicaram correlação positiva entre as frações que apresentam maior taxa de degradação ruminal (NNP , NB_1 e NB_2) e a digestibilidade *in vitro*, e entre as frações com menor velocidade de degradação e indisponíveis nutricionalmente (NB_3 e NC, respectivamente) e os componentes da parede celular (FDN, FDA, lignina e celulose).

Evaluation and application of methods of analyses for nitrogen fractionation in feed samples for ruminants

Abstract

Quantification of nutrients allows better knowledge of the nutritional value of cattle feedstuffs. So, it is possible to adjust more efficient diets and to rationalize the use of resources in production systems. Therefore, simplified procedures for extraction and quantification of nitrogen fractions in samples of forages and concentrates used for ruminants feeding are proposed, for application in the Cornell Net Carbohydrate and Protein System, which is based on nutritional availability and rate of ruminal degradation of nutrients. Nitrogen fractions are classified as nonprotein nitrogen (NPN), true protein (NB₁, NB₂ and NB₃) and unavailable nitrogen (NC). Fraction NPN is determined by difference between total nitrogen and nitrogen insoluble in 10% (m/v) trichloroacetic acid. Fraction NB₁ is determined by difference between nitrogen soluble in borate-phosphate buffer (BPB) at pH 6.8 and NPN fraction. The difference between residual nitrogen insoluble in BPB and

nitrogen insoluble in neutral detergent (N_{IND}) represents proteins of the NB_2 fraction. The NB_3 slow degradation fraction is determined by difference between N_{IDN} and acid detergent insoluble nitrogen (N_{IAD}). Finally, unavailable nitrogen (fraction NC) is determined considering the N_{IAD} concentration related to total nitrogen. Analyses were used for characterization of two species of grasses, *Brachiaria decumbens* cv. Basilisk and *Panicum maximum* cv. Tanzânia 1, in three cutting intervals and five levels of nitrogen fertilization. Results indicated a positive correlation among fractions that present greater rate of rumen degradation (NNP , NB_1 e NB_2) and *in vitro* dry matter digestibility, and among fractions slowly degradable and nutritionally unavailable (NB_3 and NC, respectively) and cell wall components (NDF, ADF, lignin and cellulose).

Introdução

A nutrição animal envolve reações químicas e processos fisiológicos que convertem os alimentos em produtos essenciais para manutenção, desenvolvimento e produção dos animais. Neste enfoque, a quantificação dos nutrientes presentes nos alimentos para bovinos proporciona melhor conhecimento do seu valor nutritivo, o que possibilita tornar as dietas mais eficientes e racionalizar a utilização dos recursos nos sistemas de produção.

Para os animais ruminantes, energia e proteína são os principais fatores que limitam o desenvolvimento e a produtividade. Por isso, os alimentos fornecidos na dieta desses animais em sistemas de produção têm recebido maior atenção quanto ao conhecimento do valor nutritivo.

Em geral, as principais fontes de nutrientes na dieta de ruminantes são provenientes de rações concentradas, de silagens, de fenos e de pastos de gramíneas e/ou leguminosas. De acordo com o "Sistema de proteínas e carboidratos, de Cornell" (Sniffen *et al.*, 1992), os alimentos são constituídos de proteínas, de carboidratos, de gorduras, de cinzas e de água; as proteínas e os carboidratos são subdivididos de acordo com suas características químicas e físicas, e de acordo com a degradabilidade ruminal e a digestibilidade pós-ruminal (Sniffen *et al.*, 1992).

No presente trabalho propõe-se procedimentos simplificados para a extração e a quantificação das frações do nitrogênio total, com base nos métodos propostos por Licitra *et*

a/. (1995): nitrogênio não-protéico (NNP), nitrogênio protéico (NB_1 , NB_2 e NB_3) e nitrogênio indisponível (NC), em amostras de alimentos de origem vegetal, para avaliação e para balanceamento de dietas de bovinos pelo sistema de proteínas e de carboidratos de Cornell, que leva em conta a disponibilidade nutricional e a taxa de degradação ruminal dos nutrientes.

Definições, classificação e metabolismo das proteínas

As proteínas, macromoléculas formadas por centenas de aminoácidos unidos por ligações peptídicas, têm como função nobre, nos animais, a formação dos fluidos e dos tecidos (p. ex., sangue, leite, carne e lã). Elas podem ser de origem animal ou vegetal. As proteínas de origem animal apresentam maior valor biológico do que as de origem vegetal (van Soest, 1994). As proteínas podem ser divididas em duas grandes classes: proteínas simples, constituídas apenas por aminoácidos, e proteínas conjugadas, constituídas por aminoácidos (parte protéica) e por outras substâncias (parte não-protéica) ou por compostos orgânicos extremamente complexos e de natureza coloidal, formados fundamentalmente por carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio (Sgarbieri, 1996).

As proteínas das plantas são classificadas em dois grupos: proteínas de folhas e caules e proteínas de sementes. As proteínas de folhas e caules podem ser divididas em citoplasmáticas, cloroplásticas e nucleoproteínas; estas são essencialmente solúveis e estão presentes no conteúdo celular

das plantas. Outro grupo de proteínas de folhas e caules são as extensinas. São menos solúveis e estão associadas, por ligação covalente, com os polissacarídeos da parede celular das plantas; no entanto, elas são digestíveis (van Soest, 1994).

Para serem utilizadas pelos microrganismos do rúmen, é necessário que as macromoléculas de proteína sejam desdobradas em moléculas mais simples, p. ex., aminoácidos ou pequenos peptídeos. Esse processo de rompimento da molécula protéica é comumente chamado de proteólise e ocorre por ação de enzimas proteolíticas. De 20% a 60% da proteína verdadeira passa diretamente pelo rúmen, sem sofrer ataque microbiano (*bypass protein*); posteriormente, essa proteína é digerida no abomaso pela pepsina e no intestino delgado pela quimiotripsina e pela carboxipeptidase (van Soest, 1994). Entre 40% e 80% da fração correspondente à proteína verdadeira e o nitrogênio não-protéico são metabolizados no rúmen, principalmente pelas bactérias, que são os principais microrganismos proteolíticos, formando compostos nitrogenados simples (normalmente a amônia) e de cadeia carbônica (Figura 1). Esses compostos são os responsáveis pela síntese do corpo microbiano, formando a proteína microbiana, a qual possui alto valor biológico. A amônia não utilizada será absorvida pela parede do rúmen e direcionada pela corrente sanguínea ao fígado, onde será transformada em uréia, que poderá voltar para o rúmen através da saliva. A proteína *bypass* e a proteína microbiana serão digeridas por processos enzimáticos no abomaso e no intestino, sendo transformadas

em aminoácidos, os quais são absorvidos no intestino e transportados pela corrente circulatória.

O nitrogênio total (N_T) presente nas plantas apresenta-se sob as formas de proteína verdadeira (de 60% a 80% do N_T), de NNP e de uma pequena quantidade na forma de nitrogênio lignificado (van Soest, 1994).

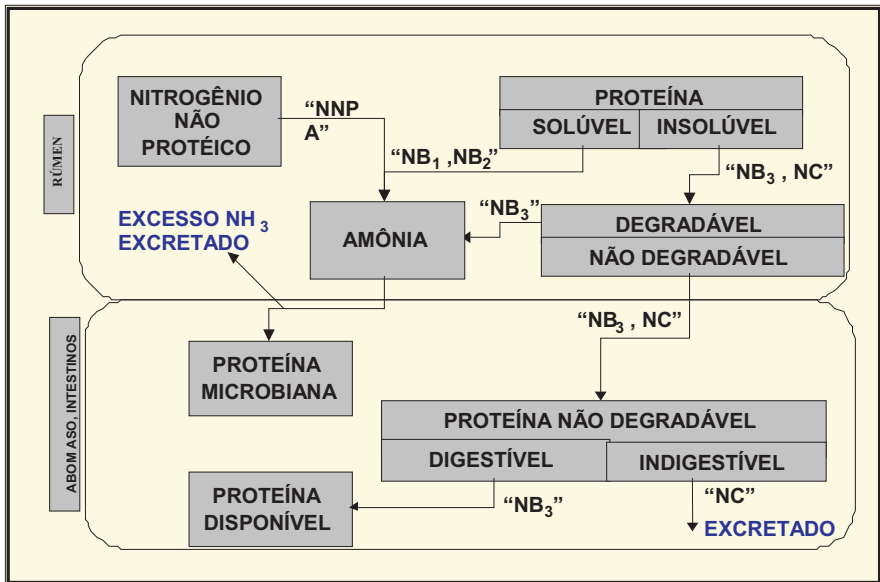


Figura 1. Percurso dos compostos nitrogenados no sistema digestivo dos ruminantes (Souza, 2003).

Fracionamento dos compostos nitrogenados dos alimentos

Procedimentos para avaliar a qualidade dos alimentos fornecidos na dieta de ruminantes são empregados há mais de 100 anos pela maioria dos laboratórios de nutrição animal. A determinação do nitrogênio total proposta por Kjeldahl em

1883 fundamenta-se na decomposição da matéria orgânica dos alimentos pelo ácido sulfúrico, na presença de sulfato de cobre como catalisador, a aproximadamente 400°C. O nitrogênio presente na solução ácida resultante é determinado mediante destilação por arraste a vapor, seguida de titulação com ácido diluído, previamente padronizado (AOAC, 1990). No entanto, as plantas contêm várias formas de constituintes nitrogenados, tais como ácidos nucleicos, nitrogênio não-protéico (nitrato, amônio, aminoácidos livres, etc.) e frações associadas com a lignina, que possuem características nutritivas diferentes. O teor de nitrogênio nas proteínas das plantas pode variar de 15% a 16% (van Soest, 1994). Em amostras de forrageiras e de outros alimentos, a proteína bruta (PB) é convencionalmente expressa com base nos resultados referentes ao nitrogênio total ($N_T \times 6,25$). Esse valor é aproximado e pode conter erros, pois, como já referido, as plantas possuem uma variedade de constituintes nitrogenados (ácidos nucleicos, nitrogênio não-protéico e frações associadas à lignina), que na análise de Kjeldahl são considerados como proteína.

Baseados na disponibilidade nutricional da proteína, Sniffen *et al.* (1992) propuseram a separação dos compostos nitrogenados em cinco frações. As metodologias empregadas para a separação das respectivas frações foram sugeridas por Krishnamoorthy *et al.* (1982) e Licitra *et al.* (1995). A fração do nitrogênio não-protéico é composta principalmente de amônio, peptídeos, aminoácidos e nitrato, substâncias que são solúveis no rúmen e rapidamente convertidas em amônia. Essa fração

pode, dessa forma, ser determinada pela diferença entre o N_T e o nitrogênio insolúvel em ácido tricloroacético a 10% (m/v).

A fração NB_1 , representada por proteínas solúveis, também rapidamente degradadas no rúmen, é composta de peptídeos e oligopeptídeos e pode ser determinada pela diferença entre o nitrogênio solúvel em tampão de borato-fosfato com pH 6,8 e o NNP. Pela diferença entre o nitrogênio insolúvel em tampão de borato-fosfato e o insolúvel em detergente neutro são determinadas as proteínas da fração NB_2 , que representam as proteínas com taxa intermediária de degradação ruminal.

As proteínas correspondentes à fração NB_3 compreendem as extensinas, que possuem taxas de degradação muito lenta e são pouco solúveis no rúmen, em função de sua associação com componentes da parede celular das plantas. São determinadas pela subtração entre o nitrogênio insolúvel em detergente neutro e o nitrogênio insolúvel em detergente ácido. Finalmente, as formas de nitrogênio indisponíveis, a fração NC, são determinadas com base nos teores de nitrogênio insolúvel em detergente ácido, fração que é composta pelas formas de nitrogênio associadas com lignina, taninos e compostos de Maillard (van Soest, 1994). Os componentes desta fração são resistentes ao ataque microbiano e enzimático; por isso, são totalmente insolúveis no trato gastrintestinal.

Materiais e Métodos

Métodos analíticos simplificados para o fracionamento do nitrogênio

1. Determinação do nitrogênio insolúvel em ácido tricloroacético

1.1. Extração do nitrogênio não-protéico:

- a) Solução a 10% (m/v) de ácido tricloroacético (TCA):
Dissolver 100 g de ácido tricloroacético em 1000 mL de água destilada e deionizada (armazenar em refrigerador).
- b) Pesar 200 mg (\pm 0,1 mg) de amostra seca e moída e transferir para tubo de polipropileno, adicionar 20 mL de água, homogeneizar e deixar em repouso por 30 min. Após esse período, adicionar 4 mL de solução de TCA (item 1.1a), agitar e deixar em repouso por 30 min. A seguir, filtrar com auxílio de vácuo moderado, em papel-filtro Whatman 54[®] (quantitativo – faixa preta) e lavar o resíduo duas vezes com a solução de TCA (item 1.1a).

1.2. Quantificação do nitrogênio insolúvel em ácido tricloroacético (N_{I-TCA})

- a) Transferir o papel-filtro com o resíduo obtido no item 1.1b para tubo de digestão e proceder à determinação de nitrogênio residual, que corresponde ao N_{I-TCA} , utilizando os procedimentos para a determinação de nitrogênio total pelo método de Kjeldahl (Nogueira & Souza, 2005). Para a digestão da amostra, adicionar 5,0 mL de H_2SO_4 .

- b) O teor de nitrogênio solúvel em TCA (N_{S-TCA}), que corresponde ao nitrogênio não-protéico, é calculado por diferença: $N_{S-TCA} = N_T - N_{I-TCA}$.

2. Determinação do nitrogênio insolúvel em tampão de borato-fosfato

2.1. Extração do nitrogênio solúvel em tampão de borato-fosfato (N_{S-TBF})

- a) Solução tampão de borato-fosfato, com pH de 6,7 a 6,8: dissolver 12,2 g de fosfato monobásico de sódio, 8,91 g de borato de sódio e 100 mL de álcool butílico terciário em água deionizada e completar o volume para 1000 mL. Corrigir o pH com borbulhamento de CO_2 .
- b) Solução a 10% (m/v) de azida sódica: preparar quantidade suficiente para uso diário.
- c) Pesar 200 mg ($\pm 0,1$ mg) de amostra seca e moída e transferir para tubo de polipropileno, adicionar 20 mL de solução tampão de borato-fosfato com pH 6,8 (item 2.1a) e 400 mL de solução de azida sódica (item 2.1b). Homogeneizar e deixar em repouso à temperatura ambiente por três horas, filtrar com auxílio moderado de vácuo, em papel-filtro Whatman 54[®] (quantitativo – faixa preta), e lavar o resíduo com aproximadamente 250 mL de água deionizada.

2.2. Quantificação do nitrogênio insolúvel em tampão de borato–fosfato com pH 6,8.

a) Transferir o papel-filtro com o resíduo obtido no item 2.1.c para tubo de digestão e determinar o nitrogênio residual, que corresponde ao N_{I-TCA} , utilizando os procedimentos para a determinação de nitrogênio total pelo método de Kjeldahl (Nogueira & Souza, 2005). Para a digestão da amostra, adicionar 5,0 mL de H_2SO_4 .

b) O teor de nitrogênio solúvel em TBF (N_{S-TBF}) é calculado por diferença: $N_{S-TBF} = N_T - N_{I-TBF}$.

3. Determinação do nitrogênio insolúvel em detergente neutro (N_{IDN})

a) Transferir o resíduo obtido na determinação da fibra em detergente neutro (FDN) para tubo de digestão e determinar o nitrogênio insolúvel em detergente neutro (N_{IDN}) utilizando os mesmos procedimentos descritos para a determinação de nitrogênio total.

c) Geralmente não é possível transferir todo o resíduo para o tubo de digestão. Dessa forma, a massa de resíduo transferida deve ser registrada e utilizada nos cálculos da porcentagem de nitrogênio contido na FDN. É importante salientar que o nitrogênio foi determinado no resíduo após a solubilização do conteúdo celular com solução detergente neutra (Souza *et al.*, 1999). Assim, o resultado obtido refere-se à porcentagem de nitrogênio em 100% de FDN e, para convertê-lo para a amostra original, basta multiplicá-lo pela porcentagem de FDN, com

base na matéria seca (MS) a 105°C (N_{FDN}) e dividir por 100, conforme a seguinte fórmula:

$$N_{IDN} \% = \frac{N_{FDN} \% \cdot FDA \% MS}{100}$$

4. Determinação do nitrogênio insolúvel em detergente ácido

a) Transferir o resíduo obtido na determinação da fibra em detergente ácido (FDA) para tubo de digestão e determinar o nitrogênio insolúvel em detergente ácido (N_{IDA}) utilizando os procedimentos descritos para nitrogênio total.

b) Geralmente não é possível transferir todo o resíduo para o tubo de digestão. Dessa forma, a massa de resíduo transferida deve ser registrada e utilizada nos cálculos da porcentagem de nitrogênio contido na FDA. É importante salientar que o nitrogênio foi analisado no resíduo após a solubilização do conteúdo celular com a solução detergente neutra. Assim, o resultado obtido refere-se à porcentagem de nitrogênio em 100% de FDA e, para convertê-lo para a amostra original, basta multiplicá-lo pela porcentagem de FDA, com base na matéria seca (N_{FDA} ; Souza *et al.*, 1999), e dividir por 100, conforme a seguinte fórmula:

$$N_{IDA} \% = \frac{N_{FDA} \% \cdot FDA \% MS}{100}$$

5. Cálculos empregados para expressar as frações nitrogenadas com base nos teores de nitrogênio total

$$\text{FRAÇÃO NNP} = \frac{(N_T - N_{I-TCA}) \times 100}{N_T}$$

$$\text{FRAÇÃO NB}_1 = \frac{(N_{S-TBF} - N_{S-TCA}) \times 100}{N_T}$$

$$\text{FRAÇÃO NB}_2 = \frac{(N_{I-TBF} - N_{IDN}) \times 100}{N_T}$$

$$\text{FRAÇÃO NB}_3 = \frac{(N_{IDN} - N_{IDA}) \times 100}{N_T}$$

$$\text{FRAÇÃO NC} = \frac{N_{IDA} \times 100}{N_T}$$

6. Aplicação de resultados de análise das frações nitrogenadas na caracterização de espécies de gramíneas forrageiras

Uma vez que as pastagens constituem a base da dieta dos ruminantes na maioria dos sistemas de produção e que entre as espécies de gramíneas ocorrem variações do valor nutritivo, influenciadas pelo estágio de maturidade e pelo nível de fertilidade do solo, os componentes nutritivos de duas espécies de gramíneas, *Brachiaria decumbens* cv. Basilisk e *Panicum maximum* cv. Tanzânia 1 foram caracterizados em várias condições de disponibilidade de N no solo. O experimento foi realizado em blocos ao acaso com quatro repetições. Nas parcelas, foram casualizadas as gramíneas e, nas subparcelas, as idades de corte. Os tratamentos foram constituídos de cinco doses de N (0, 50, 100, 200 e 400 kg/ha). Os cortes, na altura de 15 cm, visando à manutenção das gemas apicais dos perfilhos vegetativos, foram realizados aos 21, aos 35 e aos 70 dias após corte de nivelamento e adubação.

Para a caracterização dos componentes nutricionais, foram determinadas as cinco frações de nitrogênio (NNP, NB₁, NB₂, NB₃ e NC), de acordo com os procedimentos metodológicos do sistema de proteínas e de carboidratos de Cornell (Sniffen *et al.*, 1992), utilizando-se nas análises as simplificações descritas anteriormente. Foram determinados os componentes da parede celular: FDN, FDA, celulose e lignina (van Soest, 1963; Souza *et al.*, 1999); a proteína bruta (Nogueira & Souza, 2005) e a digestibilidade *in vitro* da matéria seca – DIVMS (Tilley & Terry, 1963).

Os resultados foram avaliados com o uso de métodos quimiométricos de classificação (*software* Pirouette 2.2), empregando as técnicas de análise de componentes principais e de análise hierárquica de *clusters*, a qual tem o objetivo de agrupar os dados com características semelhantes; os resultados são apresentados na forma de dendrograma.

O tipo de pré-processamento empregado para análise de componentes principais foi o auto-escalado. O método de pré-processamento fornece pesos iguais para as variáveis estudadas e possibilita agrupar as amostras considerando as semelhanças entre variáveis (características dos componentes nutritivos): estandardizado, média zero e variância.

Resultados e Discussão

Na Figura 2, são apresentados os resultados das frações de nitrogênio (NNP, NB₁, NB₂, NB₃ e NC) das amostras de *B. decumbens* e de *P. maximum*. Os resultados apresentados são

referentes às amostras do segundo corte (35 dias de rebrota); comparam-se a ausência de adubação nitrogenada (equivalente ao tratamento de 0 kg/ha de N) e a dose mais alta de adubação (tratamento de 400 kg/ha de N). Nessa condição, observou-se que a distinção entre as frações nitrogenadas das gramíneas estudadas está nas concentrações das frações NNP, NB₂ e NB₃, e que a diferença permanece independentemente do nível de adubação nitrogenada.

Por meio do dendrograma obtido pela análise hierárquica de *clusters*, apresentado na Figura 3, pode-se observar o agrupamento entre as amostras devido à idade de corte (1^o, 2^o e 3^o cortes) e entre as duas espécies (*B. decumbens* e *P. maximum*).

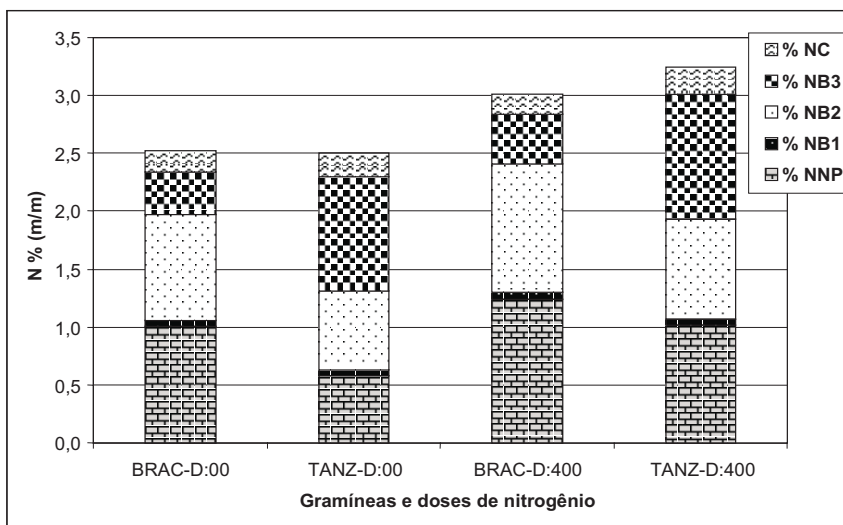


Figura 2. Composição das frações de nitrogênio nas gramíneas *Brachiaria decumbens* cv. Basilisk (BRAC) e *Panicum maximum* cv. Tanzânia 1 (TANZ), considerando a adubação nitrogenada nas doses de 0 kg/ha de N (D:00) e de 400 kg/ha de N(D:400).

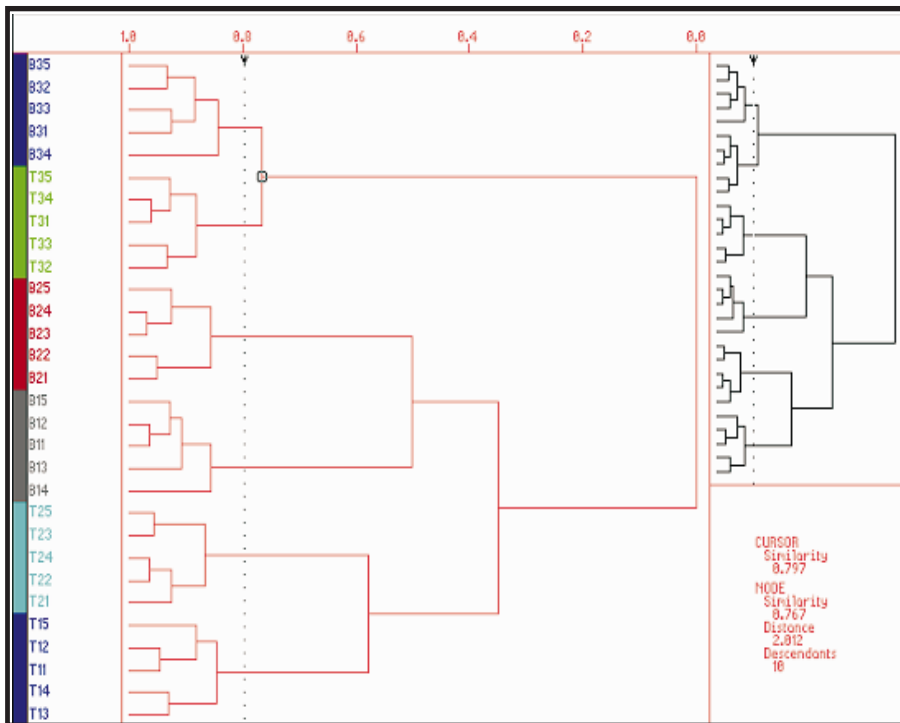


Figura 3. Dendrograma da análise hierárquica de *clusters* dos resultados das amostras de *Brachiaria decumbens* cv. Basilisk (B) e *Panicum maximum* cv. Tanzânia 1 (T), considerando os três cortes e os cinco níveis de adubação nitrogenada.

No gráfico da análise de componentes principais dos resultados das amostras (Figura 4), pode-se observar boa separação em relação ao valor nutritivo entre as duas espécies de gramíneas estudadas e entre as idades: 21, 35 e 70 dias (respectivamente, 1º, 2º e 3º cortes). O método de quimiometria empregado mostrou-se eficiente, pois possibilitou agrupar as amostras da mesma espécie e da mesma idade, apesar de terem

níveis de adubação diferentes. Observa-se na Figura 5 a influência das variáveis da parede celular (NB_3 , LIG , NC , FDN e FDA) na separação e na discriminação das espécies aos 70 dias de rebrota (3º corte). As variáveis NB_1 , NB_2 , NNP , PB e $DIVMS$, que teoricamente apresentam correlação positiva com a digestibilidade determinada com animais ruminantes, foram responsáveis pelo agrupamento das plantas com idade de corte de 21 e de 35 dias.

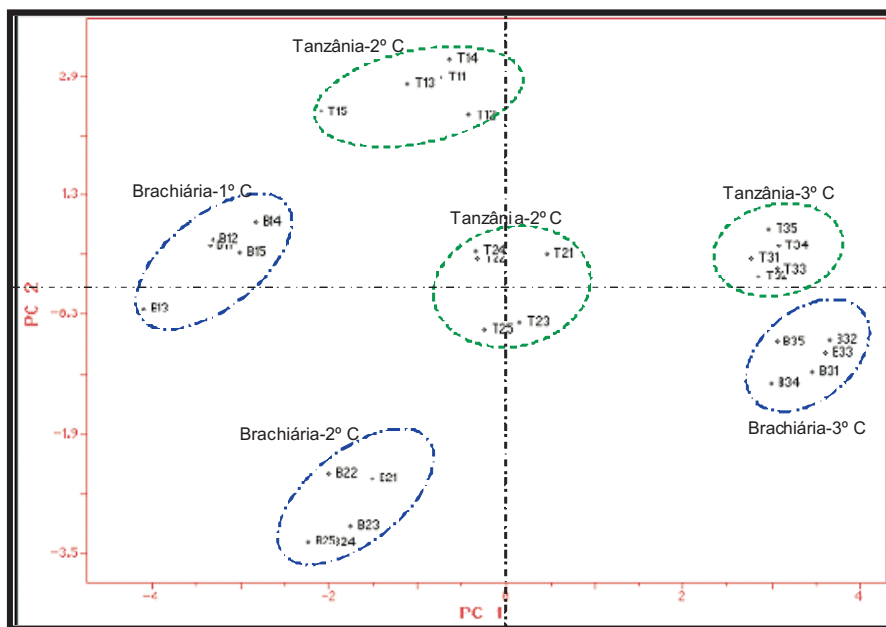


Figura 4. Análise de componentes principais dos resultados de amostras de *Brachiaria decumbens* cv. Basilisk (B) e *Panicum maximum* cv. Tanzânia 1 (T), considerando três cortes e cinco níveis de adubação nitrogenada.

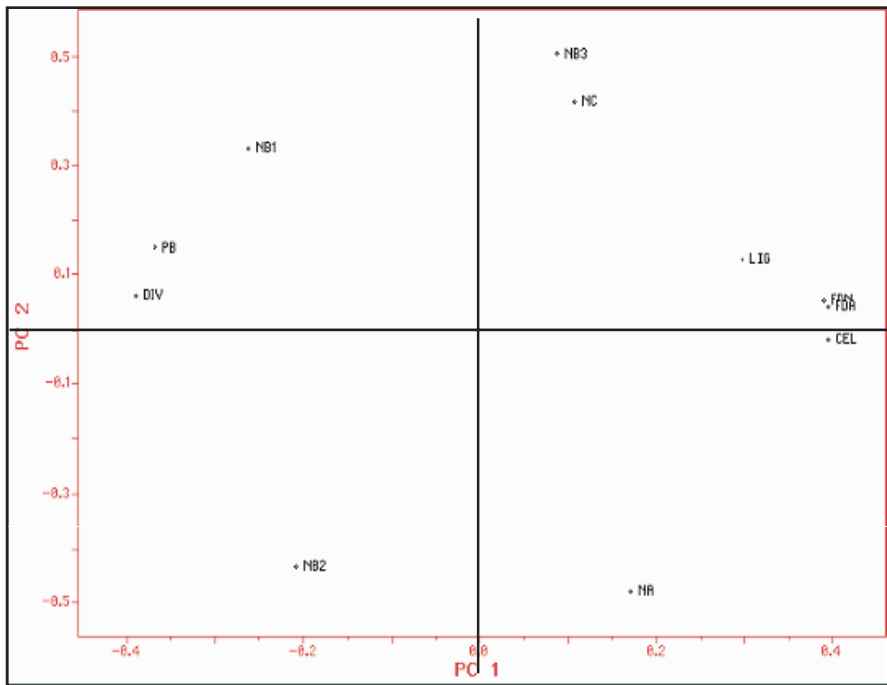


Figura 5. Gráfico da análise de componentes principais de variáveis (*loadings*) utilizadas na caracterização das gramíneas *Brachiaria decumbens* cv. Basilisk e *Panicum maximum* cv. Tanzânia 1.

Conclusões

O procedimento de análise simplificado das frações proposto neste trabalho foi adequado para a caracterização das espécies de gramíneas avaliadas, permitindo obter correlação positiva entre as frações que apresentam maior taxa de degradação ruminal (NNP, NB₁ e NB₂) e a digestibilidade *in vitro*, e entre as frações com menor velocidade de degradação e indisponíveis nutricionalmente (NB₃ e NC, respectivamente) e

os componentes da parede celular (FDN, FDA, lignina e celulose).

O fracionamento do N total permitiu a diferenciação entre duas espécies de gramíneas; na ausência de adubação nitrogenada de cobertura, a *B. decumbens* pode ser considerada de melhor qualidade do que a cultivar Tanzânia. O inverso acontece em condições de adubação de cobertura.

Por meio da utilização dos métodos quimiométricos de análise hierárquica de *clusters* e de análise de componentes principais, foi possível discriminar as duas espécies e relacionar a idade das gramíneas com as variáveis avaliadas e, dessa forma, concluir que a *B. decumbens* foi a espécie em que a idade de corte da planta mostrou maior correlação positiva com a digestibilidade, pois apresentou teores mais elevados das formas de nitrogênio prontamente solúveis.

Referências Bibliográficas

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC 15th ed. **Official methods of analysis**. Arlington: AOAC International, 1990. 1298 p. 2 v.

KRISHNAMOORTHY, U.; MUSCATO, T. V.; SNIFFEN, C. J.; VAN SOEST, P. J. Nitrogen fractions in selected feedstuffs. **Journal of Dairy Science**, v. 65, n. 2, p. 217-225, 1982.

LICITRA, G.; HERNANDEZ, T. M.; VAN SOEST, P. J. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 57, p. 347-358, 1995.

NOGUEIRA, A. R. A.; SOUZA, G. B. **Manual de laboratórios:** Solo, água, nutrição vegetal, nutrição animal e alimentos. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2005. 313 p.

SGARBIERÍ, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos:** propriedades, degradações, modificações. São Paulo: Livraria Varela, 1996. 517 p.

SNIFFEN, C. J.; O'CONNOR, J. D.; VAN SOEST, P. J.; FOX, D. G.; RUSSELL, J. B. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 3562-3577, 1992.

SOUZA, G. B.. Pré-tratamento e caracterização dos constituintes nutricionais em amostras de alimento animal. 2003. 75 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP.

SOUZA, G. B.; NOGUEIRA, A. R. A, SUMI, L. M.; BATISTA, L. A. R. **Método alternativo para a determinação de fibra em detergente neutro e detergente ácido.** São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 1999. 21 p. (Embrapa Pecuária Sudeste, Boletim de Pesquisa, 4). (ISSN 15180271).

TILLEY, J. M. A. & TERRY, R. A. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. **Journal of the British Grassland Society**, v. 18, n. 2, p. 104-111, 1963.

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

VAN SOEST, P. J. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. A rapid method for the determination of fiber and lignin. **Journal of the Association of Official Agricultural Chemists**, v. 46, n. 5, p. 829-835, 1963.