

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE EDUCAÇÃO SUPERIOR DO OESTE – CEO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA– PPGZOO**

FERNANDA RIGON

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES PROCESSAMENTOS PARA ELEVAR O TEOR DA
PROTEÍNA NÃO DEGRADÁVEL NO RÚMEN EM FONTES PROTEICAS**

**CHAPECÓ
2021**

FERNANDA RIGON

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES PROCESSAMENTOS PARA ELEVAR O TEOR DA
PROTEÍNA NÃO DEGRADÁVEL NO RÚMEN EM FONTES PROTEICAS**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Zootecnia pelo Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC.
Orientador: Prof. Dr. Pedro Del Bianco Benedeti

**CHAPECÓ
2021**

FICHA CATALOGRÁFICA

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CEO/UDESC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Rigon, Fernanda

AVALIAÇÃO DE DIFERENTES PROCESSAMENTOS
PARA ELEVAR O TEOR DA PROTEÍNA NÃO DEGRADÁVEL
NO RÚMEN EM FONTES PROTEICAS / Fernanda Rigon. --
2021.

59 p.

Orientador: Pedro Del Bianco Benedeti

Coorientador: Eduardo Marostegan de Paula

Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de Santa
Catarina, Centro de Educação Superior do Oeste, Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia, Chapecó, 2021.

1. Fontes de proteína. 2. Nitrogênio. 3. Padrão de fermentação.
I. Del Bianco Benedeti, Pedro . II. Marostegan de Paula, Eduardo.
III. Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Educação
Superior do Oeste, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. IV.
Título.

FERNANDA RIGON

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES PROCESSAMENTOS PARA ELEVAR O TEOR DA
PROTEÍNA NÃO DEGRADÁVEL NO RÚMEN EM FONTES PROTEICAS**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Zootecnia pelo Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC.
Orientador: Prof. Dr. Pedro Del Bianco Benedeti

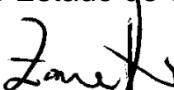
BANCA EXAMINADORA

Membros:


Prof. Dr. Pedro Del Bianco Benedeti

Universidade do Estado de Santa Catarina


Profa. Dra. Ana Luiza Bachaman Schogor
Universidade do Estado de Santa Catarina


Prof. Dr. Diego Zanetti
Instituto Federal do Sul de Minas

Chapecó, 30 de julho de 2021.

AGRADECIMENTOS

“Inclina Teu olhar sobre nós, e cuida”.

O Rappa

Ao motivo das batidas do meu coração, fonte da minha força para todos os dias batalhar pelos meus sonhos, por mais difíceis que sejam de alcançar. Pela fortaleza que são e sempre foram durante toda a minha vida, meus exemplos, agradeço aos meus amados pais, Cerli e Airton. Amo vocês!

Quando saí de casa e mudei para a fazenda experimental do Instituto de Zootecnia em Sertãozinho, SP, não fazia ideia de quantos perrengues e obstáculos eu ia encontrar. O que eu não sabia também, é que eu iria encontrar lá uma família e uma casa tão cheia de amor, como a casa da minha família. Aos meus amigos e família do IZ: Marcelo, Luana, Marina, David, Lorena, Caroline, Viviane e Bruna, muito obrigada!

Além de uma nova família na nova casa, também fiz uma família no meu trabalho, no laboratório que se tornou a minha segunda casa. Lá, encontrei um grupo de Mulheres Maravilha, com superpoderes e uma força inabalável. Com muito carinho, minha mais sincera gratidão a vocês “princess”, Elaine, Amanda, Kalista, Ana Claudia e Bruna (novamente). Esse trabalho é fruto do nosso empenho! Muito obrigada aos “príncipes” do Laboratório de Nutrição e Fermentação Ruminal, David, Henrique, Diego e Robson. Obrigada galera, vocês são incríveis!

Às minhas amigas de sempre e para sempre, Tanira, Tamires, Vanessa, Bruna Petry e Estefânia. Obrigada pela nossa amizade maravilhosa, amo vocês.

Ao meu orientador Pedro, que foi um exímio mestre Jedi, e que aceitou treinar esta jovem Padawan. Obrigada por ser um exemplo de profissional, ser humano e de humildade. Profunda gratidão por confiar em mim, e por embarcar comigo nessa jornada em uma galáxia tão distante. Ao meu co-orientador, Eduardo, conselheiro da ordem. Obrigada pela confiança, pela oportunidade de abrir as portas do laboratório para que eu pudesse chegar até aqui. À ambos, meu muito obrigada pela orientação e dedicação.

À Universidade do Estado de Santa Catarina, pela oportunidade de realizar o mestrado de forma gratuita, e pela bolsa de estudos a mim concedida. Ao Instituto de Zootecnia, e seus colaboradores, por me permitirem desenvolver a parte prática da minha pesquisa.

RESUMO

Atender aos requisitos de proteína metabolizável para bovinos de corte de médio e alto desempenho é essencial para maximizar o crescimento produtivo dos animais, uma vez que a proteína microbiana sintetizada no rúmen não atende às suas necessidades proteicas. Neste caso, a dieta deve fornecer maior quantidade de proteína não degradável no rúmen (PNDR). Assim, diferentes métodos de processamento foram desenvolvidos para aumentar o teor de PNDR de fontes de proteína para gado de corte. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de diferentes métodos de processamento para aumentar o teor de proteína não degradada no rúmen (PNDR) sobre a fermentação ruminal dos farelos de algodão (Experimento 1) e de amendoim (Experimento 2) em sistemas *in vitro*. Assim, foram avaliados seis tratamentos para cada experimento: controle negativo com farelo de algodão convencional (Ncontrole), tratamento térmico em microondas com xilose 2% (Forno Microondas), tratamento térmico em forno convencional com xilose 2% (Forno convencional), tratamento térmico em autoclave com 2% de xilose (Autoclave), Tanino e um produto comercial à base de soja (Pcontrole). Os parâmetros avaliados foram a cinética de produção de gases ruminais *in vitro*, parâmetros de fermentação e digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS). Para ambos os experimentos, um sistema de produção de gás *in vitro* com 25 garrafas foi utilizado para avaliar a produção total de gás (PG) (às 24 e 48h) e a cinética, bem como os perfis de fermentação. Além disso, um sistema de incubadora *in vitro* foi utilizado sob rotação e controle de temperatura para avaliar a DIVMS. Ambos os experimentos foram conduzidos em três rodadas de fermentação consecutivas de 48 horas. A diferença estatística foi declarada quando $P < 0,05$, e comparadas pelo teste de Tukey (5%). Para ambos os alimentos, o Forno convencional apresentou a menor taxa de fermentação e a maior produção total de gás ($P < 0,01$). Além disso, o método de processamento de Tanino apresentou menor GP total (24 e 48-h), menor digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica (DIVOM) e menor energia metabolizável (EM) para farelo de algodão e farelo de amendoim ($P < 0,01$). Em relação aos parâmetros ruminais, o Ncontrole teve a maior produção de ácidos graxos voláteis totais (AGV) e o Tanino teve a menor produção de AGV de cadeia ramificada no Experimento 1 ($P < 0,01$). O Ncontrole teve o menor valor de pH final e menor concentração de nitrogênio amoniacial (N-NH₃) no Experimento 2 ($P < 0,01$). Em

ambos os experimentos, o Forno convencional e o Tanino apresentaram os menores valores de DIVMS ($P < 0,01$). Os diferentes métodos de processamento avaliados parecem ser eficientes na proteção da proteína da degradação ruminal. Além disso, o Forno convencional e o Tanino promoveram alterações na cinética ruminal da produção de gases *in vitro* e reduziram a DIVMO e DIVMS. Esses métodos de processamento são eficientes na proteção da proteína da degradação ruminal nos farelos de algodão e amendoim e podem ser utilizados como possíveis fontes alternativas de PNDR em dietas de bovinos de corte.

Palavras-chave: fontes de proteína; nitrogênio; padrão de fermentação.

ABSTRACT

Meeting the metabolizable protein requirements for medium and high-performance beef cattle is essential to maximize animals' productive growth, since the microbial protein synthesized in the rumen does not meet their protein requirements. In this case, the diet must supply a greater amount of rumen undegraded protein (RUP). Thus, the objective of this study was to evaluate the effects of the different processing methods to increase the rumen undegraded protein content on ruminal fermentation of cottonseed (Experiment 1) and peanut (Experiment 2) meals using in vitro systems. Thus, six treatments were evaluated for each feed: negative control with conventional cottonseed meal (Ncontrol), heat treatment on microwave with 2% xylose (Microwave oven), heat treatment on conventional oven with 2% xylose (Conventional oven), heat treatment on autoclave with 2% xylose (Autoclave), Tannin, and a commercial soybean-based product (Pcontrol). For both experiments, an in vitro gas production system with 25 bottles was used to evaluate total gas production (GP) (at 24 and 48h) and kinetics, as well as fermentation pattern. Furthermore, an in vitro incubator system was used under rotation and temperature control to evaluate the in vitro dry matter digestibility (IVDMD). Both experiments were conducted in three consecutive 48-h fermentation batches. Statistical difference was declared when $P < 0.05$, and compared by Tukey test (5%). For both feeds, the Conventional oven had the lowest fermentation rate and the greater gas pool size ($P < 0.01$). Furthermore, the Tannin processing method had the lower total GP (24 and 48-h), lower in vitro organic matter digestibility, and lower metabolizable energy for cottonseed and peanut meals ($P < 0.01$). Regarding the ruminal parameters, the Ncontrol had the greater total volatile fatty acids (VFA) concentration and Tannin had the lower branched-chain VFA production in Experiment 1 ($P < 0.01$). The Ncontrol had the lower ammonia nitrogen (NH₃-N) concentration in the Experiment 2 ($P < 0.01$). In both experiments, Conventional oven and Tannin had the lowest IVDMD values ($P < 0.01$). These processing methods were efficient in protecting the protein from ruminal degradation in cottonseed and peanut meals. Thus, these ingredients may be used as possible alternative sources of RUP in beef cattle diets.

Keywords: fermentation pattern; protein sources; ruminal nitrogen metabolism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Resumo do metabolismo dos compostos nitrogenados em animais ruminantes	17
Figura 2 – Fracionamento da proteína para animais ruminantes	17
Figura 3 – Ruminal gas production profiles of the processing methods used for cottonseed meal, determined with the Ankom Gas Production System (Ankom Technology, Macedon, NY, USA).....	44
Figura 4 – The IVDMD of processing methodos (Ncontrol, Microwave onven, Conventional oven, Autoclave, Tannin and Pcontrol) for cottonseed and peanut meals, (Daisyll system, Ankom technology, NY, USA) in three consecutive 48-h fermentation batches.	45
Figura 5 – Ruminal gas production profiles of the processing methods used for peanut meal, determined with the Ankom Gas Production System (Ankom Technology, Macedon, NY, USA).....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Exigências nutricionais de proteína bruta (PB) e proteína bruta não degradável no rúmen (PNDR) de um zebuíno (peso corporal médio de 430 kg) com diferentes ganhos médios diários (GMD).....	20
Tabela 2 – Exigências nutricionais de proteína bruta (PB) e proteína bruta não degradável no rúmen (PNDR) de um zebuíno (peso corporal médio de 450 kg) com diferentes ganhos médios diários (GMD).....	20
Tabela 3 – Composição proteica dos farelos de soja, caroço de algodão, farelo de algodão e farelo de amendoim.	21
Tabela 4 – Chemical composition of ingredients used for cottonseed and peanut meals.	47
Tabela 5 – Effects of different processing methods applied to cottonseed meal on ruminal kinetics, total gas production, in vitro organic matter digestibility (IVOMD), and metabolizable energy (ME) in a gas production system. .	49
Tabela 6 – Effects of different processing methods applied to cottonseed meal on final ruminal pH, total VFA production, VFA profile and NH3-N concentrations (mg/dL) in in vitro systems.....	50
Tabela 7 – Effects of different processing methods applied to peanut meal on ruminal kinetics, total gas production, in vitro organic matter digestibility (IVOMD), and metabolizable energy (ME) in a gas production system.....	51
Tabela 8 – Effects of different processing methods applied to peanut meal on final ruminal pH, total VFA production, VFA profile and NH3-N concentrations (mg/dL) in in vitro systems.....	52

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1	PROTEÍNA NA ALIMENTAÇÃO DE ANIMAIS RUMINANTES	16
2.2	ALIMENTOS PROTEICOS PARA ANIMAIS RUMINANTES.....	21
2.3	ESTRATÉGIAS PARA CONTROLAR A DEGRADAÇÃO RUMINAL DAS PROTEÍNAS.....	23
2.4	RESULTADOS DE ESTUDOS PARA ELEVAÇÃO DO TEOR DE PNDR DE ALIMENTOS PARA ANIMAIS RUMINANTES.....	26
2.5	TÉCNICAS IN VITRO PARA AVALIAÇÃO DE ALIMENTOS PARA ANIMAIS RUMINANTES	27
3	ARTIGO 1: EVALUATION OF DIFFERENT PROCESSING METHODS TO PROTECT COTTONSEED (<i>GOSSYPIUM SPP</i>) AND PEANUT (<i>ARACHIS HYPOGAEA</i>) MEALS PROTEIN FROM IN VITRO RUMINAL DEGRADATION.....	31
3.1	INTRODUCTION	31
3.2	MATERIAL AND METHODS	32
3.2.1	Experiment location and ethic committee approval.....	32
3.2.2	Previous study.....	33
3.2.3	Experimental designs	33
3.2.4	Chemical analysis	35
3.2.5	Operational procedures	35
3.2.5.1	<i>Ruminal fluid collection and buffer solutions preparation.....</i>	35
3.2.5.2	<i>In vitro gas production</i>	36
3.2.5.3	<i>Ammonia-nitrogen (NH₃-N), pH, and volatile fatty acids (VFA).....</i>	36
3.2.5.4	<i>In vitro dry matter digestibility</i>	37
3.2.6	Statistical analysis	37
3.2.7	Results	38
3.2.7.1	<i>Experiment 1: cottonseed meal</i>	38
3.2.7.2	<i>Experiment 2: peanut meal.....</i>	38
3.2.8	Discussion	39
3.2.9	Conclusion.....	43
3.2.10	Acknowledgments.....	43

3.2.11	Financial support.....	43
3.2.12	Figures	44
3.2.13	Tables	47
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
	REFERÊNCIAS.....	54
	ANEXO A – COMPROVANTE DO CEUA	57

1 INTRODUÇÃO

Os sistemas de produção de bovinos de corte têm elevado o grau de tecnificação e produtividade. Neste sentido, a busca por animais mais eficientes e de maior ganho de peso tem sido constante. Desta forma, é necessário melhorar o aproveitamento de uso dos nutrientes pelos animais, especialmente da proteína, o ingrediente mais caro da alimentação animal (SANTOS; PEDROSO, 2011). Atender aos requisitos de proteína metabolizável (PM) para bovinos de corte de médio e alto desempenho é essencial para maximizar o crescimento produtivo dos animais, uma vez que a proteína microbiana sintetizada no rúmen não atende às suas necessidades proteicas (ROTTA et al., 2016). Neste caso, a dieta deve fornecer maior quantidade de proteína não degradável no rúmen (PNDR) (VALADARES FILHO; PINA, 2011).

Dentre as principais fontes de proteína utilizadas na alimentação de bovinos de corte no Brasil estão o farelo de algodão, farelo de amendoim, a torta de algodão, farelo de soja, resíduos do processamento da soja, caroço de algodão e o farelo de girassol (OLIVEIRA; MILLEN, 2014). Além do mais, o farelo de soja, principal fonte de PNDR e apresenta elevado custo, o que torna necessário a busca por estratégias de processamentos para elevar o teor de PNDR de outros alimentos, como o farelo de algodão e amendoim. Entretanto, a inclusão de alimentos alternativos às fontes comerciais de PNDR, em dietas para bovinos de corte, não deve apresentar elevado custo, deve atender as exigências de PM dos animais e não causar prejuízos ao desempenho produtivo dos mesmos.

Desta forma, nós acreditamos que o processamento dos farelos de algodão e amendoim com autoclave, calor, xilose ou tanino pode apresentar diferentes padrões fermentação ruminal em comparação com o alimento não processado, porém, podem ser eficientes na proteção da proteína da degradação ruminal. Neste sentido, o nosso objetivo foi avaliar os feitos da utilização de alimentos que passaram por diferentes técnicas de processamento para aumentar o teor de PNDR sobre os parâmetros da fermentação ruminal em sistemas *in vitro*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PROTEÍNA NA ALIMENTAÇÃO DE ANIMAIS RUMINANTES

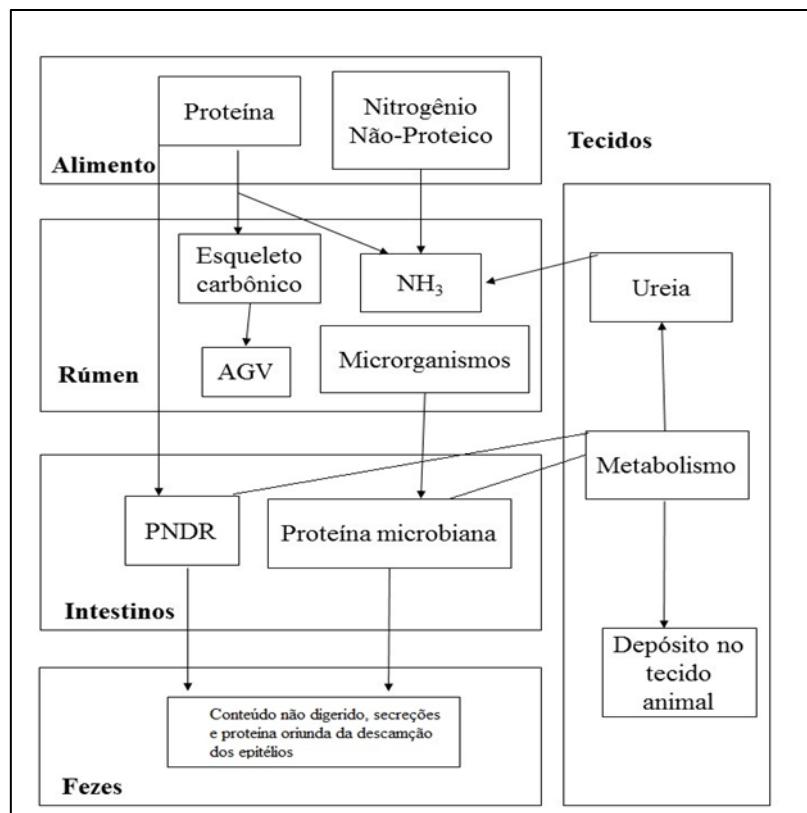
Das macromoléculas biológicas que fazem parte da estrutura celular, as proteínas são responsáveis por desempenhar diversas funções no organismo animal. Possuem funções estruturais, enzimáticas, hormonais, fazem a recepção de estímulos hormonais e armazenam informações genéticas (NELSON; COX, 2014).

Na nutrição de ruminantes, a proteína bruta presente nos alimentos é fracionada em duas porções: proteína degradável no rúmen (PDR), a qual é degradada pela secreção das enzimas dos microrganismos ruminais, para a formação da proteína microbiana; e a proteína não degradável no rúmen (PNDR), que não sofre ação fermentativa neste compartimento, e será digerida e absorvida no abomaso e intestino delgado (NASEM, 2016) (Figura 1). Entretanto, o perfil dos aminoácidos (AA) absorvidos pelo animal variam de acordo com o processo de fermentação ruminal, a fonte de proteína fornecida na alimentação e as exigências para cada categoria animal (TITGEMEYER, 2003; SANTOS; PEDROSO, 2011).

Em se tratando de PDR, o fornecimento de fontes de nitrogênio não proteico (NNP), como a ureia, fornecem aos microrganismos ruminais nitrogênio na forma de amônia (NH₃), a qual é utilizada como substrato para síntese de proteína microbiana (ATASOGLU; WALLACE, 2003; TITGEMEYER, 2003). A proteína microbiana é digerida nos compartimentos pós-rúmen (abomaso e intestino delgado), e fornece aos ruminantes proteína de alto valor biológico, rica em todos os 10 AA essenciais (NASEM, 2016). Todavia, para que a proteína dietética seja adequadamente utilizada pelos animais é necessário conhecer as modificações providas pelo rúmen aos compostos nitrogenados dietéticos, bem como conhecer o processo digestivo e absorutivo destes compostos; além de conhecer os fatores que alteram estes processos (ROTTA et al., 2016). A proteína verdadeira contida nos alimentos para animais ruminantes pode ser classificada em diferentes frações, as quais variam de acordo com suas respectivas taxas de degradação ruminal (HIGGS et al., 2015; SNIFFEN et al., 1992), que por sua vez interferem no suprimento de aminoácidos para os animais.

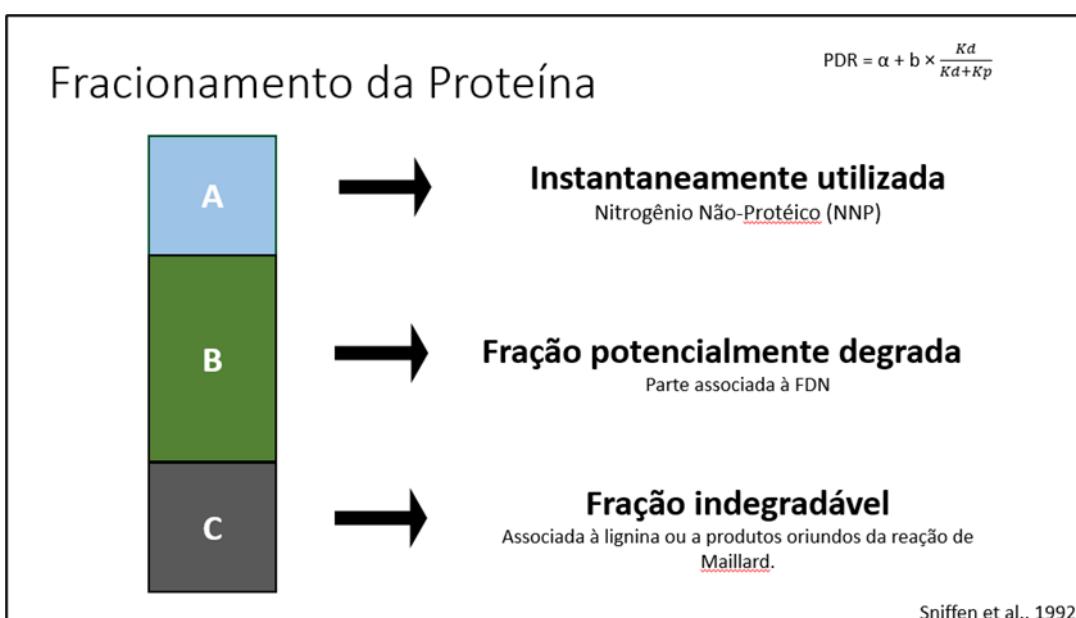
(BACH et al., 2008). O fracionamento da proteína dietética para animais ruminantes está ilustrado na Figura 2

Figura 1 – Resumo do metabolismo dos compostos nitrogenados em animais ruminantes



Fonte: Adaptado de Haryanto (2014).

Figura 2 – Fracionamento da proteína para animais ruminantes



Fonte: Adaptado de Higgs et al. (2015) e Sniffen et al. (1992).

A fração B pode ser subdividida em três subfrações, de acordo com a degradação ruminal: fração B1, rapidamente degradada no rúmen; fração B2, parcialmente degrada no rúmen, enquanto o restante escapa da fermentação ruminal; fração B3, lentamente degradada no rúmen pois está associada à parede celular vegetal (SNIFFEN et al., 1992). Todavia, a proporção da fração B que será degrada no rúmen depende da degradação de seus componentes e da taxa de passagem, os quais são processos competitivos (NASEM, 2016). Segundo o NASEM (2016), maior tempo de permanência no rúmen irá promover maior degradação desta fração. O escape de componentes do alimento, como proteína, não é igual ao escape de matéria seca ou matéria orgânica, uma vez que a taxa de digestão (kd) difere para componentes específicos do alimento (OWENS; BASALAN, 2016).

Contudo, a extensão da degradação de cada fração proteica dos alimentos pode variar, uma vez que existem diferenças nos valores de PDR e PNDR dos alimentos, os quais são influenciadas pelas taxas de digestão, passagem, e desaparecimento do alimento no rúmen (NASEM, 2016; VALADARES FILHO; PINA, 2011). A taxa de degradação ruminal da fração proteica dos alimentos também pode variar em função da composição das dietas, interação com outros nutrientes, e da forma do processamento do alimento (NASEM, 2016; ROTTA et al., 2016). Neste sentido, o tratamento térmico dos alimentos, o uso de taninos condensados, análogos de aminoácidos, e carboidratos como a xilose podem reduzir a degradação ruminal da fração proteica solúvel dos alimentos, e promover a disponibilidade de aminoácidos a nível intestinal (HARYANTO, 2014; KHORASANI, 1993; WALTZ and STERN, 1989).

Os alimentos utilizados na alimentação de ruminantes apresentam variações quanto ao teor de PB e composição aminoacídica (BACH et al., 2005). Desta forma, para que a absorção dos AA essenciais seja maximizada, são necessários estudos acerca da degradação ruminal dos alimentos proteicos e de sua composição (PIEPENBRINK and SCHINGOETHE, 1998). Embora a fonte proteica fornecida na dieta altere diretamente o processo de absorção e utilização dos AA, o nível produtivo dos animais também exerce forte influência nestes processos (SANTOS; PEDROSO, 2011). Somente a proteína de origem

microbiana, não atende as exigências proteicas de animais de maior desempenho produtivo (NASEM, 2016; SANTOS; PEDROSO, 2011). Quanto maior o ganho de peso desejado dos animais, maior a exigência em PNDR (NASEM, 2016; ROTTA et al., 2016).

Em termos de adequação proteica, quando são formuladas dietas para bovinos de corte, o objetivo inicial desta etapa deve ser o suprimento de quantidades adequadas de PDR, a fim de maximizar a síntese de proteína microbiana (SANTOS; PEDROSO, 2011). A partir da estimativa da síntese de proteína microbiana, estimam-se as exigências de PDR. Logo, considera-se que a eficiência de conversão do nitrogênio degradado no rúmen em nitrogênio microbiano, é próximo de 90%, e desta forma, as exigências de PDR se igualam a síntese de proteína microbiana (ROTTA et al., 2016).

Normalmente, a proteína microbiana é uma fonte proteica de baixo custo, pois animais ruminantes podem converter alimentos de baixo valor biológico em proteína metabolizável (SANTOS; PEDROSO, 2011; VALADARES FILHO; PINA, 2011). O atendimento das exigências de proteína metabolizável (PM) via suprimento de proteína microbiana é variável, pois depende do conteúdo de PNDR da dieta e do teor de forragem das mesmas (NASEM, 2016). Além disso, o atendimento das exigências de PM é dependente dos processos digestivos dos compostos nitrogenados, das fontes de proteína e sua qualidade (BACH et al., 2005; ROTT A et al., 2016).

Pelo ponto de vista sustentável, deve-se buscar a redução do teor de PB das dietas e maximizar a eficiência de sua utilização pelos animais (VALADARES FILHO; PINA, 2011). De maneira geral, os ruminantes apresentam baixa eficiência de utilização do nitrogênio, uma vez que até 75% do nitrogênio ingerido pode ser excretado nas fezes (HRISTOV et al., 2019). No entanto, para que as exigências em PM dos animais sejam atendidas, deve haver equilíbrio entre o fornecimento de PDR e PNDR (SANTOS; PEDROSO, 2011). De fato, ao se utilizar os dados obtidos pela oitava edição do Nutrient Requirements of Beef Cattle para o cálculo das exigências de um zebuíno com diferentes ganhos médios diários, nota-se que, quanto maior o desempenho, além dos já esperados maiores níveis de proteína bruta (PB), existe um aumento significativo da participação da PNDR (em g/dia e em % da PB) (Tabela 1).

Tabela 1 – Exigências nutricionais de proteína bruta (PB) e proteína bruta não degradável no rúmen (PNDR) de um zebuíno (peso corporal médio de 430 kg) com diferentes ganhos médios diários (GMD).

Item	GMD esperado (kg/dia)				
	0,4	0,8	1,2	1,6	2,0
PB, g/dia	741	932	1122	1303	1477
PNDR, g/dia	195	340	454	598	760
PNDR, %PB	26,3	36,4	40,5	45,9	51,5

Fonte: NASEM (2006).

O mesmo comportamento de exigências nutricionais pode ser observado a partir dos dados apresentados na terceira edição das Exigências Nutricionais de Zebuínos Puros e Cruzados, o BR-Corte (Valadares Filho, 2016). Os dados de exigências de proteína para ganho de peso deste sistema estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Exigências nutricionais de proteína bruta (PB) e proteína bruta não degradável no rúmen (PNDR) de um zebuíno (peso corporal médio de 450 kg) com diferentes ganhos médios diários (GMD).

Item	GMD esperado (kg/dia)		
	0,5	1,0	1,50
PB, g/dia	732	961	1188
PNDR, g/dia	228	310	400
PNDR, %PB	31,1	32,3	33,7

Fonte: BR-CORTE (2006).

Reducir o impacto ambiental gerado pela produção de ruminantes é um dos principais objetivos dos nutricionistas (VANEGAS et al., 2017), uma vez que o teor de PB das dietas, influencia diretamente a excreção ambiental de nitrogênio, pela via fecal ou urinária (BATISTA et al., 2017a, 2016). O excesso de PB nas dietas de bovinos de corte pode ser metabolizado e excretado na forma de ureia, via urina (BATISTA et al., 2017b). Em contrapartida, menores teores de PB nas dietas, acentuam os mecanismos de reciclagem de utilização de nitrogênio (BATISTA et al., 2016). Dietas com teor de PB superior a 17% fornecem excesso de nitrogênio para uso microbiano ruminal, reduzem a reabsorção renal de ureia e a eficiência de reciclagem deste composto (BATISTA et al., 2017). Entretanto, para evitar a acentuada excreção de nitrogênio pelos ruminantes, reduzir o custo das dietas e maximizar o desempenho produtivo dos

animais, algumas estratégias nutricionais podem ser adotadas. Desta forma, controlar a degradação ruminal da proteína (VANEGAS et al., 2017) e aumentar o uso do nitrogênio pelos microrganismos ruminais (BACH et al., 2005) tem por objetivo melhorar a eficiência de utilização dos compostos nitrogenados pelos animais ruminantes.

O aumento da fração PNDR nas dietas de bovinos de corte de alto desempenho pode promover ganhos mais elevados, uma vez que a fração não degradável no rúmen pode contribuir com o “pool” de aminoácidos que chegam ao intestino delgado (PIRES et al., 2008). Entretanto, é necessário conhecer as principais fontes proteicas utilizadas, para que seja efetiva a maximização da resposta do animal.

2.2 ALIMENTOS PROTEICOS PARA ANIMAIS RUMINANTES

De acordo com Pinto & Millen (2018), a maioria dos consultores técnicos entrevistados (90%), formulam as dietas para bovinos de corte terminados em confinamento para atender as exigências nutricionais de PDR dos animais no Brasil. Em contrapartida, apenas 1/3 dos sistemas de confinamento americanos, fornecem dietas formuladas para atender as exigências de PDR dos animais (SAMUELSON et al., 2016). Ainda, segundo Samuelson et al. (2016), os nutricionistas americanos adotam como fonte primária de proteína os co-produtos do milho. No Brasil, as principais fontes de proteína utilizadas em dietas de terminação são o farelo de soja, farelo de algodão, caroço de algodão e farelo de amendoim (PINTO & MILLEN, 2018; Tabela 3).

Tabela 3 – Composição proteica dos farelos de soja, caroço de algodão, farelo de algodão e farelo de amendoim.

Componente	Fonte proteica				
	FS¹	CA²	FAI³	FAm⁴	Pmic⁵
PB ⁶	48,90	23,14	31,50	56,74	-
PDR ⁷	65,72 ⁷	80,41 ⁶	63,53	84,57 ⁷	-
PNDR ⁷	35,03 ⁷	19,59	43,00	15,43 ⁷	-
Arginina ⁷	16,2	11,52	26,0	27,6	10,2
Histidina ⁷	6,1	3,11	6,6	6,0	4,0
Isoleucina ⁷	10,1	3,20	7,3	8,1	11,5
Leucina ⁷	17,2	5,88	13,8	15,9	16,3
Lisina ⁷	13,9	4,35	9,7	8,3	15,8

Metionina ⁷	3,2	1,71	3,7	2,9	5,2
Fenilalanina ⁷	11,6	5,30	12,5	12,1	10,2
Treonina ⁷	8,7	3,46	7,6	6,7	11,7
Triptofano ⁷	2,8	1,27	2,8	2,4	2,7
Valina ⁷	10,2	4,70	10,0	9,8	12,5
Total de AAE (% da PB)	45,3	44,51	42,6	40,1	-

¹Farelo de Algodão; ²Caroço de Algodão; ³Farelo de Algodão; ⁴Farelo de Amendoim; ⁵Proteína Microbiana; ⁶Expresso em porcentagem da matéria seca; ⁷Expresso em porcentagem da PB.

Fonte: Adaptado de Nutrient Requirements of Dairy Cattle (2001).

O farelo de soja (*Glycine max L.*) apresenta balanceada composição de aminoácidos (DE ALMEIDA et al., 2018), e é rico em lisina, AA essencial para a produção de carne (FARIA JR et al., 2009a). Por outro lado, o caroço de algodão (*Gossypum spp.*) combina elevada concentração energética e proteica, além de um teor de fibra satisfatório (COSTA et al., 2011). Este alimento apresenta-se como boa fonte de PNDR, mesmo quando não processado (LOBATO et al., 2009). Em contrapartida, o farelo de algodão, obtido após a prensagem do caroço para a remoção do óleo apresenta ampla variação no teor de PB. (TEIXEIRA et al., 2009). Esta variação, está associada à porcentagem de cascas inclusas neste coproducto (TEIXEIRA et al., 2009).

Devido ao processo de extração do óleo do caroço de algodão, o farelo é submetido à tratamento térmico, o que promove desnaturação das proteínas do alimento e inibe os sítios de ligação enzimática. Este processo reduz a degradação ruminal deste alimento, em função da falta de sítios de ligação para as enzimas bacterianas digestivas (TEIXEIRA et al., 2009), o que também permite que seja utilizado como fonte de PNDR. Entretanto, devido ao perfil de aminoácidos deste alimento ser inferior ao da proteína microbiana e ao do farelo de soja, o seu uso como única fonte proteica na dieta, pode causar deficiência de AA para os animais (WANAPAT et al., 2012; TEIXEIRA et al., 2009). Assim como o farelo de algodão, o farelo de amendoim (*Arachis hypogaea*), também é obtido após a extração do óleo do grão de amendoim. Esse co-produto apresenta maior teor de PB, quando comparado ao farelo de soja e ao farelo de algodão (PÔSSAS et al., 2009). Segundo Pôssas et al. (2009), o farelo de amendoim é pobre em AA essenciais, e este pode ser utilizado, apenas, como substituto parcial do farelo de soja.

2.3 ESTRATÉGIAS PARA CONTROLAR A DEGRADAÇÃO RUMINAL DAS PROTEÍNAS

Inúmeros processamentos têm sido testados, com o objetivo de proteger as proteínas da degradação no rúmen. Na nutrição de ruminantes, os principais tratamentos utilizados, são tratamentos térmicos (apenas o uso de temperaturas elevadas, ou com adição de carboidratos) e a utilização de compostos orgânicos, como os taninos e xilose (BRODERICK et al., 1991; HARO et al., 2019; VANEGAS et al., 2017) (BRODERICK; WALLACE; ØRSKOV, 1991; HARO et al., 2019; JAHANI-AZIZABADI et al., 2010; VANEGAS et al., 2017). Os tratamentos utilizados com o referido objetivo, devem aumentar a digestibilidade intestinal das proteínas e a biodisponibilidade dos aminoácidos para o animal (BRODERICK et al., 1991). Neste sentido, a técnica mais utilizada é o tratamento térmico, o qual tem como princípio a reação de Maillard (FRANCISQUINI et al., 2017). Segundo Francisquini et al. (2017), a reação de Maillard corresponde à uma cascata de reações que ocorrem sob aquecimento, a qual resulta na formação de complexos entre carboidratos e proteínas, que dão origem a polímeros estáveis. A formação de polímeros estáveis durante a reação de Maillard promove a indisponibilidade de AA essenciais, como a lisina, a partir da reação de redução da glicose com a lisina, o que leva a formação de melanoidinas (BRODERICK et al., 1991), polímeros de alto peso molecular responsáveis pela coloração marrom dos alimentos termicamente processados (FRANCISQUINI et al., 2017).

As melanoidinas, são compostos oriundos da reação de caramelização entre a glicose e os AA, e são substâncias de alto peso molecular resistentes a degradação enzimática (KANZLER; HAASE, 2020). Entretanto, segundo Broderick, Wallace e Ørskov (1991) a reação de formação das melanoidinas é reversível em meio ácido. Desta forma, os AA indisponibilizados no ambiente ruminal podem estar disponíveis a nível intestinal, em função digestão ácida das proteínas, no abomaso (KOZLOSKI, 2016). O excesso de calor aplicado ao processamento de alimentos de origem proteica pode levar à mudanças diversas no curso da digestão ácida de proteínas, e pode reduzir o valor biológico da proteína devido à captação intestinal e excreção urinária de peptídeos que foram indisponibilizados no processo de aquecimento (OSTE, 1989; PRONCZUK et al.,

1973). Segundo Pronczuk et al. (1973), o processamento excessivo de alimentos oriundo de autoclavagem pode reduzir o ganho de peso de ratos, sem influenciar no consumo de alimentos. Estes efeitos estão associados à dificuldade de acesso das enzimas digestivas aos complexos poteicos, e à absorção intestinal parcial de proteínas oriundas na reação Maillard sem clivagem, o que pode resultar em alta excreção de compostos de alto peso molecular oriundos da reação de Maillard na urina dos animais (PRONCZUK et al., 1973).

Entretanto, não apenas o aquecimento provocado por forno convencional pode afetar a digestão ácida *in vitro* de proteínas, mas também o aquecimento oriundo de forno micro-ondas, o que também pode reduzir a taxa de digestão ácida das proteínas (XIANG et al., 2020). Todavia, apesar do aquecimento indisponibilizar aminoácidos durante a digestão ácida devido à ligação do grupo ε-amino com as partes redutoras dos carboidratos (OSTE, 1989), o aquecimento provocado pelo forno micro-ondas não altera a sequência de AA das proteínas, apenas a conformação espacial e estrutura secundária das proteínas (XIANG et al., 2020). O aquecimento excessivo dos alimentos pode provocar a formação de pontes de isopeptídeos entre aminoácidos específicos e os indisponibilizar nos processos digestivos e absorтивos, além de reduzir o valor biológico das proteínas e acentuar a excreção urinária de compostos nitrogenados (OSTE, 1989; PRONCZUK et al., 1973; XIANG et al., 2020).

Nas fábricas de rações, a tostagem de grãos em tambor rotatório é o método mais comum de processamento (DIAS JÚNIOR et al., 2017). De acordo com Dias Júnior et al. (2017), neste processo, os grãos permanecem em um túnel, no qual há a injeção de ar seco, a uma temperatura de 120-125°C. Contudo, há dificuldade na padronização no ponto de tostagem nesta técnica (CAFÉ et al., 2000). As temperaturas de tostagem dos grãos podem variar de 115 até 145°C (RAFIEE-YARANDI et al., 2016). Além da tostagem por tambor rotatório, os alimentos também podem ser submetidos à tostagem pelo método de vapor úmido, ou vapor seco. No primeiro método, os alimentos são submetidos à adição indireta de vapor (105°C), seguido da tostagem (CAFÉ et al., 2000). No método por adição de vapor úmido, os alimentos são submetidos a injeções de vapor úmido a 125°C, durante 10 a 15 minutos e à aplicação de força mecânica (2kgf cm⁻²) (DIAS JÚNIOR et al., 2017).

Outro processamento utilizado, é o tratamento de alimentos com a adição de taninos. Os taninos são compostos fenólicos que atuam como proteção química das plantas, contra predadores como pássaros, patógenos e outros competidores presentes no ecossistema (BUTOLO, 2010). Estes compostos podem ser subdivididos em duas categorias: a) taninos hidrolisáveis, que são poliésteres de ácido gálico e outros açúcares, e são pouco frequentes na natureza; b) taninos condensados, que são polímeros de flavonoides fenólicos, amplamente encontrados na natureza (BRODERICK et al., 1991). No rúmen, os taninos condensam-se com as proteínas quando o pH do rúmen está acima da faixa normal (5,5 -7,0). Contudo, a proteína é liberada do complexo quando estes chegam ao abomaso, em pH ácido (3,0) (BRODERICK et al., 1991). A complexação dos taninos com as proteínas, ocorre devido a formação de pontes de hidrogênio entre estes dois elementos, que dá origem a compostos estáveis (BUTOLO, 2010). A formação destes complexos, reduz a utilização do nitrogênio a nível ruminal (NAUMANN et al., 2018).

A inclusão de taninos na alimentação de animais ruminantes pode ser feita de duas formas: a) pelo fornecimento de alimentos que contenham tanino (NAUMANN et al., 2018); b) adição aos ingredientes de maneira isolada (BRODERICK et al., 1991). Entretanto, alguns critérios devem ser observados em relação ao uso de taninos: 1) Os complexos de tanino e proteínas devem ser estáveis no rúmen, mas não devem interferir na digestão da proteína a nível intestinal; 2) A adição dos taninos não deve interferir adversamente na população microbiana do rúmen; 3) Os taninos não devem causar danos aos animais (BRODERICK et al., 1991).

Já existem no mercado produtos que utilizam alimentos tratados para elevar seu teor de PNDR, são os chamados alimentos “bypass”. A proteína bypass, nada mais é do que a fração de PNDR dos alimentos (VAN SOEST, 1994) e o farelo de soja e a soja bypass são os principais alimentos comercializados neste formato. Todavia, estes produtos são mais caros quando comparados às fontes proteicas comuns. Segundo dados do Centro Avançado de Estudos em Economia Aplicada da USP (Centro Avançado de Estudos em Economia Aplicada da USP, 2021), o quilograma do farelo de soja convencional custa, aproximadamente, R\$ 2,30 enquanto o quilograma da soja protegida

custa, aproximadamente R\$5,80. Neste sentido, o desenvolvimento de pesquisas para elucidar novos meios de proteção da fração proteica dos alimentos pode reduzir os custos da suplementação de PNDR (ROTTA et al., 2016) nas dietas para bovinos de corte em fase de terminação, e melhorar o desempenho animal (SANTOS; PEDROSO, 2011).

2.4 RESULTADOS DE ESTUDOS PARA ELEVAÇÃO DO TEOR DE PNDR DE ALIMENTOS PARA ANIMAIS RUMINANTES

O estudo realizado por Kazemi-Bonchenari et al. (2016), avaliou o tratamento térmico de farelo de soja. Os autores tiveram como objetivo, elevar o teor de PNDR da dieta e observar a interação com o teor de gordura desta, sobre o desempenho de bezerros da raça Holandesa. Não foram encontradas diferenças no desempenho dos bezerros que receberam a dieta com o maior teor de PNDR, provavelmente em função do desenvolvimento prematuro do rúmen dos bezerros utilizados no estudo (KAZEMI-BONCHENARI et al., 2016). Na revisão apresentada por Haryanto et al. (2014), os autores apresentaram resultados positivos sobre o desempenho de bovinos de leite, que receberam dietas que continham tanino condensado. Segundo os autores, espécies de plantas que possuem tanino em sua composição possuem maior fração PNDR, o que pode melhorar o desempenho animal, por possivelmente aumentar a quantidade de AA que chega ao intestino delgado.

Entretanto, a biodisponibilidade de AA a nível intestinal depende diversos fatores como a fonte de proteína utilizada, a forma como a mesma chegará ao intestino delgado (peptídeos, aminoácidos ou proteínas intactas), sua digestibilidade, forma de processamento dos alimentos, e não somente do teor de PNDR dos mesmos (TITGEMEYER, 2003; NASEM, 2016; NRC, 2001). No experimento realizado por Koenig & Bauchemin (2018), os autores avaliaram o efeito da inclusão do tanino condensado sobre as rotas de nitrogênio, digestibilidade dos nutrientes e fermentação ruminal da dieta de novilhas de corte cruzadas. Os autores verificaram redução na degradação ruminal da proteína, na excreção de nitrogênio via urina, e aumento do nitrogênio excretado nas fezes.

Todavia, a maioria dos estudos desenvolvidos avaliar a proteção da fração proteica dos alimentos utiliza como principal alimento o farelo de soja (KAZEMI-BONCHENARI et al., 2016; WALTZ & STERN, 1989; TUNCER & SACAKLI, 2003). Contudo, devido ao elevado custo do farelo de soja no Brasil, o estudo com outras fontes proteicas é interessante, na tentativa de elevar o teor de PNDR dos alimentos, e produzir alimentos alternativos aos já disponíveis no mercado.

2.5 TÉCNICAS IN VITRO PARA AVALIAÇÃO DE ALIMENTOS PARA ANIMAIS RUMINANTES

O método de avaliação da digestibilidade in vivo, é a principal técnica para avaliação da digestibilidade de alimentos, e utiliza animais estabulados (NOCECK, 1988). Entretanto, a técnica apresenta algumas dificuldades, como: alto custo, devido a necessidade de grande quantidade de animais e alimentos; não permite o teste de grande número de alimentos ou aditivos ao mesmo tempo; e necessidade de longos períodos de adaptação dos animais à dieta e execução das coletas de amostras (HRISTOV et al., 2012). Além da avaliação in vivo, a técnica da degradabilidade ruminal in situ também permite estimar a degradabilidade da fração proteica dos alimentos com o uso de animais fistulados (HRISTOV et al., 2019; VAN ZANT, COCHRAN & TITGEMEYER, 1998). Contudo, assim como a técnica in vivo, a avaliação in situ apresenta-se onerosa, devido ao procedimento operatório para obtenção dos animais fistulados, além da invasividade do procedimento (HRISTOV et al., 2012; HRISTOV et al., 2019).

As principais fontes de variação nos valores de proteína e energia dos alimentos estão associadas a digestibilidade e a degradabilidade ruminal dos mesmos (LÓPEZ, 2005). Desta forma, para avaliar a resposta produtiva dos animais frente a novos alimentos e aditivos, bem como avaliar o metabolismo e os aspectos da digestão, técnicas alternativas de avaliação de alimentos têm sido propostas (LÓPEZ, 2005; MIZUBUTI et al., 2014; SCHOFIELD et al., 1994). Dentre estas metodologias alternativas, destacam-se os sistemas de avaliação in vitro, os quais simulam modelos biológicos do processo de digestão dos

alimentos no organismo animal, com diferentes graus de complexidade (LÓPEZ, 2005; TILLEY & TERRY, 1963).

A execução de ensaios *in vitro* apresentam vantagens como baixo custo de execução, confiabilidade nos resultados, permitem a estabilidade físico-química da fermentação, excluem a necessidade de grande número de animais fistulados (ALCALDE et al., 2001; LÓPEZ, 2005; TAGLIAPIETRA et al., 2011), permitem avaliar um grande número de amostras simultaneamente e também a testagem de substâncias e medicamentos com potencial toxicidade, sem prejuízos a saúde animal (HRISTOV et al., 2012). Em contrapartida, apresentam entraves, como a dificuldade em manter as colônias de protozoários (HRISTOV et al., 2012), importantes microrganismos detoxificadores de compostos a nível ruminal e que apresentam papel na degradação dos alimentos fibrosos (OLIVEIRA et al., 2007). As principais metodologias *in vitro* utilizadas são a digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS), e a produção cumulativa de gases *in vitro*.

Atualmente, a técnica automática para avaliar a produção cumulativa de gases *in vitro* consiste na incubação de amostras de alimento, que servem como substrato para o crescimento microbiano (THEODOROU et al., 1994), sob agitação e temperatura de 39°C. Os alimentos são incubados em frascos de vidro com adição de inóculo ruminal, solução de saliva artificial composta por macro e micro minerais, além de solução tampão para manter o pH do meio próximo ao pH ruminal (SCHOFIELD et al., 1994; TAGLIAPIETRA et al., 2011). Os frascos utilizados na análise são equipados com transdutores de pressão, que via internet wireless emitem um sinal para um computador, o qual registra a pressão acumulada dentro dos frascos em tempos pré-estabelecidos e gera os gráficos de pressão cumulativa instantaneamente (PELL and SCHOFIELD, 1993; SCHOFIELD et al., 1994). Esta técnica, considera a conversão dos principais carboidratos da dieta de animais ruminantes (amido, pectinas, celulose e hemicelulose) em gases oriundos da fermentação (H₂, CO₂ e CH₄), além da reação dos AGVs com o bicarbonato (MIZUBUTI et al., 2014). Entretanto, apresenta limitações que devem ser consideradas, como: baixo volume de amostra utilizado, o que amplifica a possibilidade de erro experimental; dificuldade para padronizar e conservar os alimentos utilizados, uma vez que é

necessária a correção dos desvios causados no perfil da população microbiana encontrada no líquido ruminal; in vitro, a produção de gás de determinado alimento pode ser baixa, contudo, in vivo este alimento pode apresentar alto coeficiente de digestibilidade; as flutuações do pH dos alimentos e do líquido ruminal no sistema fechado, podem interferir negativamente no desenvolvimento da flora microbiana, o que reduz as taxas de degradação dos alimentos ao final do período de incubação (MIZUBUTI et al., 2014).

Baseado no mesmo princípio, a análise de DIVMS utiliza jarros de fermentação em condições similares, onde são inseridos saquinhos de papel filtro que contém as amostras com peso conhecido, além da adição de inóculo ruminal e solução tampão (SILVA et al., 2017). A técnica, originalmente proposta por Tilley & Terry (1963), era baseada em duas etapas de digestão, em tubos de ensaio: a primeira com utilização de inóculo ruminal e solução tampão; a segunda, após 48 horas de incubação, o resíduo da amostra inicial era submetido a digestão ácida, com pepsina. Ao longo dos anos, a metodologia sofreu modificações, até chegar no proposto por Holden (1999) e por Mabjeesh; Cohen; Arieli (2000), denominada de rúmen artificial, a qual permite a incubação de inúmeras amostras dentro dos jarros, em incubadora específica. A DIVMS permite estimar a fração digerida dos alimentos no rúmen, a partir do cálculo por diferença de peso entre a amostra inicial e o resíduo recuperado ao final de 48 horas de incubação (SILVA et al., 2017), sendo considerado como digestível a fração degradada pelos microrganismos ruminais (ALCALDE et al., 2001). O uso do rúmen artificial reduz o labor despendido para execução da técnica, e permite alcançar resultados semelhantes aos encontrados por Tilley & Terry (1963) (SILVA et al., 2017). Entretanto, sua limitação está nas análises de alimentos com baixos teores de nutrientes para serem digeridos, como forragens de baixa qualidade (MABJEESH et al., 2000) e no pequeno acúmulo de gás nos saquinhos ao final da incubação, o que pode interferir nos valores de DIVMS (HOLDEN, 1999).

Os sistemas in vitro são alternativas viáveis econômica e experimentalmente, para avaliação de alimentos para animais ruminantes. Seu uso favorece grandes experimentos, e seus resultados podem fornecer informações valiosas para a posterior execução de ensaios in vivo. Desta forma,

é preciso avaliar se a inclusão de ingredientes (alimentos que passaram por diferentes técnicas de processamento para aumentar o teor de PNDR) em dietas para bovinos de corte altera os parâmetros de fermentação ruminal e a cinética ruminal. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da utilização de alimentos que passaram por diferentes técnicas de processamento para aumentar o teor de PNDR sobre os parâmetros da fermentação e cinética ruminal em sistemas *in vitro*.

3 ARTIGO 1: EVALUATION OF DIFFERENT PROCESSING METHODS TO PROTECT COTTONSEED (*GOSSYPIUM SPP*) AND PEANUT (*ARACHIS HYPOGAEA*) MEALS PROTEIN FROM IN VITRO RUMINAL DEGRADATION

Os resultados desta dissertação são apresentados na forma de artigo (a ser submetido, submetido, aprovado ou publicado), com a seções de acordo com as orientações da Revista *British Journal of Nutrition* (ISSN-0007-1145 (Print), 1475-2662 (Online)).

Authors: Fernanda Rigon¹, Pedro D. Benedeti¹, Elaine Maganani², Amanda R. Cagliari¹, Kalista E. Lorean¹, Ana C. Casagrande¹, Bruna R. Amancio², David A. B. Pereira², Henrique A. M. Borges³, Hugo F. Monteiro⁴, Aline Zampar¹, Marcos I. Marcondes⁵, Renata H. Branco², Eduardo M. de Paula²

¹Department of Animal Science, Santa Catarina State University, Chapecó, Santa Catarina, 89815-630, Brazil

²Beef Cattle Research Center, Instituto de Zootecnia, Sertãozinho, São Paulo, 14160-900, Brazil

³Faculty of Agricultural Engineering, São Paulo State University Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Jaboticabal, SP, 16050-680, Brazil

⁴Department of Population Health and Reproduction, University of California, Davis, California, 95616-5270, United States

⁵Department of Animal Science, Washington State University, Pullman, Washington, 99164-6310, United States

3.1 INTRODUCTION

Meeting the metabolizable protein requirements for medium and high-performance beef cattle is essential to maximize animals' productive growth, since the microbial protein synthesized in the rumen is not enough to meet their protein requirements (1). In this case, the diet must supply a high amount of rumen undegraded protein (RUP), that will provide amino acids directly to the ruminant's small intestine (2,3). Nevertheless, most protein sources usually used

in beef cattle diets are extensively degraded in the rumen and have variable levels of RUP (4–6). Thus, different processing methods have been developed to increase the RUP content of protein sources for beef cattle (5).

The extension of ruminal protein degradation of protein sources may vary according to their intrinsic characteristics or by applying different processing methods (1,7). Recently research have demonstrated that the use of tannins (8–10), heat treatment with microwave (11), toasting (12), autoclaving (13) and xylose (14) in protein sources can elevate the RUP content of feed and increase the flow of amino acids to the small intestine. The application of these strategies might contribute both to the reduction of feeding costs and environmental nitrogen excretion (3,15), which is desirable from a sustainable perspective. However, there is a lack of information about the effects of these processes on the kinetics and ruminal fermentation parameters.

Most commercial sources of RUP are based on heat-treated soybean meal (16) and have high costs. Nevertheless, other feasible sources of protein are widely used as an alternative to soybean meal in beef cattle feed nutrition in tropical regions, such as cottonseed and peanut meals (17). These byproducts can be viable alternatives to replace soybean meal, without impair animal performance (9,18). However, little is known about the effect of different strategies to increase RUP on cottonseed and peanut meal. The objective of this study was to evaluate the effects of different processing methods to increase RUP content on the in vitro ruminal gas production (GP) kinetics, fermentation parameters and in vitro dry matter digestibility (IVDMD) of cottonseed and peanut meals, using in vitro systems. We hypothesized that processing cotton and peanut meals with autoclave, heat, xylose, or tannin might decrease the total GP and change the ruminal fermentation compared to unprocessed feed.

3.2 MATERIAL AND METHODS

3.2.1 Experiment location and ethic committee approval

The experiment was conducted at the Instituto de Zootecnia, Beef Cattle Research Center, located at Sertãozinho, São Paulo, Brazil. The experiment was

approved by the Animal Use Ethics Committee of the Instituto de Zootecnia under the protocol no 249-19.

3.2.2 Previous study

A previous study was performed to evaluate different techniques to increase the RUP content of commonly protein sources used in finishing beef cattle diets. The study evaluated 49 treatments using two different protein sources [cottonseed (*Gossypium spp.*) and peanut (*Arachis hypogagea*) meals], which were subjected to the following processing methods: a) samples without processing, used as control treatments; b) autoclaving at 127°C with internal pressure of 117 kPa at different times (8, 16 and 24 minutes), with and without the addition of xylose (2%); c) toasting in a drying oven at 150°C, at different times (30, 60 and 90 minutes), with and without the addition of xylose (2%); d) microwave browning at different times (2, 4 and 6 minutes), with and without the addition of xylose (2%); e) main commercial product used as a RUP source (SoyPass®, Nutron Cargill, São Paulo, SP, Brazil); f) treatment with three different concentrations of tannin solution [(Tanfeed® 70% Tannic Acid (700g / kg min): 2.0; 4.0; and 6% (DM basis). In situ (19) and in vitro (20,21) techniques were used to determine rumen degradable protein (RDP), RUP, and intestinal digestibility of crude protein (CP).

Therefore, to perform our study, we have selected the eight best processing methods [four for each feed (cottonseed and peanut meals)], based on the results of in situ degradation kinetics and in vitro intestinal digestibility of protein. The two protein sources were individually analyzed in two identical experiments.

3.2.3 Experimental designs

Experiment 1 (cottonseed meal) was conducted aiming the evaluation of cottonseed meal by using the follow six treatments: negative control, conventional cottonseed meal (Ncontrol), cottonseed meal heat treated with 2% xylose (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) and heated on microwave oven for 2 minutes (Microwave oven), cottonseed meal treated with 2% xylose and heated on conventional oven for 90 minutes (Conventional oven), cottonseed meal

treated with 2% xylose and heated on autoclave for 8 minutes (Autoclave), cottonseed meal treated with 6% tannin (Tannin; *Acacia mearnsii* extract - TANAC, Montenegro, RS, BR) and a commercial soybean based product, as positive control (Pcontrol; SoyPass®, Nutron Cargill, São Paulo, SP, Brazil).

For experiment 2 (peanut meal), the peanut meal was evaluated with the following treatments: conventional peanut meal, as negative control (Ncontrol), peanut meal treated with 2% xylose and heated on microwave oven) for 6 minutes (Microwave oven), peanut meal heat treated on conventional oven for 60 minutes (Conventional oven), peanut meal treated with 2% xylose and heated on autoclave for 24 minutes (Autoclave), peanut meal treated with 6% tannin (Tannin), and the same commercial soybean based product, as positive control (Pcontrol).

For both experiments, the experimental design and the operational procedures followed the same procedures. Thus, a 25-bottle automated in vitro gas production system (Ankom Technology, Macedon, NY, USA) equipped with wireless pressure sensors connected to a computer was used to evaluate the ruminal fermentation pattern of tested ingredients. Thus, treatments were evaluated in three 48-hours fermentation incubations to assess the in vitro gas production profiles, and ruminal fermentation parameters. In each incubation, ingredients were incubated individually in 250 mL bottles, which were randomly arranged in the incubator. Thus, each fermentation batch had 4 replicates of each treatment, plus 1 blank (only rumen/mineral/buffer solution), totalizing 75 observations. The in vitro gas production (IVGP) assay of cottonseed meal was performed first, and after all the incubation batches of cottonseed meal, we started the IVGP assay of peanut meal.

For the IVDMD assay, a four jars incubator system (TE-150, Tecnal, Piracicaba, SP, Brazil) was used under rotation and temperature control, in three 48-hours fermentation incubations. Each fermenter jar has received 3 filter bags (F-57, Ankom Technology, Macedon, NY, USA) per treatment plus 3 blanks, totalizing 21 filter bags per jar, and 63 observations. The IVDMD of cottonseed and peanut meal were performed simultaneously.

3.2.4 Chemical analysis

All feeds were ground through a 1 mm screen (Wiley mill; Thomson Scientific Inc., Philadelphia, PA). The chemical analyses were performed following the AOAC methodology (22). Samples were analyzed for dry matter (DM, method 934.01), ashes (method 938.08), crude protein (CP, method 990.13). The ether extract values used were obtained from the Brazilian Feed Composition Tables for Ruminants (23). Organic matter (OM) was calculated by the difference between DM content and ashes. The neutral detergent fiber (NDF) followed the methodology proposed by Van Soest et al. (24) and adapted for the fiber determiner (TE-149, Tecnal, Piracicaba, SP, BRA). The chemical composition of the ingredients based on cottonseed and peanut meal are presented in Tabela 4.

3.2.5 Operational procedures

3.2.5.1 *Ruminal fluid collection and buffer solutions preparation*

The rumen fluid was collected from three Nellore steers cannulated in the rumen (average body weight of 550 kg). Steers were fed once a day in the morning with a total mixed ration composed by 60% of corn silage and 40% of concentrate (ground corn grain, citrus pulp pellet, soybean meal, and mineral mixture). Two hours after feeding (25), 2000 mL of rumen fluid were collected from each animal, immediately filtered through 4 layers of cheesecloth and kept into pre-warmed (39oC) thermal bottles and immediately transported to the laboratory. For IVMDM incubation, the rumen fluid collection procedures were similar to those performed the IVGP assay. Nevertheless, approximately 30 g of rumen solid particles were also added into the fermenter jars (26).

The IVGP buffer mineral solution was adapted from the methodology described by Menke & Sateingass (27). The final solution was composed by 25 mL of rumen fluid and 50 mL of buffer mineral solution (1:2 v/v, 75mL). The IVDM buffer solution was prepared according to McDougall (28), and final solution was composed by 1600 mL of buffer solution plus 400 mL of rumen fluid for each jar. For both experiments, the rumen fluid was mixed with the buffer mineral solutions in a water bath (39°C) under anaerobic condition by continuous infusion of N2.

3.2.5.2 *In vitro* gas production

The samples were introduced into the bottles and hydrated with deionized water to avoid particle dispersion. Each bottle received 0.5 ± 0.05 g (DM basis) of each ingredient. The headspace was continuous flushed with N₂ to maintain the anaerobic condition of the medium. After sample incubation, bottles were closed and placed in a ventilated incubator (EI-450T, ENGCO, Piracicaba, SP, BR) under constant heating (39°C) and agitation (83 rpm) for 48 h. The system was set to read cumulative pressure for every 5 minutes and data were recorded every 60 minutes.

The cumulative pressure data at 24 and 48 hours were converted to mL, according to Tagliapietra et al. (29), wherein GP (mL) = (P_c/P_o) × V_o, where P_c is the cumulated pressure change (kPa) in the bottle headspace; V_o is the bottle headspace volume (170 mL), P_o is the atmospheric pressure read by the equipment at the beginning of the measurement. The final GP volumes were corrected for inoculum contribution by subtracting the final GP of the blank bottles. Cumulative pressures were fitted in a one-pool exponential model such as the one described by Huhtanen et al. (30) to predict fermentation rate and gas pool size. The metabolizable energy (ME) was calculated according to Menke and Steingass (27), as ME (MJ/kgDM) = 1.06 + 0.157GP + 0.084CP + 0.22CF – 0.081CA, where GP is the net gas production (ml/200 mg DM) at 24 and 48h; CP, CF and CA are crude protein, crude fat and crude ash (% DM), respectively. The in vitro organic matter digestibility (IVOMD) was calculated according to Menke & Steingass (27), as IVOMD (g/kg DM) = 31.55 + 0.8343GP, where GP is the net gas production (ml/200 mg DM) at 24 and 48h.

3.2.5.3 Ammonia-nitrogen (NH₃-N), pH, and volatile fatty acids (VFA)

The solution pH was measured at the beginning and at the end of each incubation (48h). At the same time, one subsample was collected from 2 bottles per treatment, for further determination of VFA and NH₃-N concentration. The collected material was filtered through 4 layers of cheesecloth. Then, 0.2 mL of a 500 mL/L H₂SO₄ solution was added to preserve the samples for further determination of NH₃-N. The NH₃-N concentration was determined by the colorimetric method described by Chaney and Marbach (31). The total VFA

concentrations and profiles were determined using gas chromatography (Nexis CG-2030AF, Shimadzu, Montevideo, Uruguay equipped with a fused silica capillary colum [30m x 0.53nm x 0.5µm film thickness, Sulpelco, Darmstadt, Germany]) with Helium as a carrier gas (flow rate of 34.5mL/min-1).

3.2.5.4 *In vitro dry matter digestibility*

The ingredients were individually weighed (0.50 g per bag) in filter bags (F-57, Ankom Technology, Macedon, NY, USA). Then, bags were heat-sealed and placed inside each fermenter. At the end of the 48-hours incubation, bags were washed with cold water and analyzed for DM (32). The IVDMD was calculated as IVDMD, g/kg DM = $(100 \pm [W3 - (W1 \times C1)]) \times 100 / (W2 \times DM / 10)$ x 10, where: W1 = bag tare weight, W2 = sample weight, W3 = final bag weight after in vitro incubation, C1 = blank bag correction (final oven-dried weight/original blank bag weight), DM = g/kg dry matter.

3.2.6 Statistical analysis

All results were tested for residual normality and variance homogeneity (33). For IVGP of Exp. 1 and Exp. 2 data were collected and analyzed according to a randomized block design, using mixed models, and considering ingredients as fixed effects and incubation as a random. The bottles averages within each incubation were considered as experimental units. Analysis of variance was performed and when it was significant, comparison of treatment averages was performed using the Tukey test (5%). The NLIN procedure of SAS 9.4 was used to estimate fermentation rate and gas pool size. The parameters of the nonlinear functions were then compared using linear regression and differences were declared at P < 0.05. For IVDMD, in both experiments, the design used was also in randomized blocks using mixed models and considering the ingredients as fixed factors and incubation as a random factor. Bag averages within each incubation were considered as experimental units. All statistical procedures were performed using SAS 9.4 for Windows (Statistical Analysis Institute System, Inc., Cary, NC, USA) through the MIXED and GLIMMIX procedures and differences were declared at P < 0.05.

3.2.7 Results

3.2.7.1 Experiment 1: cottonseed meal

The Ncontrol had the highest fermentation rate (%/h-1), compared to processing methods ($P < 0.001$; Tabela 5; Figura 3). Furthermore, Conventional oven had the lower fermentation rate compared to Ncontrol and Pcontrol. ($P < 0.001$). However, Conventional oven had also the greater gas pool size ($P < 0.001$) compared to Ncontrol and Pcontrol, while Tannin had the lowest value for this parameter ($P < 0.001$), in comparison to Ncontrol and Pcontrol. Tannin had the lowest values of total GP (mL/g DM; at 24 and 48h), ME and IVOMD, in comparison to Ncontrol and Pcontrol ($P < 0.001$), but GP (24h) was similar to Conventional oven and Autoclave for GP (48h) and similar to Microwave oven and Conventional oven and Autoclave for IVOMD.

Feed processing did not change pH values ($P = 0.31$, Tabela 6). The Ncontrol had the greater production for total VFA (mM/g DM; $P < 0.001$), compared to Pcontrol, and was similar to Microwave oven. Regarding VFA profile (mol/100 mol), Tannin had the lowest production of butyrate ($P = 0.021$), iso-valerate ($P = 0.006$) and total branched-chain VFA (BCVFA) ($P < 0.001$), in comparison to Ncontrol and Pcontrol. On the other hand, Pcontrol had the greatest values of butyrate ($P = 0.021$), iso-valerate ($P = 0.006$) and total BCVFA ($P < 0.001$), compared to Ncontrol. Processing methods did not affect acetate ($P = 0.62$), propionate ($P = 0.94$), and iso-butyrate ($P = 0.23$) concentrations, as well as acetate: propionate ratio ($P = 0.93$) and NH₃-N concentration ($P = 0.19$). For IVMD (g/kg DM), Tannin and Conventional oven had the lowest values ($P < 0.001$, Figura 4A), while Pcontrol had the greater value ($P < 0.001$), in comparison to Ncontrol.

3.2.7.2 Experiment 2: peanut meal

Regarding ruminal kinetics, Pcontrol had the greater fermentation rate (%/h-1), while the Conventional oven had the lower value ($P < 0.001$; Tabela 7, Figura 5), both compared to Ncontrol. Tannin had the lowest values for the total GP (mL/g DM; at 24 ($P < 0.001$), however, was similar to Microwave oven, Conventional oven, Autoclave and Pcontrol. For the GP (48-h), Tannin had the lower value ($P = 0.006$), and Pcontrol had the greater results for this this

parameter, when compared to Ncontrol. Tannin had also the lowest values for IVOMD (g/kg DM; $P = 0.006$) and ME (MJ/kg DM; $P < 0.001$), in comparison to Ncontrol and Pcontrol.

The Pcontrol treatment had the lowest value for pH ($P < 0.001$), while Tannin had the highest results for this parameter ($P < 0.001$; Tabela 8), in comparison to Pcontrol. There were no differences among processing methods for total VFA (mM/g DM, $P = 0.57$). For VFA profile (mol/100 mol), Ncontrol had the lowest propionate concentration ($P = 0.008$) and the greatest values of butyrate ($P = 0.001$), iso-valerate ($P < 0.001$), total BCVFA ($P < 0.001$) and acetate: propionate ratio ($P = 0.01$), compared to Pcontrol. In contrast, Tannin had the lowest concentration of butyrate ($P = 0.001$), iso-butyrate ($P = 0.044$), iso-valerate ($P < 0.001$) and total BCVFA, when compared to Ncontrol and Pcontrol ($P < 0.001$). Regarding the NH₃-N (mg/dL) concentrations, Autoclave had the highest value ($P = 0.03$), in comparison to Ncontrol and Pcontrol. The Conventional oven and Tannin were similar and had the lowest values for IVDMD (g/kg DM; $P < 0.001$), while Ncontrol had the greater value ($P < 0.001$, Figura 4B), compared to Pcontrol.

3.2.8 Discussion

In vitro gas production has a close relationship with digestibility and energetic feed values for ruminants, when incubated with rumen fluid (27). In this way, many factors can affect the fermentation rate of feed, among them, its chemical composition and processing methods (1,7). Thus, feeds with high content of fermentable substrates due to the absence of processing, should have greater fermentation per unit of time. The applied heat may reduce the fermentation rate of the feed due to the Maillard's reaction (34). The Maillard's reaction forms stable polymers among carbohydrates and proteins (34,35), which are resistant to enzymatic attack by ruminal microorganisms (2,36). The addition of reducing sugars, such as xylose may also contribute to reducing ruminal protein degradation, since there is a Maillard reaction between the aldehyde groups of xyloses and the amino acids(14). Furthermore, higher RUP levels can lead to a lower in vitro fermentation rate(6). Dry-heating the feed reduces ruminal

degradation of potentially fermentable fraction (37), what may have contributed to our results. However, for cottonseed and peanut meals, the Conventional oven had the greater gas pool size, and we believe that these results may be linked to the lower fermentation rate. Furthermore, the larger gas pool size may represent a smaller fermentation per unit of time, and a greater extent of ruminal degradation. As we could observe in Figuras 3 and 4, the GP curve rose slowly, and production continued to rise until the end of the incubation. Lower fermentation rates can result in a greater extent of degradation of less soluble fractions (38,39), due to the longer residence time of these fractions in the ruminal environment (38). These results can be better understood when viewing figuras 3 and 4, since the gas production curve of the Conventional oven did not reach a plateau, for cottonseed and peanut meals. These factors can lead to higher final gas production.

Different types of processing can alter the solubility of proteins, which can affect the extent of ruminal fermentation and final GP (7,40). The Tannin presented the lowest total GP, for cottonseed and peanut meals. These results may be attributed to the formation of complexes between tannin and proteins via hydrogen bonds (8,41). Tannins form stable complexes in the rumen due to rumen pH, and these complexes prevents the ruminal protein degradation (41,42). Our results were similar to that found by Adejoro et al. (43), who observed a reduction in total GP in the first 24h of incubation with the inclusion of tannins in ruminant diets. According to these authors, the inclusion of tannins on ruminant diets can reduce the dry matter digestibility (as well as GP) due the tannins effect over the ruminal microbial population. Similar results were reported by Min et al. (44), the authors noticed that the in vitro GP (mL/g DM) linearly reduced with the inclusion of tannins present in peanut skin, during a 24-hour incubation period of wet distiller grains. They attributed the reduction on GP values to the to the complex formed between tannins and proteins. In general, a close correlation is expected between GP and the digestibility of the organic substrates (27). In our study we could observe that Tannin had also the lowest IVOMD for both feeds. These results, associated with those for total GP, may be associated to the reduction in rumen protein degradability. A study evaluating the effect of different levels of condensed tannins performed by Koenig and

Beauchemin (5) indicate a reduction in OMD due to the tannins' effects on the rumen protein degradation and ruminal fermentation.

Lower GP values can result in lower ME values, since there is less substrate available for rumen microbes (27,45). The Tannin applied in both cottonseed and peanut meals promoted lower ME values. This fact could be explained by the chemical composition of the substrate, since feed processing to elevate the RUP content can contribute to increases in the NDF proportion of feed, which can result in less fermentation (14,46). The use of tannins may also exert toxic effects on ruminal microorganisms, reducing fiber degradation and organic matter digestibility (43). The use of tannins promotes the formation of complex substances with low rumen solubility (41,42), which may have contributed to the lower ME values. Our results can be supported to the lowest total GP in 24 and 48h of Tannin. Others have observed a reduction in ME content when evaluating the inclusion of different levels of condensed tannins on ruminant diets (8). According to Castro-Montoya et al., the use of condensed tannins may reduce the substrate degradation by impairing the attachment of microbes to feed particles, and by its bond to nutrients and microbial enzymes. Therefore, our results suggest that the use of tannins may affect OM and fiber degradability, resulting in lower GP and ME.

Our results have demonstrated that Ncontrol had the greater total VFA concentration, compared to Conventional oven, Autoclave, for cottonseed and peanut meals, Ncontrol had the lower propionate concentration and had the greatest values of butyrate, iso-valerate, total BCVFA concentrations and acetate: propionate ratio. We believe that these results may be due to the lack of processing on cottonseed meal and its low NDF content, which can be a consequence of the greater fermentation rate and the greater total GP. In general, cottonseed meal only goes through the milling process, and this processing contributes to increased digestion of the total digestible nutrients content of this feed (7). For cottonseed and peanut meals, Tannin had the lowest BCVFA concentration, and we believe that this result may be linked to the effects of tannin in the rumen. These results may also be related to possible unavailability of carbohydrates, due to their possible complexation with proteins. The BCVFA are the result from the deamination of the branched-chain amino acids valine and

leucine, which give rise to iso-butyrate and iso-valerate, respectively (7,46). The BCVFA are essential for bacteria that break down fibrous carbohydrates (46). We believe that the lower BCVFA concentration of Tannin also may have contributed to a certain limitation in the growth of fibrolytic bacteria, the main group of bacteria found in the rumen (47), which can be explained by the lower total gas production and the smaller gas pool size. However, cottonseed and peanut meals have lower concentrations of leucine and valine, in comparison to soybean meal, which can lead to lower BCVFA concentration.

The ruminal degradability of proteins leads to the release of ammonia in the rumen fluid (46). We believe that the lack of response in NH₃-N may be due our study has been performed in a batch culture system, which does not allow the input of substrates and absorption of compounds, such as ammonia (48,49). In other way, in batch-culture systems, the bacterial metabolism changes in relation to the rumen of the donor animals, which imposes the need to renew the rumen fluid (50). These systems do not allow the removal of the final fermentation products, as well as the maintenance of the fermentation stability for long periods (48).

The IVDMD assay has been widely used due to its high correlation to in vivo digestibility (32,51,52). In our study, we could observe that Conventional oven and Tannin had the lowest values of IVDMD for cottonseed and peanut meals. We believe that these results may be associate to the effect that the heating and the addition of tannins cause over the feeds, as we mentioned before. Both treatments can hamper microbial access to feed particles, and this maybe contribute to the lower digestibility values (36,42). Nevertheless, effects of tannin on IVDMD have been conflicting. Like us, Min et al. (44) have observed a reduction on IVDMD with the linear increase of tannins from peanut skin on ruminants' diets. The authors suggested that plant tannins have the capability to form stable complex with proteins, minerals, and other polymers, which can cause delay in MS degradation. On the other hand, Castro-Montoya et al. (8) didn't find difference in the IVDM with the inclusion of different levels of Quebracho tannin extract in dairy rations. Doiron et al. (53) found a reduction on dry matter digestibility in a study evaluating the effects on protein structure by heating, which may be correlated to the changes in protein subfractions caused

by the heat. However, our results cannot be consolidated yet due to the variation in the profile of the evaluated feed and more evaluations of these ingredients are needed. Currently, there is no information available on in vitro assays using peanut and cottonseed meals in total mixed rations (TMR) for ruminants, which demonstrates the need for more complex studies with the feed in question.

3.2.9 Conclusion

Our study showed that, in general, the processing methods influenced ruminal kinetics and fermentation. Tannin had the most significant effects on the fermentation rate, total GP, IVOMD, ME, IVDMD and total BCVFA concentration for cottonseed and peanut meals, when compared to the Ncontrol. These results represent the possible inclusion of alternative sources of RUP in beef cattle nutrition, as feasible replacements for those that are conventionally used. However, these ingredients must be evaluated in experiments with TMR and in vivo studies, especially with peanut meal, due its higher IVOMD, ME and IVDMD values.

3.2.10 Acknowledgments

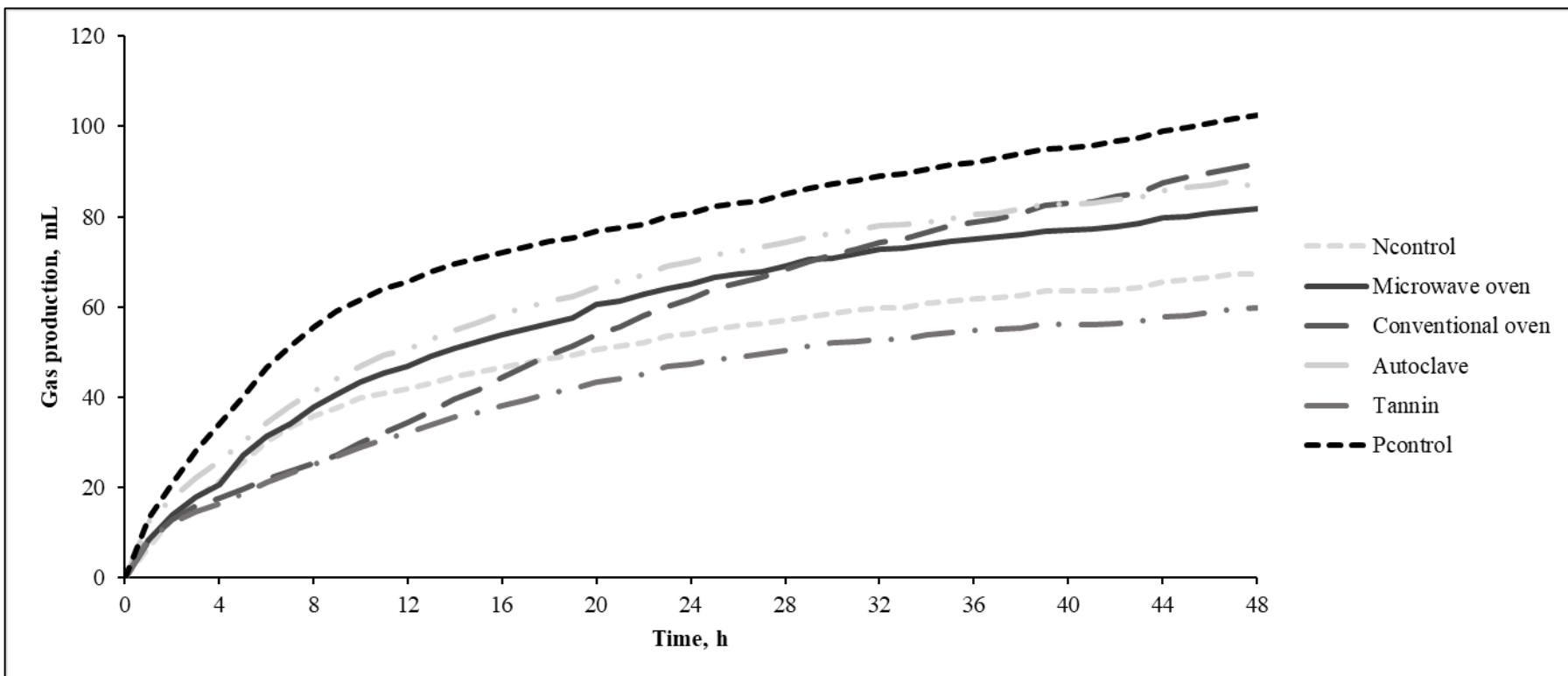
The authors thank for the members of the Laboratory of Nutrition and Ruminal Fermentation of the Beef Cattle Research Center of Instituto de Zootecnia for their assistance with sample collection and laboratorial analyses.

3.2.11 Financial support

The authors gratefully acknowledge the São Paulo Research Foundation (FAPESP) for funding the project (Process numbers: 2017/50339-5, 2018/19743-7, and 2019/07626-9), and the Santa Catarina State University for the master's scholarship.

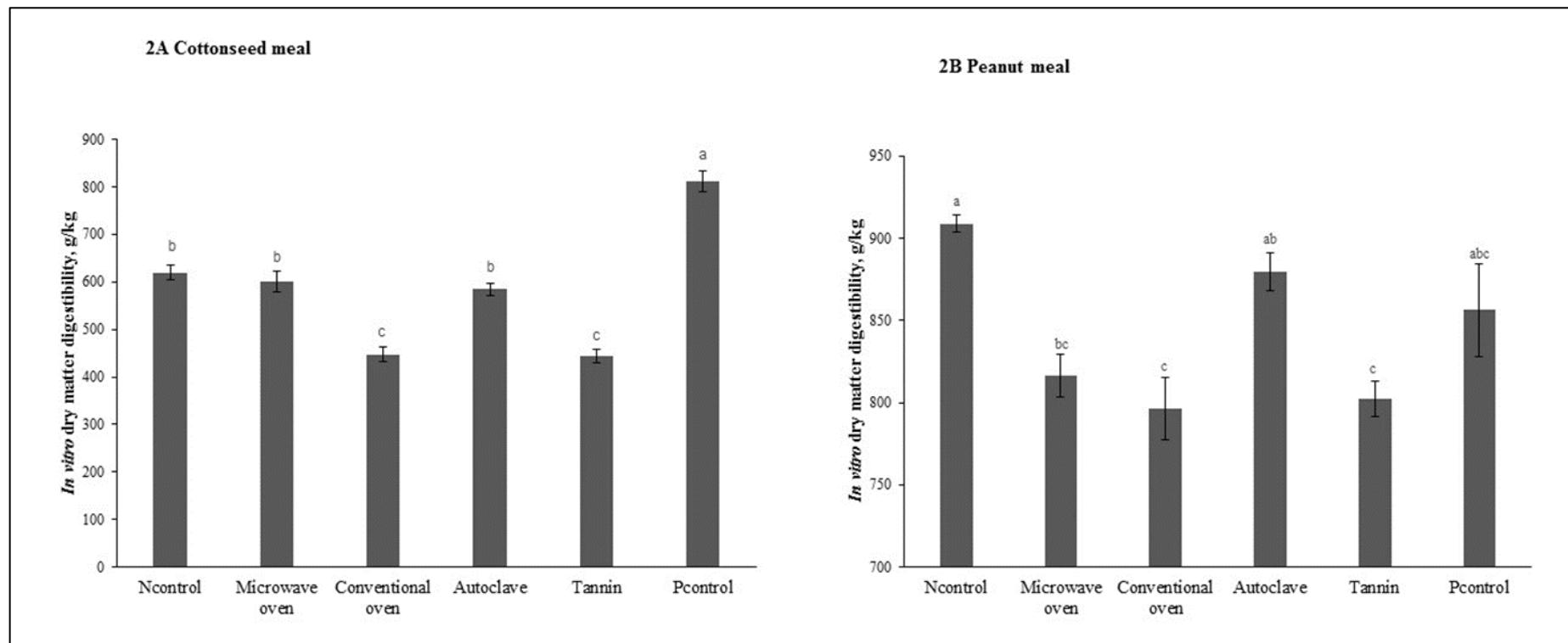
3.2.12 Figures

Figura 3 – Ruminal gas production profiles of the processing methods used for cottonseed meal, determined with the Ankom Gas Production System (Ankom Technology, Macedon, NY, USA).



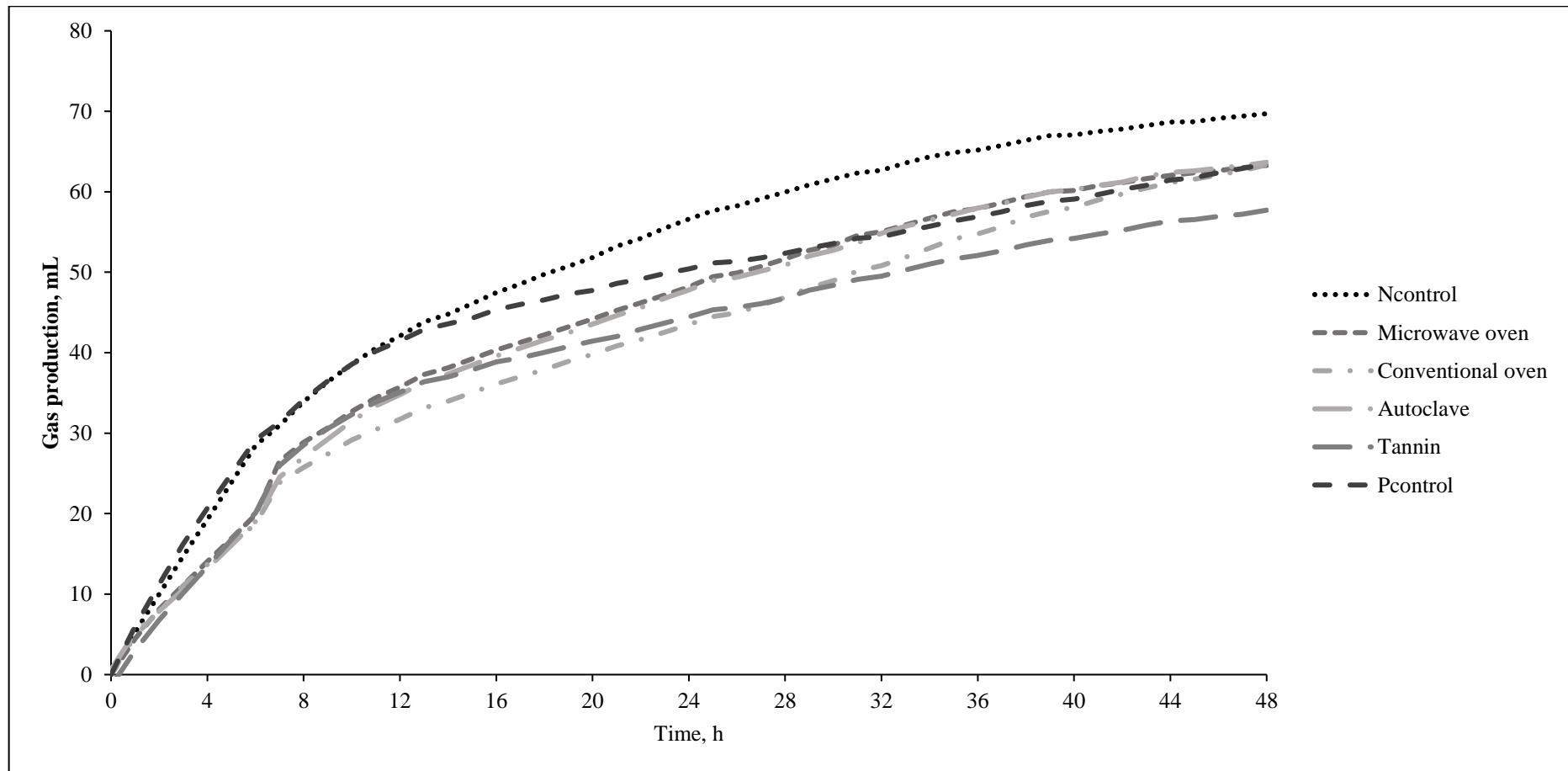
Negative control, conventional cottonseed meal (Ncontrol), cottonseed meal heat treated with 2% xylose and heated on microwave oven for 2 minutes (Microwave oven), cottonseed meal treated with 2% xylose and heated on conventional oven for 90 minutes (Conventional oven), cottonseed meal treated with 2% xylose and heated on autoclave for 8 minutes (Autoclave), cottonseed meal treated with 6% tannin and a commercial soybean-based product, as positive control (Pcontrol)

Figura 4 – The IVDMD of processing methodos (Ncontrol, Microwave oven, Conventional oven, Autoclave, Tannin and Pcontrol) for cottonseed and peanut meals, (Daisyll system, Ankom technology, NY, USA) in three consecutive 48-h fermentation batches.



^{a,b,c}Means with different superscripts are different ($P < 0.01$).

Figura 5 – Ruminal gas production profiles of the processing methods used for peanut meal, determined with the Ankom Gas Production System (Ankom Technology, Macedon, NY, USA).



Conventional peanut meal, as negative control (Ncontrol), peanut meal treated with 2% xylose and heated on microwave oven) for 6 minutes (Microwave oven), peanut meal heat treated on conventional oven for 60 minutes (Conventional oven), peanut meal treated with 2% xylose and heated on autoclave for 24 minutes (Autoclave), peanut meal treated with 6% tannin (Tannin), and a commercial soybean based product, as positive control (Pcontrol).

3.2.13 Tables

Tabela 4 – Chemical composition of ingredients used for cottonseed and peanut meals.

Ingredient ¹	Composition ² , g/kg of DM						
	DM, g/kg	OM	CP	EE	NDF	RDP ³ , g/kg of CP	RUP ³ , g/kg of CP
Experiment 1 – Cottonseed meal							
Ncontrol	910	937	543	16.4	169	682	317
Microwave oven	905	938	462	16.4	397	499	501
Conventional oven	923	941	472	16.4	471	267	733
Autoclave	899	943	450	16.4	351	413	587
Tannin	903	937	522	16.4	299	461	539
Pcontrol	909	936	565	19.4	141	350	649
Experiment 2 – Peanut meal							
Ncontrol	914	946	628	12.8	165	468	531
Microwave oven	928	947	639	12.8	240	318	682
Conventional oven	921	946	650	12.8	368	279	721
Autoclave	910	947	597	12.8	316	407	593
Tannin	912	948	580	12.8	257	464	537
Pcontrol	909	936	565	19.4	141	350	649

¹Negative control, conventional cottonseed meal (Ncontrol), cottonseed meal heat treated with 2% xylose and heated on microwave oven for 2 minutes (Microwave oven), cottonseed meal treated with 2% xylose and heated on conventional oven for 90 minutes (Conventional oven), cottonseed meal treated with 2% xylose and heated on autoclave for 8 minutes (Autoclave), cottonseed meal treated with 6% tannin and a commercial soybean based product, as positive control (Pcontrol); conventional peanut meal, as negative control (Ncontrol), peanut meal treated with 2% xylose and heated on microwave oven for 6 minutes (Microwave oven), peanut meal heat treated on conventional oven for 60 minutes (Conventional oven), peanut meal treated with 2% xylose and heated on autoclave for 24 minutes (Autoclave), peanut meal treated with 6% tannin (Tannin), and the same commercial soybean based product, as positive control (Pcontrol);

²DM = dry matter; OM = organic matter; CP = crude protein; EE = ether extract; NDF = neutral detergent fiber.

³Calculate according to the NRC (2001) model, where: RDP = A + B[Kd/(Kd + Kp)], where: RDP = RDP of the feedstuff, percentage of CP; A = Fraction A, percentage of CP; B = Fraction B, percentage of CP; Kd = rate of degradation of the B fraction, %/h; Kp = rate of passage from the rumen, %/h; RUP = B[Kp/(Kd + Kp)] + C, where: C = Fraction C, percentage of CP.

Tabela 5 – Effects of different processing methods applied to cottonseed meal on ruminal kinetics, total gas production, in vitro organic matter digestibility (IVOMD), and metabolizable energy (ME) in a gas production system.

Item	Processing methods ¹						SEM	P-value
	Ncontrol	Microwave oven	Conventional oven	Autoclave	Tannin	Pcontrol		
Fermentation rate, h	0.077 ^a	0.065 ^b	0.025 ^c	0.061 ^b	0.054 ^b	0.077 ^a	0.007	< 0.01
Gas pool size, mL/g DM	90.1 ^b	93.9 ^b	141 ^a	90.9 ^b	63.8 ^c	99.4 ^b	9.22	< 0.01
Total gas production, mL/gDM								
24h	74.4 ^{ab}	73.7 ^{ab}	62.0 ^{bc}	66.6 ^{ab}	47.5 ^c	80.9 ^a	7.13	< 0.01
48h	92.4 ^a	92.4 ^a	92.3 ^a	82.2 ^{ab}	60.3 ^b	102 ^a	8.63	< 0.01
IVOMD, g/kg DM ²	469 ^a	469 ^a	469 ^a	453 ^{ab}	416 ^b	487 ^a	1.44	< 0.01
Metabolizable energy, MJ/kg DM ³	8.37 ^{ab}	7.70 ^{bc}	7.89 ^{bc}	7.31 ^c	7.18 ^c	8.94 ^a	0.27	< 0.01

^{a,b,c} Means with different superscripts in the same row are different ($P < 0.05$);

¹Negative control, conventional cottonseed meal (Ncontrol), cottonseed meal heat treated with 2% xylose and heated on microwave oven for 2 minutes (Microwave oven), cottonseed meal treated with 2% xylose and heated on conventional oven for 90 minutes (Conventional oven), cottonseed meal treated with 2% xylose and heated on autoclave for 8 minutes (Autoclave), cottonseed meal treated with 6% tannin (Tannin) and a commercial soybean based product, as positive control (Pcontrol);

²In vitro organic matter digestibility: IVOMD (g/kg DM) = $31.55 + 0.8343GP$, where GP is the net gas production (ml/200 mg DM) (Menke & Steingass, 1988);

³Metabolizable energy: ME (MJ/kg DM) = $2.20 + (0.1357 \times GP200) + (0.0057 \times CP)$ where GP200 (mL/200 mg of DM incubated) (Menke & Steingass, 1988); SEM: standard error mean.

Tabela 6 – Effects of different processing methods applied to cottonseed meal on final ruminal pH, total VFA production, VFA profile and NH₃-N concentrations (mg/dL) in in vitro systems.

Item	Processing method ¹						SEM	P-value
	Ncontrol	Microwave oven	Conventional oven	Autoclave	Tannin	Pcontrol		
Final pH	6.66	6.69	6.67	6.57	6.71	6.62	0.09	0.31
Total VFA, mM/g DM	241 ^a	220 ^{ab}	188 ^b	176 ^b	179 ^b	183 ^b	28.1	<0.01
VFA profile, mol/100 mol								
Acetate	63.8	64.3	64.3	63.7	66.0	62.7	1.99	0.62
Propionate	21.9	21.6	20.9	21.6	21.2	20.9	1.42	0.94
Butyrate	9.66 ^{ab}	9.53 ^{ab}	9.82 ^{ab}	10.0 ^{ab}	8.74 ^b	10.9 ^a	0.98	<0.05
Iso-butyrate	1.66	1.62	1.76	1.62	1.39	1.63	0.15	0.23
Iso-valerate	2.91 ^{ab}	2.84 ^b	3.15 ^{ab}	2.95 ^{ab}	2.53 ^b	3.63 ^a	0.35	<0.01
Acetate:Propionate	2.92	2.98	3.07	3.03	3.2	3.03	0.35	0.93
Total BCVFA ³	4.58 ^{ab}	4.47 ^{ab}	4.92 ^a	4.58 ^{ab}	3.93 ^b	5.27 ^a	0.49	<0.01
NH ₃ -N, mg/dL	25.4	24.8	23.4	25.0	25.6	28.8	2.17	0.19

^{a,b,c}Means with different superscripts in the same row are different (*P* < 0.05);

¹Negative control, conventional cottonseed meal (Ncontrol), cottonseed meal heat treated with 2% xylose and heated on microwave oven for 2 minutes (Microwave oven), cottonseed meal treated with 2% xylose and heated on conventional oven for 90 minutes (Conventional oven), cottonseed meal treated with 2% xylose and heated on autoclave for 8 minutes (Autoclave), cottonseed meal treated with 6% tannin (Tannin) and a commercial soybean based product, as positive control (Pcontrol);

²In vitro dry matter digestibility: IVDM (g/kg DM) = (100 ± [W3 - (W1 × C1)] × 100 / (W2 × DM / 10)) × 10 (Daisyll system, Ankom technology, NY, USA);

³BCVFA = branched-chain VFA; SEM: standard error mean.

Tabela 7 – Effects of different processing methods applied to peanut meal on ruminal kinetics, total gas production, in vitro organic matter digestibility (IVOMD), and metabolizable energy (ME) in a gas production system.

Item	Processing method ¹						SEM	P-value
	Ncontrol	Microwave oven	Conventional oven	Autoclave	Tannin	Pcontrol		
Fermentation rate, h	0.069 ^{ab}	0.054 ^{bc}	0.035 ^d	0.050 ^{cd}	0.066 ^b	0.085 ^a	0.63	< 0.01
Gas pool size, mL/g DM	71.3 ^{ab}	68.6 ^{bc}	82.9 ^a	69.8 ^{bc}	57.8 ^c	60.6 ^{bc}	9.15	< 0.01
Total gas production, mL/gDM								
24h	84.3 ^a	69.0 ^b	60.2 ^b	64.4 ^b	62.7 ^b	71.8 ^{ab}	9.23	< 0.01
48h	108 ^a	97.2 ^{ab}	96.3 ^{ab}	92.9 ^{ab}	86.7 ^b	95.5 ^{ab}	9.92	< 0.01
IVOMD, g/kg DM ²	495 ^a	477 ^{ab}	476 ^{ab}	470 ^{ab}	460 ^b	474 ^{ab}	1.59	< 0.01
Metabolizable energy, MJ/kg DM ³	9.56 ^a	9.33 ^{ab}	9.39 ^a	8.84 ^{bc}	8.37 ^c	8.71 ^c	0.31	< 0.01

^{a,b,c} Means with different superscripts in the same row are different ($P < 0.05$);

¹Conventional peanut meal, as negative control (Ncontrol), peanut meal treated with 2% xylose and heated on microwave oven) for 6 minutes (Microwave oven), peanut meal heat treated on conventional oven for 60 minutes (Conventional oven), peanut meal treated with 2% xylose and heated on autoclave for 24 minutes (Autoclave), peanut meal treated with 6% tannin (Tannin), and a commercial soybean based product, as positive control (Pcontrol);

²In vitro organic matter digestibility: IVOMD (g/kg DM) = 31.55 + 0.8343GP, where GP is the net gas production (ml/200 mg DM) (Menke & Steingass, 1988);

³Metabolizable energy: ME (MJ/kg DM) = 2.20 + (0.1357 × GP200) + (0.0057 × CP) where GP200 (mL/200 mg of DM incubated) (Menke & Steingass, 1988); SEM: standard error mean.

Tabela 8 – Effects of different processing methods applied to peanut meal on final ruminal pH, total VFA production, VFA profile and NH₃-N concentrations (mg/dL) in in vitro systems.

Item	Processing method ¹						SEM	P-value
	Ncontrol	Microwave oven	Conventional oven	Autoclave	Tannin	Pcontrol		
Final pH	6.70 ^b	6.72 ^{ab}	6.70 ^b	6.76 ^{ab}	6.88 ^a	6.60 ^c	0.03	< 0.01
Total VFA, mM/g DM	200	192	221	222	230	213	24.5	0.57
VFA profile, mol/100 mol								
Acetate	62.8 ^{ab}	61.0 ^b	61.6 ^{ab}	61.4 ^{ab}	62.4 ^{ab}	63.4 ^a	1.99	< 0.05
Propionate	21.7 ^b	24.7 ^{ab}	24.7 ^{ab}	25.0 ^a	24.1 ^{ab}	22.7 ^{ab}	1.42	< 0.01
Butyrate	9.89 ^a	8.94 ^b	8.57 ^b	8.71 ^b	8.65 ^b	9.14 ^{ab}	0.98	< 0.01
Iso-butyrate	1.64 ^{ab}	1.80 ^a	1.68 ^{ab}	1.71 ^{ab}	1.59 ^b	1.60 ^{ab}	0.16	< 0.05
Iso-valerate	3.88 ^a	3.51 ^a	3.36 ^{ab}	3.33 ^{ab}	3.10 ^b	3.10 ^b	0.35	< 0.01
Acetate:Propionate	3.01 ^a	2.47 ^{ab}	2.50 ^{ab}	2.44 ^b	2.58 ^a	2.80 ^a	0.29	< 0.05
Total BCVFA ³	5.52 ^a	5.31 ^a	5.05 ^{ab}	5.05 ^{ab}	4.69 ^b	4.71 ^b	0.49	< 0.01
NH ₃ -N, mg/dL	26.8 ^b	28.6 ^{ab}	29.2 ^{ab}	32.4 ^a	29.9 ^{ab}	29.6 ^{ab}	2.43	< 0.01

^{a,b,c}Means with different superscripts in the same row are different (P < 0.05);

¹Conventional peanut meal, as negative control (Ncontrol), peanut meal treated with 2% xylose and heated on microwave oven for 6 minutes (Microwave oven), peanut meal heat treated on conventional oven for 60 minutes (Conventional oven), peanut meal treated with 2% xylose and heated on autoclave for

24 minutes (Autoclave), peanut meal treated with 6% tannin (Tannin), a and a commercial soybean based product, as positive control (Pcontrol);

²In vitro dry matter digestibility: IVDM (g/kg DM) = (100 ± [W3 - (W1 × C1)] × 100 / (W2 × DM / 10)) × 10 (Daisyll system, Ankom technology, NY, USA);

³BCVFA = branched-chain VFA; SEM: standard error mean.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso de diferentes métodos de processamento para elevar o teor de PNDR de alimentos utilizados na dieta de bovinos de corte pode ser visto como uma interessante alternativa em sistemas de produção comercial. A substituição das fontes de PNDR convencionais, as quais apresentam alto custo, por alimentos processados de forma alternativa podem contribuir na redução dos custos de produção, além de que a inclusão de fontes de PNDR pode melhorar a eficiência produtiva dos animais e reduzir a excreção ambiental de nutrientes.

REFERÊNCIAS

- BACHMANN, M. et al. Effect of toasting grain silages from field peas (*Pisum sativum*) and field beans (*Vicia faba*) on in vitro gas production, methane production, and post-ruminal crude protein content. **Animal Nutrition**, v. 6, n. 3, p. 342–352, 2020.
- BRODERICK, G. A.; WALLACE, R. J.; ØRSKOV, E. R. Control of Rate and Extent of Protein Degradation. **Physiological Aspects of Digestion and Metabolism in Ruminants**, p. 541–592, 1991.
- CALSAMIGLIA, S., AND M. D. S. A three-step in vitro procedure for estimating intestinal digestion of protein in ruminants. **Journal of Animal Science**, v. 73, p. 1459–1465, 1995.
- CASTRO, S. I. B. et al. Ruminal degradability and intestinal digestibility of protein and amino acids in treated soybean meal products. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 2, p. 810–822, 2007.
- CASTRO-MONTOYA, J. et al. In vitro microbial protein synthesis, ruminal degradation and post-ruminal digestibility of crude protein of dairy rations containing Quebracho tannin extract. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 102, n. 1, p. e77–e86, 2018.
- CENTRO AVANÇADO DE ESTUDOS EM ECONOMIA APLICADA DA USP. **Soja CEPEA**. Disponível em: <<https://www.cepea.esalq.usp.br/br/indicador/soja.aspx>>. Acesso em: 7 jul. 2021.
- CHEN, Z. H. et al. Effect of feeding different sources of rumen-protected methionine on milk production and N-utilization in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 4, p. 1978–1988, 2011.
- FRANCISQUINI, J. D. et al. Reação De Maillard: Uma Revisão. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 72, n. 1, p. 48, 2017.
- GARGALLO, S., S. CALSAMIGLIA, AND A. F. Technical note: A modified three-step in vitro procedure to determine intestinal digestion of proteins. **Journal of Animal Science**, v. 84, p. 2163–2167, 2006.
- GRAZZIOTIN, R. C. B. et al. Altered rumen fermentation patterns in lactating dairy cows supplemented with phytochemicals improve milk production and efficiency. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 1, p. 301–312, 2020.
- HARO, A. et al. Effects of Feeding Rumen-Protected Sunflower Seed and Meal Protein on Feed Intake, Diet Digestibility, Ruminal, Cecal Fermentation, and Growth Performance of Lambs. **Animals**, v. 9, n. 7, p. 415, 2019.

HARYANTO, B. Manipulating Protein Degradability in the Rumen to Support Higher Ruminant Production. **Indonesian Bulletin of Animal and Veterinary Sciences**, v. 24, n. 3, p. 131–138, 2014.

HIGGS, R. J. et al. Updating the Cornell Net Carbohydrate and Protein System feed library and analyzing model sensitivity to feed inputs. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 9, p. 6340–6360, 2015.

JAHANI-AZIZABADI, H. et al. The effect of heat or heat-xylose processing on nitrogen fractions and in situ/in vitro ruminal and post-ruminal protein disappearance of guar meal. **American Journal of Animal and Veterinary Sciences**, v. 5, n. 4, p. 266–273, 2010.

KOENIG, K. M.; BEAUCHEMIN, K. A. Effect of feeding condensed tannins in high protein finishing diets containing corn distillers grains on ruminal fermentation, nutrient digestibility, and route of nitrogen excretion in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 96, n. 10, p. 4398–4413, 2018.

MAXIN, G.; OUELLET, D. R.; LAPIERRE, H. Ruminal degradability of dry matter, crude protein, and amino acids in soybean meal, canola meal, corn, and wheat dried distillers grains. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 8, p. 5151–5160, 2013.

NASEM. **Nutrient requirements of beef cattle**. Washington, DC: National Academy Press, 2016.

NOCEK, J. E. In situ and Other Methods to Estimate Ruminal Protein and Energy Digestibility: A Review. **Journal of Dairy Science**, v. 71, n. 8, p. 2051–2069, 1988.

NRC, 2001. **Requirements of Dairy Cattle Seventh Revised Edition**, 2001. [s.l.: s.n.].

PAULA ET AL. Effects of replacing soybean meal with canola meal differing in rumen undegradable-protein content on ruminal fermentation and gas production kinetics using 2 in vitro systems. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 7, p. 12, 2017.

PINTO, A.C.J; MILLEN, D. D. Nutritional Recommendations and Management Practices Adopted By Feedlot Cattle Nutritionists : the 2016 Brazilian. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 99, p. 1–46, 2018.

ROTTA, P.P., MENEZES, A.C.B.; COSTA E SILVA, L.F.; VALADARES FILHO, S.C.; PRADOS, L.F.; MARCONDES, M. I. Exigências de Proteína para Bovinos de Corte. In: VALADARES FILHO ET AL (Ed.). **Exigências Nutricionais de Zebuíños Puros e Cruzados – BR Corte**. 3a. ed. Viçosa: UFV, 2016. p. 347.

SAMADI; YU, P. Dry and moist heating-induced changes in protein molecular structure, protein subfraction, and nutrient profiles in soybeans. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 12, p. 6092–6102, 2011.

SANTOS, F.A.P., PEDROSO, A. M. Metabolismo de Proteínas. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S. G. (Ed.). **Nutrição de Ruminantes**. 2a. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2011. p. 616.

SHAKERI, P.; REIASI, A.; TAHMASBI, R. The effect of pistachio by-product extracts treatment in protecting soybean meal and canola meal protein from rumen microbial degradation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 100, n. 14, p. 5222–5229, 2020.

SNIFFEN, C. J. et al. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: IV. Predicting amino acid adequacy. **Journal of Animal Science**, v. 71, n. 5, p. 1298–1311, 1992.

VALADARES FILHO, S. C. ET AL. **Exigências Nutricionais de Zebuíños Puros e Cruzados**. 3a. ed. Viçosa: UFV, 2016.

VALADARES FILHO, SEBASTIÃO DE CAMPOS, PINA, D. DOS SANTOS. Fermentação Ruminal. In: BERCHIELLI, T.T., PIRES, A.V., OLIVEIRA, S. G. (Ed.). **Nutrição de Ruminantes**. 2a. ed. Joboticabal: FUNEP, 2011. p. 616.

VANEGAS, J. L. et al. Protection of sunflower seed and sunflower meal protein with malic acid and heat: effects on in vitro ruminal fermentation and methane production. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 1, p. 350–356, 2017.

VANEGAS, J. L.; GONZÁLEZ, J.; CARRO, M. D. Influence of protein fermentation and carbohydrate source on in vitro methane production. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 101, n. 5, p. e288–e296, 2017.

XIANG, S. et al. Effects of microwave heating on the protein structure, digestion properties and Maillard products of gluten. **Journal of Food Science and Technology**, v. 57, n. 6, p. 2139–2149, 2020.

ANEXO A – COMPROVANTE DO CEUA



Protocolo nº. 294-19

Governo do Estado de São Paulo
 Secretaria de Agricultura e Abastecimento
 Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios
 Instituto de Zootecnia

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o protocolo intitulado “**EFEITO DO AUMENTO DOS NÍVEIS DE PROTEÍNA NÃO DEGRADADA NO RÚMEN EM DIETAS PARA BOVINOS DE CORTE / IMPLANTAÇÃO DE SISTEMAS *IN VITRO* (FERMENTADORES DE FLUXO CONTINUO E PRODUÇÃO DE GASES) PARA ESTUDOS DE NUTRIÇÃO DE RUMINANTES**”, protocolo nº **294-19**, sob a responsabilidade de Eduardo Marostegan de Paula, Renata Helena Branco Arnandes, Pedro Del Bianco Benedeti, Antonio Pinheiro Faciola, Mozart Fonseca, Luiz Felipe Ferrareto, Marcio de Souza Duarte, Nicola Vergara Lopes Serão. Que envolve a utilização de bovinos para fins de projeto de pesquisa – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** do **INSTITUTO DE ZOOTECNIA**, em reunião de **07/08/2019**.

Finalidade	(<input type="checkbox"/>) Ensino (<input checked="" type="checkbox"/>) Pesquisa Científica
Vigência do Projeto	01/11/2019 a 31/03/2023
Espécie/Linhagem	Bovinos/ Nelore
No. de Animais	3
Peso/Idade	300 kg/12 meses
Sexo	Macho
Origem	Biotério do Centro de Pesquisa em Bovinos de Corte do Instituto de Zootecnia

José Evandro de Moares
 Presidente CEUA-IZ