

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

DETERMINAÇÃO DA URÉIA SÉRICA COMO MEDIDA DE VALOR
BIOLÓGICO DE PROTEÍNA PARA CÃES

José Eduardo Salazar Maciel

Médico Veterinário (UFRGS)

Dissertação apresentada como um dos requisitos para
a obtenção do Grau de mestre em Zootecnia, Área de concentração
Nutrição Animal

Porto Alegre, (RS)
Março, 2003

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Alexandre de Mello Kessler, pela orientação, ensinamentos, amizade e paciência.

À Profa. Andréia Machado Leal Ribeiro, pela disponibilidade, ensinamentos e pelo “empréstimo” do canil.

Ao Prof. Mário Penz Júnior, pelos ensinamentos e palestras.

À minha família, pelo apoio, incentivo e paciência.

Aos colegas do LEZO pelos ótimos momentos de convivência.

À polícia do exército, em especial ao Tenente Pedro Ferraz, pela cedência dos cães e do canil.

À Médica Veterinária Synara Rillo pelo empréstimo dos animais e do canil.

DETERMINAÇÃO DA URÉIA SÉRICA COMO MEDIDA DE VALOR BIOLÓGICO DE PROTEÍNA PARA CÃES EM CRESCIMENTO^{1/}

Autor: José Eduardo Salazar Maciel
Orientador: Alexandre de Mello Kessler

RESUMO

Este trabalho utilizou a medida da uréia sérica para a predição do valor biológico de proteína para cães. Foram utilizados nove cães filhotes, que foram submetidos a três diferentes experimentos. No primeiro experimento o objetivo foi determinar o pico máximo de uréia plasmática após a alimentação. Os animais foram alimentados com uma dieta contendo 30% de proteína. Após a alimentação os animais foram submetidos a cinco coletas de sangue, realizadas em um espaço de 1h entre cada coleta. Este experimento determinou, de forma significativa, que o pico máximo de uréia após a alimentação é 3:01h. Portanto este foi o horário para a coleta nos experimentos subseqüentes. No segundo experimento os animais foram alimentados com dietas contendo níveis crescentes de proteína, objetivando relacionar diferentes níveis de proteína, com valores de uréia sérica. Foram utilizadas dietas contendo 19, 24, 30, 36, e 41% de proteína. Foi demonstrado, de forma significativa ($P < 0,001$), um crescimento linear nos níveis de uréia plasmática a medida em que aumentou o teor de proteína. O terceiro experimento relacionou diferentes níveis de inclusão de aminoácidos com os seus respectivos níveis resultantes de uréia plasmática. Foram utilizadas relações met-cis/lisina de 0,58, 0,62, 0,66 e 0,70. Foi demonstrado, de forma significativa ($P < 0,0001$), que aumentando-se à inclusão de aminoácidos, diminuiram linearmente os níveis de uréia sérica, supondo que níveis maiores de inclusão de aminoácidos possam vir a ser benéficos para cães em crescimento.

^{1/} Dissertação de Mestrado em Zootecnia (Nutrição Animal), Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, (54p) - Março de 2003.

BLOOD UREA MEASUREMENT TO EVALUATE BIOLOGICAL VALUE OF PROTEIN FOR GROWING DOGS¹

Author: José Eduardo Salazar Maciel

Adviser: Alexandre de Mello Kessler

ABSTRACT

This work used blood urea measurement to evaluate biological value of protein for growing dogs. Nine puppies were used, submitted to three experiments. The objective of the first experiment was to define the time after meal on which plasma urea levels were maximal. Animals were fed on a diet with 30% crude protein. Blood samples were taken from the puppies hourly, up to five hours after meal. The results showed that the maximal level of serum urea occurred at 3:01h after meal. This was set as the time after meal for sampling blood in experiments 2 and 3. In the second experiment, animals were fed with increasing levels of protein, in a cross over design. The diets contained 19, 24, 30, 36 and 41% crude protein. It was showed a statistically significant ($P < 0,001$) linear rise in serum urea levels, as crude protein levels increased in diet. The third experiment was set to relate methionine supplementation of the 30% crude protein diet with serum urea levels. DL-methionine was used to formulate diets with methionine+cysteine/lysine ratios of 0.58, 0.62, 0.66 and 0.70:1. A significant ($P < 0,0001$) linear decrease in serum urea levels was observed as the methionine+cisteine/lysine ratio rose, indicating a better utilization of diet protein by the puppies. As the response were linear, these results indicates that further higher levels of amino acid inclusion should be beneficial in diets for growing dogs.

^{1/} M. Sc. Dissertation in Animal Science. Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil (54p) - March, 2003.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Metabolismo das proteínas	3
2.1.1 Composição	3
2.1.2 Funções	5
2.1.3 Digestão, absorção e metabolização	7
2.2 Necessidades protéicas dos cães	13
2.3 Métodos para determinar a qualidade das proteínas	16
2.4 Medida de uréia no sangue como técnica para medir qualidade de proteína	19
2.5 Hipótese de trabalho.....	21
3. MATERIAL E MÉTODOS ..	23
3.1 Local	23
3.2 Período	23
3.3 Instalações e manejo	23
3.4 Animais experimentais	24
3.5 Rações experimentais	24
3.6 Período experimental	24
3.6.1 Experimento 1	25
3.6.2 Experimento 2	26
3.6.3 Experimento 3	26
3.7 Análises laboratoriais	30
3.7.1 Procedimentos de coleta	30
3.7.2 Método de determinação da uréia sanguínea	30
3.8 Delineamento experimental e análise estatística	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1 Determinação do pico de uréia plasmática pós-alimentação	33
4.2 Determinação da relação entre níveis de proteína e níveis de uréia plasmática	35
4.3 Relação entre diferentes níveis de inclusão de aminoácidos na dieta e níveis de uréia plasmática	37
5. CONCLUSÕES	45
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
7. APÊNDICES	51

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Aminoácidos que compõem as proteínas	4
2. Aminoácidos essenciais e não essenciais para cães	5
3. Necessidades mínimas de proteínas e aminoácidos	16
4. Necessidades mínimas de aminoácidos	16
5. Relação entre níveis de uréia no sangue e porcentagem de proteína na dieta	21
6. Relação entre o tempo após o consumo e os níveis de uréia no sangue.....	21
7. Relação entre os valores biológicos da proteína e os níveis de uréia no sangue	21
8. Ração basal	27
9. Rações utilizadas no segundo experimento	28
10. Rações utilizadas no terceiro experimento	29
11. Níveis de uréia plasmática pós-alimentação em mg/dL (média +- desvio padrão)	33
12. Relação entre diferentes níveis de proteína e valores de uréia plasmática em mg/dL (média +- desvio padrão)	35
13. Relação entre diferentes níveis de inclusão de aminoácidos na dieta e níveis de uréia plasmática em mg/dL (média +- desvio padrão)	37

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Concentrações de uréia plasmática após alimentação nos grupos de animais (grupo 1: cães filhotes de pit bull; grupo2: cães filhotes de pastor alemão; grupo3: cães filhotes de dogue alemão). Curvas de regressão conforme a equação $Y= 16,1284 + \text{efeito de grupo} + 7,9106h - 1,3127 h^2$, $R^2=0,74$).....	34
2. Relação entre diferentes níveis de proteína na dieta e níveis de uréia plasmática nos grupos de animais (grupo 1: cães filhotes de pit bull; grupo2: cães filhotes de pastor alemão; grupo3: cães filhotes de dogue alemão). Curvas de regressão conforme a equação $Y= 10,597 + \text{efeito de grupo} + 0,5711PB$, $R^2=0,88$).....	36
3. Relação entre os diferentes níveis de inclusão de aminoácidos na dieta e níveis de uréia plasmática nos grupos de animais (grupo 1: cães filhotes de pit bull; grupo2: cães filhotes de pastor alemão; grupo3: cães filhotes de dogue alemão). Curvas de regressão conforme a equação $Y= 48,905 + \text{efeito de grupo} - 35,962*M+C/L$, $R^2=0,91$).....	42

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS

EM.....	Energia Metabolizável
AAFCO.....	Association of American Feed Control Officials
NRC.....	National Research Council
REP.....	Quociente de Eficiência Proteica
VB.....	Valor Biológico
IAAE.....	Índice de Aminoácido Essencial
mg.....	miligramas
g.....	gramas
dL.....	decilitros
mL.....	mililitros
kg.....	quilogramas
nm.....	nanômetros
kcal.....	quilocalorias
T.....	tratamento
Trat.....	tratamento
PB.....	Proteína Bruta
met.....	metionina
cys.....	cistina
lys.....	lisina

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, incluindo o Rio Grande do Sul, existem poucos trabalhos no que se refere à área de nutrição de cães. Esta situação implica em necessidades de expandir os conhecimentos, a fim de atender um mercado cuja demanda por informações não tem sido adequadamente atendido. Um maior aprofundamento na área de nutrição de cães resultará em dietas mais equilibradas, manejos alimentares adequados e um suporte mais consistente na prevenção de algumas patologias, bem como um auxílio nutricional quando estas já estão instaladas. O estudo da nutrição de cães difere em relação ao estudo da nutrição de animais de produção. Para os animais de produção é objetivado um maior ganho de peso em um menor tempo possível e pelo menor custo. Já para os animais de companhia os objetivos são: longevidade e qualidade de vida.

Os cães, no início do seu relacionamento com o homem, tinham predominantemente funções de trabalho, principalmente em caçadas. Com o passar do tempo passou a preponderar à companhia como a principal função dos cães em seu relacionamento com o homem. Esta aproximação com o homem fez com que o cão, um animal de origem essencialmente carnívora, sofresse uma pressão de seleção, resultando em animais mais adaptados a uma dieta onívora.

Apesar de adaptado a uma dieta onívora, o cão, devido a sua origem carnívora, é exigente na qualidade e na quantidade de proteínas contidas em sua dieta. Vários fatores influenciam a qualidade da proteína contida em um determinado ingrediente. Entre estes fatores estão o teor de proteína deste ingrediente, a digestibilidade da proteína em questão e a composição ou perfil de aminoácidos essenciais contidos nesta proteína. É dito que um ingrediente possui uma proteína de alto valor biológico quando esta reúne alta digestibilidade e uma adequada composição de aminoácidos essenciais.

Vários métodos analíticos foram desenvolvidos para determinar o valor biológico de uma proteína. Entre estes métodos está aquele que mede a uréia sanguínea após a ingestão de uma determinada fonte protéica. Este método relaciona o nível de uréia sanguínea, após a ingestão do alimento, com o valor biológico da proteína em questão.

Este trabalho tem como objetivo relacionar níveis sanguíneos de uréia com quantidade de proteína na dieta para cães e relacionar níveis sanguíneos de uréia com valor biológico de proteína em dietas para cães, para, a partir daí, buscar um balanço adequado de aminoácidos para os cães em crescimento.

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Metabolismo das proteínas

2.1.1 Composição

As proteínas são os principais constituintes do organismo, contribuindo entre a metade a três quartos do organismo animal na base seca (Guyton & Hall, 1996). Ao mesmo tempo são as biomoléculas mais versáteis quanto à funcionalidade e essa versatilidade funcional está determinada pela classe, pelo número e pela seqüência de aminoácidos que compõem suas unidades estruturais (Doolittle, 1985).

Os aminoácidos são os principais constituintes das proteínas, 20 dos quais estão presentes no organismo em quantidades significativas e estão unidos, nas proteínas, por ligações peptídicas, variando nas diferentes proteínas somente no número e na seqüência (Guyton & Hall, 1996). Todo aminoácido tem um grupo ácido (COOH) e um radical nitrogenado que se situa em associação íntima com a carboxila e habitualmente está representado pelo grupo amina (NH) (Guyton & Hall, 1996). Destes 20 aminoácidos apenas 10 são sintetizados pelos animais mamíferos e são denominados de aminoácidos não essenciais. Os aminoácidos que não são sintetizados pelo organismo animal ou sintetizados em quantidades insuficientes são chamados de aminoácidos essenciais e devem ser fornecidos através da dieta (Christensen,

1982). Sem estes aminoácidos os animais não conseguem sintetizar as proteínas requeridas para a síntese de novos tecidos, bem como deixam de fornecer substrato para a formação dos aminoácidos não essenciais (Christensen, 1982).

A arginina, considerada aminoácido não essencial em animais adultos, é essencial em animais jovens já que a sua síntese é deficiente (Burns et al, 1981). Um outro fator que define a importância da arginina é a sua atividade no ciclo da uréia, o que torna este aminoácido importante para animais que ingerem grandes quantidades de proteínas em uma refeição, especialmente os animais carnívoros (Czarnecki & Baker, 1984). A deficiência de cisteína faz com que aumente a exigência de metionina, pois a partir desta é que a cisteína é sintetizada. O mesmo ocorre com a fenilalanina em relação à tirosina (Burns & Milner, 1981).

TABELA 1. Aminoácidos essenciais e não essenciais para cães (Case, et al, 1998).

Aminoácidos essenciais	Aminoácidos não essenciais
Arginina	Alanina
Histidina	Aspártico
Isoleucina	Asparagina
Leucina	Glutâmico
Lisina	Glutamina
Metionina	Cisteína
Fenilalanina	Glicina
Treonina	Prolina
Triptofano	Serina
Valina	Tirosina

2.1.2 Funções

Todas as enzimas são proteínas. Estas macromoléculas específicas aumentam a velocidade de quase todas as reações químicas nos sistemas biológicos além de possuírem especificidade para cada substrato. Estas reações vão desde a simples hidratação do dióxido de carbono até a complexidade da replicação de todo um cromossomo. Muitas moléculas e íons são transportados por proteínas específicas. Por exemplo, a hemoglobina transporta oxigênio nas hemácias, a mioglobina transporta oxigênio no músculo. A transferrina transporta o ferro no plasma sanguíneo, que é armazenado no fígado, complexado com a ferritina, uma outra proteína. A albumina, uma proteína, transporta ácidos graxos, hormônios esteroidais e cálcio. As diferentes lipoproteínas transportam triglicerídios, fosfolipídios e colesterol (Guyton & Hall, 1996).

Muitos hormônios atuam através de receptores protéicos localizados nas membranas plasmáticas, no citossol ou no núcleo de células alvo. A resposta de células nervosas a estímulos específicos é intermediada por proteínas receptoras, como por exemplo, a rodopsina que é a proteína receptora nos bastonetes da retina (Stryer, 1988).

Os principais componentes dos músculos são proteínas. A contração muscular é conseguida pelo movimento de deslizamento de dois tipos de filamento protéicos, a actina e a miosina. A tubulina e a dineína, em escala microscópica, atuam na propulsão dos espermatozoides pelos seus flagelos, nos movimentos coordenados dos cromossomos, na mitose, e na contração de cílios e flagelos (Doolittle, 1985).

Os anticorpos são proteínas altamente específicas, que reconhecem substâncias estranhas ao organismo, como vírus, bactérias e células de outros organismos. O fibrinogênio e a trombina são proteínas de defesa, que atuam na coagulação sanguínea (Jentoft et al, 1991).

A atividade de diferentes células em organismos multicelulares é coordenada por hormônios. Muitos destes, como a insulina e o hormônio estimulante da tireóide, são proteínas. A hipófise, o hipotálamo, o pâncreas, a paratireóide e a placenta são exemplos de órgãos que produzem hormônios protéicos (Doolittle, 1985).

Existem proteínas que armazenam nutrientes. Uma destas é a albumina, que no sangue, armazena aminoácidos.

De fato, as proteínas servem em todas as células como sensores que controlam o fluxo de energia e de matéria (Stryer, 1988).

2.1.3 Digestão, absorção e metabolização

O processo de digestão das proteínas é iniciado no estômago. Ao chegar neste compartimento, as proteínas são desnaturadas pelo ácido clorídrico, que é secretado pelas células parietais das glândulas gástricas (Davenport, 1985)..

A digestão protéica usualmente inicia pela ação da protease gástrica pepsina. Esta enzima é secretada pelas células principais do epitélio gástrico, na forma de pepsinogênio. Devido ao pH ácido, em torno de dois, o pepsinogênio é rapidamente transformado em pepsina. A ação da pepsina

resulta na hidrólise das proteínas em polipeptídios e em alguns aminoácidos livres (Davenport, 1985).

No duodeno, várias proteases produzidas pelo pâncreas continuam o processo proteolítico. Estas proteases são a Tripsina, a quimotripsina e as carboxipeptidases e são secretadas na forma de zimogênios inativos (tripsinogênio, quimotripsinogênio e pro-carboxipeptidases). O tripsinogênio é ativado por uma enzima, a enteropeptidase, que é secretada pelas células intestinais, originando a tripsina. Os locais de ação da tripsina são as ligações peptídicas entre os aminoácidos lisina e arginina. Além disto, a tripsina ativa o quimotripsinogênio e as pro-carboxipeptidases em quimotripsina e carboxipeptidases respectivamente (Harper, 1984). A quimotripsina ataca as ligações peptídicas que contêm o grupo carboxila de tirosina, fenilalanina, triptofano, leucina e metionina. Tanto a tripsina quanto a quimotripsina são consideradas endopeptidases.

A carboxipeptidase, junto com outras enzimas secretadas pela mucosa duodenal, como aminopeptidase e dipeptidase, atacam as ligações peptídicas terminais, sendo, portanto exopeptidases (Davenport, 1985).

Toda a atividade enzimática envolvida na digestão das proteínas está regulada pela ação de hormônios (Guyton & Hall, 1996). A gastrina, hormônio secretado pelas células G, na região do piloro no estômago, estimula a produção de ácido clorídrico (Cowley & Code, 1970). A presença de proteínas no estômago e a estimulação do nervo vago aumentam a produção da gastrina (Cowley & Code, 1970). A secreção das enzimas pancreáticas é estimulada pela atividade da colecistoquinina, um hormônio que é secretado pela mucosa

do duodeno e do jejuno (Guyton & Hall, 1996). A produção deste hormônio aumenta com a presença de peptídeos no trato digestivo, bem como pela estimulação vagal. A secretina, outra enzima intestinal, estimula o pâncreas a produzir bicarbonato, o que eleva o pH intestinal, favorecendo a ação das enzimas pancreáticas (Ferraris & Diamond, 1989).

O resultado da atividade enzimática digestória é a presença de aminoácidos, dipeptídios e tripeptídios. A absorção dos aminoácidos e dos oligopeptídios ocorre de forma ativa, através de quatro sistemas de co-transporte, que não competem entre si. São eles os três aminoácidos dibásicos (lisina, arginina e histidina), cada um com dois grupos amino básicos; aminoácidos diácidos (glutamato e aspartato), cada um com dois grupos carboxila; uma classe especial que consiste em glicina, prolina e hidroxiprolina, e uma outra classe para os demais aminoácidos (Guyton e Hall, 1996).

Os dipeptídios e tripeptídios, uma vez dentro das células epiteliais, são divididos em seus aminoácidos constituintes pelas peptidases celulares, o que garante um alto gradiente dirigido internamente e que favorece o transporte destes nutrientes para dentro das células. Após a hidrólise celular, entram no sistema portal hepático somente aminoácidos livres (Diamond, 1991).

Após serem absorvidos, os aminoácidos, em excesso, não se acumulam em grandes quantidades no sangue, pois são rapidamente assimilados por células de todo o organismo. Quase imediatamente após a entrada nas células, os aminoácidos são conjugados, sob a influência de enzimas intracelulares em proteínas celulares, de tal modo que a concentração daqueles que estão no interior das células sempre permanece baixa. Muitas das proteínas

intracelulares podem ser decompostas, em caso de necessidade, em aminoácidos, por enzimas que se denominam catepsinas. Estes aminoácidos, por sua vez, podem ser transportados novamente das células para o sangue (Guyton & Hall, 1996).

Certos tecidos do organismo participam do armazenamento dos aminoácidos de modo mais intenso que outros. Assim, o fígado, que é um órgão de elevado metabolismo, armazena grande quantidade de proteínas. O rim e a mucosa intestinal também armazenam quantidade apreciável de aminoácidos (Benevenga & Steele, 1984).

Os aminoácidos também sofrem oxidação para obtenção de energia. O cão, como outros animais carnívoros, tem boa capacidade de obtenção de energia a partir das proteínas. Blaza et al (1989), comprovaram que os cães, ao serem alimentados com dietas isentas de carboidratos e elevado conteúdo protéico conseguem obter energia através de aminoácidos. A degradação protéica ocorre através das proteínas oriundas da dieta, bem como das próprias proteínas do organismo. Isto ocorre em situações em que o organismo, por necessidade energética, recorre aos aminoácidos e em casos em que a ingestão de proteínas, na dieta, é excessiva ou em casos onde existe a proteólise intracelular (Benevenga & Steele, 1984). Os aminoácidos resultantes da proteólise intracelular são reciclados a novas proteínas ou oxidados para obtenção de energia.

A degradação oxidativa dos aminoácidos se realiza por rotas catabólicas específicas, diferente para cada um dos vinte aminoácidos protéicos. Todas as

rotas convergem para os metabólitos piruvato, acetil-CoA ou compostos intermediários do ácido cítrico (Doolittle, 1985).

A degradação dos aminoácidos ocorre quase que integralmente no fígado e em pequena parte no rim. A primeira etapa da degradação oxidativa dos aminoácidos é a remoção do grupo amino (Guyton & Hall, 1996). As duas maneiras mais importantes são a transaminação e a desaminação oxidativa. Na transaminação há uma transferência do grupo amino para alguma substância aceptor, ou seja, o grupo amino do aminoácido é transferido ao ácido α -cetoglutarato, que se transforma em ácido glutâmico, que então pode transferir o grupo amino para outras substâncias ou liberá-los sob forma de amônia. No processo de perda do grupo amina, o ácido glutâmico novamente se transforma em α -cetoglutarato, de modo que o ciclo repete-se periodicamente. A desaminação oxidativa é catalisada por aminoácido-oxidases. Neste processo o aminoácido é oxidado no ponto em que se situa o radical amino, o que provoca a liberação deste (Guyton & Hall, 1996).

Certos aminoácidos desaminados são semelhantes aos produtos que resultam do metabolismo da glicose e dos ácidos graxos. Por exemplo, a alanina desaminada é o ácido pirúvico, que é conversível em glicose ou glicogênio, ou em acetil COA, a qual pode, então, ser polimerizada em ácidos graxos (Harper, 1984). Do mesmo modo, duas moléculas de acetil COA podem condensar-se para formar ácido acetoacético, que é um dos corpos cetônicos. A conversão de aminoácidos em glicose ou glicogênio é denominada de gliconeogênese. Enquanto que a conversão de aminoácidos em cetoácidos é denominada de cetogênese (Harper, 1984). A quantidade de trifosfato de

adenosina (ATP) formada a partir de cada grama de proteína é aproximadamente a mesma formada por um grama de glicose.

Durante a desaminação, ocorre a liberação de amônia, que é altamente tóxica para o organismo. No cão a amônia é quase que inteiramente transformada em uréia, um produto bem menos tóxico. Esta transformação ocorre quando duas moléculas de amônia e uma de dióxido de carbono se combinam (Czarnecki & Baker, 1984). Toda a uréia formada no organismo é sintetizada no fígado, a partir da combinação do aminoácido ornitina com uma molécula de dióxido de carbono e uma de amônia, formando uma segunda substância, a citrulina. Esta, por sua vez, se combina com outra molécula de amônia, formando a arginina, a qual se desdobra formando ornitina e uréia. A uréia ganha a circulação sanguínea e é eliminada pelo rim enquanto que a ornitina é reutilizada no ciclo da uréia (Guyton & Hall, 1996).

O metabolismo das proteínas sofre regulação através da ação de alguns hormônios. O hormônio do crescimento intensifica a síntese de proteínas celulares, provocando aumento das proteínas celulares e queda da concentração de aminoácidos no plasma (Kimball et al, 1994). A insulina aumenta a disponibilidade de glicose para as células o que, de certa forma, economiza o emprego de aminoácidos para fins energéticos, favorecendo a síntese protéica (Kimball et al, 1994). Os glicocorticóides reduzem a quantidade de proteínas da maioria dos tecidos, com a exceção das proteínas hepáticas e plasmáticas. Dohm (1985) observou, em humanos, que os glicocorticóides atuam aumentando a degradação protéica tecidual, fazendo com que haja aminoácidos disponíveis nos líquidos do organismo, favorecendo assim a

síntese de proteínas hepáticas e plasmáticas. Esta ação dos glicocorticóides favorece a gliconeogênese e a cetogênese. Segundo Dohm (1985), a testosterona, o hormônio sexual masculino, favorece a deposição protéica nos tecidos por um determinado período de tempo. Os pesquisadores Szepesi & Freedland (1969), relataram que a tiroxina aumenta a velocidade de reação do metabolismo protéico, tanto no catabolismo quanto no anabolismo e se os carboidratos e as gorduras estão em quantidades insuficientes para a obtenção de energia, a tiroxina provoca rápida degradação protéica. Por outro, lado se houver carboidratos, gorduras e proteínas em quantidades adequadas, a tiroxina promove uma rápida síntese protéica. Em animais em crescimento com deficiência de tiroxina, ocorre uma intensa diminuição no crescimento, devido à redução da síntese protéica.

2.2 Necessidades protéicas dos cães.

Segundo Melnick & Cowgill, citados por Case et al (1998), quando se administram dietas que contêm fontes protéicas de alta qualidade, os cães requerem uma porcentagem entre 4% e 7% da energia metabolizável oriunda das proteínas. Já Schaeffer et al (1989) comprovam que se às fontes protéicas forem de baixa qualidade, a necessidade aumenta em até 20% de energia metabolizável. Este valor corresponde a 21% de proteína em um alimento seco e que contenha 3500kcal de energia metabolizável. Segundo Gessert & Phillips, citados por Case et al (1998), para animais em crescimento, estudos iniciais indicaram necessidades mínimas entre 17 e 22% da energia metabolizável oriundas das proteínas. Burns et, al (1982), utilizando o ganho de peso como

critério, estabeleceram necessidades inferiores, no entanto utilizaram fontes protéicas de maior qualidade. Os dados do balanço de nitrogênio daquele experimento estimaram que 20% ou mais da energia metabolizável seja oriunda de proteína. Schaeffer et al (1989) Calcularam uma porcentagem mínima de 19,5% das calorias do cão em crescimento deve ser administrada como proteína de alta qualidade para maximizar a retenção de nitrogênio nos filhotes de cães com idades compreendidas entre 8 e 17 semanas. Em outro estudo, Sheffy (1989), sugeriu que 16% das calorias sejam oriundas das proteínas.

A importância de levar em conta a digestibilidade das proteínas e o conteúdo de aminoácidos, quando se calcula a necessidade protéica de um animal é calculada, é ressaltada pela comparação das necessidades protéicas dada pelo National Research Council (NRC) de 1974 e 1985. As recomendações de 1985 do NRC (Tabela 2) sugeriram necessidades protéicas mínimas para cães em crescimento de 11,4% das calorias de EM. Este valor é aproximadamente a metade do valor proposto na publicação de 1974. Esta mudança, registrada em 1985, foi consequência direta da publicação de certo número de estudos que calcularam as necessidades da maioria dos aminoácidos essenciais para o cão. Ainda que estes estudos tenham proporcionado informação valiosa a respeito das exigências mínimas de aminoácidos, foram realizados com dietas que continham níveis muito controlados de aminoácidos purificados (Case et al, 1998). O emprego destes estudos, para extrair as recomendações de níveis de proteínas nos alimentos para cães, originou estimativas muito inferiores àquelas baseadas em dietas

protéicas mistas. Em conseqüência, a dificuldade de interpretação e de utilização das recomendações de 1985 levou alguns fabricantes de alimentos para cães a retomarem as recomendações de 1974 para a formulação de suas dietas (Case, et al, 1998). Quando o American Feed Control Officials (AAFCO) publicou o perfil de nutrientes para cães em 1992 (Tabela 3), restauraram as necessidades protéicas originais para os períodos de crescimento e reprodução, publicados conforme o NRC de 1974. O comitê recomendou um nível mínimo de 18% de proteínas com base em matéria seca para alimentação de adulto e de 22% para períodos de crescimento e reprodução (Case et al, 1998).

Estes valores são equivalentes aos 18 e 22% de EM em um alimento que contenha 3500 kcal/k. Se a densidade energética da dieta for superior, deve-se efetuar os ajustes apropriados do conteúdo protéico. Estes valores estão normalmente abaixo dos níveis encontrados nas dietas comerciais para cães. Além disto, é até surpreendente que não exista na literatura recente estudos a respeito de relação ótima dos aminoácidos.

Alguns aminoácidos merecem atenção especial ao formular dietas para cães. Milner (1981) sugeriu que as necessidades de lisina aumentam quando aumenta o nível de proteína da dieta. Schaeffer et al (1989) demonstraram este efeito também em outras espécies, o que sugere a ocorrência de desequilíbrios e competições com a lisina, aumentando desta maneira a sua exigência. Este efeito pode ser importante, pois a lisina é normalmente o aminoácido limitante em dietas para cães baseadas em cereais. A metionina é essencial para cães, mas a cisteína é prescindível. No entanto, devido ao fato de o organismo

utilizar a metionina para sintetizar a cisteína, metade das necessidades de metionina do animal pode ser satisfeita através de níveis adequados de cisteína (Burns & Milner, 1981). Por este motivo é preferível considerar nos animais as necessidades totais de aminoácidos sulfurados ao invés de considerar apenas as necessidades de metionina. Burns et al (1982) relatam que também há diferenças entre raças de cães quanto às necessidades de metionina. Blaza et al (1982) trabalharam com diferentes relações de metionina e cisteína, com as raças Beagle e Labrador, em fase de crescimento. A raça Beagle obteve maior retenção de nitrogênio com níveis de metionina e cisteína de 0,57% e 0,15% respectivamente, enquanto que a raça Labrador obteve maior retenção de nitrogênio com níveis de metionina e cisteína de 0,74% e 0,15% respectivamente. É necessário um estudo comparando diferentes raças de cães e suas respectivas necessidades de aminoácidos. É possível especular se raças que possuam maior pelagem, como a Labrador, possuam uma maior necessidade de metionina, quando comparadas com raças com menos pelos como a Beagle.

Milner (1979), trabalhando com cães da raça Beagle, utilizou diversos níveis de inclusão de aminoácidos. Em um primeiro experimento comparou uma dieta controle, contendo 0,82% de metionina, 0,82% de treonina, 0,175% de triptofano, 0,35% de histidina e 0,82% de isoleucina, com dietas deficientes ou isentas de metionina e treonina. A dieta controle foi comparada com dietas contendo a metade da quantidade de metionina ou isenta de metionina, metade da quantidade de treonina ou isenta treonina. Os animais alimentados com dietas deficientes de metionina e treonina tiveram um menor consumo de

ração, maior perda de peso e balanço de nitrogênio negativo, todos significativamente menores em relação aos animais que receberam dieta controle. Os animais que consumiram estas dietas também tiveram, um nível significativamente maior de uréia plasmática também consumiram a dieta controle. Segundo Milner (1979) o maior nível de uréia plasmática foi devido a um desequilíbrio no balanço de aminoácidos, acarretando um maior catabolismo protéico. Também foi constatada uma menor excreção urinária de creatinina, provavelmente pela perda de massa muscular destes animais. Os animais alimentados com 50% da metionina da dieta controle não tiveram diferenças significativas no consumo de ração, ganho de peso e balanço de nitrogênio em relação aos animais que receberam dieta controle. Porém, quatro dos cinco animais alimentados com esta dieta apresentaram dermatites. Dentro dos parâmetros bioquímicos, a uréia plasmática foi significativamente maior quando comparada à uréia dos animais alimentados com a dieta controle. Os animais alimentados com metade da treonina da dieta controle tiveram diferenças significativas e negativas nos itens ganho de peso e balanço nitrogenado e uma maior taxa de uréia plasmática quando comparados com os animais alimentados com a dieta controle. Em um segundo experimento Milner (1979), seguindo a mesma metodologia do primeiro experimento, comparou a dieta controle com dietas que continham diferentes níveis de inclusão dos aminoácidos triptofano, histidina e isoleucina. Em todas as dietas deficientes de um destes aminoácidos os animais apresentaram menor consumo de ração, menor ganho de peso e balanço de nitrogênio negativo, bem como maiores níveis de uréia plasmática e menor excreção de creatinina, quando

comparados com animais que consumiram a dieta controle. Os animais alimentados com a dieta com redução de 50% do triptofano tiveram diferenças negativas significativas no consumo de ração e no ganho de peso. O balanço de nitrogênio foi significativamente menor quando comparado com a dieta controle. Nesta dieta o nível de uréia plasmática foi significativamente maior e a excreção de creatinina significativamente menor quando comparados à dieta controle. Os animais alimentados com a dieta de 50% de redução de histidina tiveram melhores resultados, porém sem serem significativos em ganho de peso, consumo de ração e balanço de nitrogênio em relação aos animais alimentados com a dieta com redução de 50% de triptofano. Porém os resultados de ganho de peso e balanço nitrogenado foram significativamente piores que os resultados obtidos pelos animais que receberam a dieta padrão. Nos parâmetros bioquímicos apenas a uréia plasmática teve diferença significativa, para mais, em relação à dieta controle. Os resultados obtidos com a dieta com redução de 50% de isoleucina foram significativamente diferentes, para menos, apenas no item ganho de peso em relação à dieta controle, apresentando melhores resultados quando comparada às outras dietas testadas. Não houve diferenças significativas nos parâmetros bioquímicos em relação à dieta controle.

Estes trabalhos demonstram bem a eficiência do uso do nível de uréia plasmática, seguindo a metodologia proposta por Eggum (1970), como parâmetro para a medição de qualidade de proteína, pois, comparando os diversos itens analisados neste trabalho, a uréia plasmática quase sempre demonstrou diferenças significativas, quando alguns itens não demonstraram

(ver apêndices 2 e 3). Kunta e Harper (1961), citados por Eggun (1970), trabalhando com ratos, compararam dietas isoproteicas. Aquelas que tinham um balanço adequado de aminoácidos, para a referida espécie, resultavam em menor quantidade de uréia plasmática quando comparadas com aquelas que eram desequilibradas em aminoácidos, ou seja, com menor valor biológico.

Milner (1981), trabalhando com cães em crescimento, encontrou níveis decrescentes de uréia plasmática, à medida que aumentou a suplementação de lisina. Analisando também o peso corporal, Milner (1981) concluiu que valores de 0,577% ou mais, de lisina, dependendo da fase do animal, são os mais indicados. Os níveis de uréia plasmática resultantes destes níveis de lisina na dieta foram significativamente mais baixos do que em dietas com níveis mais baixos de lisina. No entanto, comparando com níveis mais altos de lisina, até mesmo com aqueles que foram considerados excessivos, não houve diferença significativa nos níveis de uréia plasmática. Milner (1981) entendeu que o excesso de lisina pode levar a uma diminuição do catabolismo protéico ou um incremento na formação da glutamina o que resultaria na formação de menores níveis de uréia plasmática. Burns & Milner (1981), trabalhando com cães em crescimento da raça Beagle, compararam dietas com 0,20% de L-metionina e níveis crescentes de cisteína que foram de 0% a 0,30%. Estes pesquisadores obtiveram resultados que demonstraram que o melhor ganho de peso e o menor nível de uréia plasmática foram obtidos com a inclusão de 0,30% de cistina. Burns & Milner (1981) concluíram que o menor nível de uréia plasmática, com 0,30% de cistina, foi devido a um melhor equilíbrio no balanço de aminoácidos. Burns et al (1982), trabalhando com cães e ratos em

crescimento, obtiveram melhores resultados com proteína oriunda da caseína em comparação com mesmos níveis de proteína proveniente da proteína isolada da soja e do glútem de trigo. A caseína obteve, para ambas espécies, melhores índices de digestibilidade aparente e valor biológico, além de proporcionar maior ganho de peso para os animais. O trabalho também demonstrou menores valores de uréia plasmática resultantes da dieta com caseína.

TABELA 2. Necessidades mínimas de proteínas e aminoácidos segundo a AAFCO, (1994).

Nutriente % em base seca	Crescimento e reprodução	Manutenção do adulto
Proteínas	22,0	18,0
Arginina	0,62	0,51
Histidina	0,22	0,18
Isoleucina	0,45	0,37
Leucina	0,72	0,59
Lisina	0,77	0,63
Metionina-Cisteína	0,53	0,43
Fenilalanina-Tirosina	0,89	0,73
Treonina	0,58	0,48
Triptofano	0,20	0,16
Valina	0,48	0,39

TABELA 3. Necessidades mínimas de aminoácidos Segundo o NRC, (1985).

Nutrientes	Por 1000 kcal de EM	Em peso seco (3,67 kcal de EM/g)
Arginina	1,37g	0,50%
Histidina	0,49g	0,18%
Isoleucina	0,98g	0,36%
Leucina	1,59g	0,58%
Lisina	1,40g	0,51%
Metionina-Cisteína	1,06g	0,39%
Fenilalanina-Tirosina	1,95g	0,72%
Treonina	1,27g	0,47%
Triptofano	0,41g	0,15%
Valina	1,05g	0,39%

2.3 Métodos para determinar a qualidade das proteínas

Vários testes analíticos predizem a qualidade da proteína baseando-se, inteiramente, na composição em aminoácidos essenciais da proteína. A pontuação química é um índice que implica na comparação entre a composição de aminoácidos de uma determinada fonte de proteína e o padrão de aminoácido de uma proteína referência, de muito alta qualidade. A proteína do ovo é utilizada usualmente como proteína referência, a qual é atribuída à pontuação química de 100. Segundo Oser (1959), citado por Case et al (1998), a porcentagem do aminoácido limitante, na proteína, relativamente ao valor correspondente na proteína de referência, determina a pontuação química da proteína examinada. Os três aminoácidos das proteínas das dietas que são, com mais freqüência, limitantes, são a metionina, o triptofano e a lisina. A arginina e a isoleucina, em alguns alimentos para animais domésticos, também são limitantes (Case et al, 1998).

Uma versão modificada da pontuação química, denominada de índice do aminoácido essencial (IAAE), mede a composição e a quantidade de aminoácidos presentes em uma fonte de proteína, ao invés de informar unicamente do aminoácido com maior déficit. O IAAE é calculado a partir da média geométrica das proporções de cada um dos aminoácidos essenciais da proteína em teste, em relação aos seus valores correspondentes na proteína de referência (Kronfeld, 1982).

Por último, o conteúdo total de aminoácidos (E/T) é calculado como a proporção do nitrogênio total de uma fonte de energia que é proporcionado

pelos aminoácidos essenciais. Apesar da pontuação química e o IAAE indicarem a qualidade do perfil de aminoácidos de uma proteína, o E/T mede a quantidade total de aminoácidos essenciais de uma fonte determinada de proteína (Case et al, 1998).

O quociente de eficiência protéica (REP) é um dos testes de alimentação mais simples e mais utilizados para a medição de qualidade de proteína. Ratos machos ou frangos em crescimento são alimentados por 28 dias, com uma dieta adequada, que contenha a proteína a ser estudada. As mudanças de peso são medidas e, com isto a REP é calculada e expressa em gramas de peso ganho, dividido pelo total de gramas de proteína consumida. O valor REP indica a capacidade de uma fonte de proteínas para transformar-se em tecido em um animal em crescimento (Kane et al, 1981).

O valor biológico e a utilização líquida de proteínas proporcionam medições da qualidade da proteína, mas estas determinações consomem mais tempo e são mais trabalhosas que o REP (Brown, 1989). Trata-se de uma medição da capacidade do organismo para converter os aminoácidos absorvidos em tecido orgânico. É necessário realizar estudos de equilíbrio de nitrogênio nos quais os nitrogênios alimentar, fecal e urinário são coletados e medidos (Case et al, 1998). Os animais devem estar em um estado de manutenção fisiológica e a dieta deve conter os hidratos de carbono e os lipídios adequados para assegurar que as proteínas contidas na dieta não sejam metabolizadas para obtenção de energia. O VB verdadeiro pode ser determinado tendo-se em conta, em primeiro lugar, as perdas fecais e urinárias de nitrogênio endógeno, quando o animal consome uma dieta sem proteínas.

Segundo Brown (1989), um problema que se apresenta na utilização do VB como medição na qualidade de proteínas reside em que não se leva em consideração a digestibilidade das proteínas. Teoricamente, a pequena porção absorvida de uma proteína muito indigestível poderia ter um VB muito elevado, se é utilizada de forma eficiente pelo organismo (Brown, 1989).

2.4 Medida de uréia no sangue como técnica para medir qualidade de proteína

É sabido que o conteúdo de uréia no sangue de ruminantes reflete a qualidade da proteína da dieta. Esta medida também é usada como técnica auxiliar em suínos (Eggum, 1970). O uso do nível de uréia no sangue como indicador de qualidade da proteína da dieta depende do controle de vários fatores.

Em experimentos com ratos e suínos em crescimento (Munchow & Bergner, 1968), citados por Eggum (1970), foi encontrada uma correlação altamente negativa entre o valor biológico da proteína e o conteúdo de uréia no sangue. Os coeficientes foram de 0,99 e 0,66 para ratos e suínos respectivamente, com a proteína do ovo sendo usada como uma proteína de referência. Naquele mesmo experimento foi observado que o conteúdo de uréia no sangue aumentou com o conteúdo de proteína na dieta. O conteúdo de uréia aumentou em 2,4 unidades cada vez que foi fornecido aos ratos um adicional de 10mg de nitrogênio por dia. Foi concluído que o conteúdo de uréia no sangue depende da qualidade e quantidade de proteína suprida na dieta. No entanto, os mesmos pesquisadores não encontraram relação entre o peso

dos animais e o conteúdo de uréia no sangue. Fannesbeck & Symons (1969), citados por Eggum (1970), em experimentos com cavalos, também demonstraram que a quantidade de uréia no sangue depende primeiro da qualidade e da quantidade de proteína na dieta, mas também pode ser afetada por falha renal. Em experimentos com suínos lactentes, Pastuszewska (1967) citado na publicação de Eggum (1970), obteve os mesmos resultados. Doornembal et al (1983) demonstraram que o nível de uréia plasmática aumenta com a idade do suíno e Kessler (1987) verificou que a uréia plasmática em suínos em crescimento diminuiu à medida que diminuiu proteína digestível da dieta.

Kornegay et al (1964) citados por Eggum (1970) descobriram, como era esperado, que proteína em grande quantidade na dieta causa um aumento na uréia sanguínea. Por meio de aminoácidos sintéticos Kunta & Harper (1961), em experimentos com ratos, demonstraram como o desequilíbrio de aminoácidos aumenta o conteúdo de uréia no sangue e como isto pode ser reduzido restabelecendo o equilíbrio dos aminoácidos. O conteúdo de uréia alcançou o ponto máximo 3 horas após a refeição. Esta dependência com o tempo de alimentação foi verificada por vários autores (Hazewinkel & Nap, 1993), (Zentek & Mischke, 1997) em experimentos com cães. No entanto, não encontraram um máximo claramente definido, mas um aumento constante de até 3 horas e depois disto um nível quase constante nas duas horas seguintes. A partir disso parece que pelo menos três fatores influenciam o conteúdo de uréia no sangue, a saber, a qualidade de proteína, quantidade de proteína e o tempo após a alimentação. Padronizando a técnica é possível eliminar os

efeitos tempo e quantidade, desta forma a qualidade da proteína deverá ser decisiva no nível de uréia no sangue.

A partir da constatação experimental de que a uréia plasmática é uma medida indireta da qualidade da proteína ingerida, de acordo com a metodologia proposta por Eggum (1970), se definidos os efeitos de tempo de coleta e quantidade de proteína ingerida, este parâmetro poderá ser uma excelente ferramenta para avaliar a qualidade da proteína ingerida pelos animais, incluindo os cães.

2.5 Hipótese de trabalho

As proteínas, como nutrientes, são de fundamental importância para todos os animais e adquirem uma maior importância para animais de origem carnívora, como os cães. O presente trabalho pretende demonstrar a aplicabilidade da técnica proposta por Eggum (1970) para a partir daí, em caso de resultados positivos, buscar a determinação de um balanço adequado de aminoácidos para cães em crescimento. Mais especificamente, pretende-se testar que cães em crescimento, como outras espécies, têm uma curva temporal definida de resposta da uréia sanguínea à ingestão proteica, que níveis diferenciados de proteína ingerida determinam níveis diferentes de uréia sanguínea e, finalmente, que a melhoria da qualidade da proteína dietética pela suplementação com aminoácidos sintéticos determina redução nos níveis sanguíneos de uréia.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local

OS experimentos foram desenvolvidos em três locais diferentes, em períodos alternados de tempo. Em uma primeira etapa, os experimentos foram realizados na clínica veterinária Pronto Atendimento Veterinário, localizada em Porto Alegre, RS. Posteriormente, uma nova bateria de experimentos foi conduzida no canil da Polícia do Exército em Porto Alegre, RS, e em uma terceira etapa, os experimentos foram realizados em canil particular, do Professor orientador Alexandre de Mello Kessler, na cidade de Porto Alegre, RS.

3.2 Período

A primeira etapa dos experimentos iniciou em 21 de janeiro e terminou em 8 de fevereiro de 2002. A segunda etapa dos experimentos teve início em 13 de maio e o término em 31 de maio de 2002. A última etapa iniciou em 2 de setembro e terminou em 13 de setembro 2002.

3.3 Instalações e manejo

Os animais foram mantidos em boxes protegidos e fechados. Durante o fornecimento das dietas experimentais, os animais foram separados e alimentados de forma individual, em períodos pré-estabelecidos. O fornecimento de água, durante os experimentos, foi de à vontade.

3.4 Animais experimentais

Foram usados 9 cães no total das três etapas dos experimentos. Na primeira etapa foram usados 5 cães da raça Pit Bull, com dois meses de idade, subdivididos em 3 fêmeas e 2 machos. Durante a segunda etapa foram usados 2 cães da raça Pastor Alemão, com cinco meses de idade, sendo um macho e uma fêmea. Na última etapa foram usados dois cães da raça Dinamarquesa, com três meses de idade, sendo um macho e uma fêmea. Os cães da raça Pit Bull, ao início do experimento, pesavam, aproximadamente 5 kg. Os cães Pastores Alemães pesavam, em média 15 kg e os da raça Dinamarquês aproximadamente 12 kg.

3.5 Dietas experimentais

As dietas utilizadas nos experimentos foram feitas no Laboratório de Ensino Zootécnico “Dr. Geraldo Velloso Vieira” (LEZO), da Faculdade de Agronomia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A composição básica das dietas foi, Farinha de vísceras de aves, grão de arroz, palatabilizante, sal e aminoácidos, variando a proporção destes ingredientes conforme o tratamento. As dietas foram oferecidas na forma farelada, levemente umidificada com água. A composição nutricional dos ingredientes está no Apêndice 1.

3.6 Período experimental

O período experimental foi dividido em três etapas. Em cada etapa foram utilizados animais da mesma raça. A primeira etapa foi executada com animais da raça Pit Bull. Posteriormente, na segunda etapa, foram empregados cães da raça Pastor Alemão. A terceira etapa foi conduzida com animais da raça Dinamarquês. Em cada etapa foram executados três experimentos. O primeiro experimento teve como objetivo a determinação de uma curva, relacionando os níveis de uréia sanguínea e o tempo após o consumo da dieta. Através da curva, foi determinado o tempo ideal de coleta, tendo sido observado o pico de uréia após o fornecimento da dieta. O segundo experimento relacionou os níveis de uréia sanguínea com diferentes níveis de proteína na dieta. O terceiro experimento comparou, através dos níveis de uréia sanguínea, diferentes níveis de inclusão de aminoácidos na dieta, a fim de determinar um balanço

adequado de aminoácidos em dietas para cães. Os períodos experimentais foram precedidos de três dias de adaptação às dietas experimentais. Nos períodos experimentais, os animais receberam a dieta experimental às 9:00 h, antecedendo-se então as coletas de sangue. Uma quantidade similar de alimento (dieta comercial para filhotes) foi fornecida às 18h do mesmo dia a fim de complementar a alimentação diária dos animais experimentais.

3.6.1. Experimento 1

Após um período de 15 horas de jejum, porém com água à vontade, foi fornecida aos animais a dieta basal (tabela 4). Cada animal foi alimentado, de forma individual, e separado dos outros. Durante a primeira etapa, os cães da raça Pit Bull receberam 200g de ração cada um. Os cães pastores alemães, na segunda etapa, receberam 400g, enquanto que os dinamarqueses receberam 300g cada, durante a terceira etapa. Passada uma hora após a alimentação, foi iniciada a coleta de sangue, que foi feita cinco vezes, com espaço de uma hora entre uma coleta e outra.

O objetivo deste experimento foi de identificar o pico de uréia sanguínea após o consumo da dieta, a fim de obter o melhor horário de coleta do sangue a ser utilizado nos outros experimentos.

3.6.2. Experimento 2

Neste experimento os animais, após 15 horas de jejum, foram arraçoados, de forma individual, durante cinco dias com as dietas correspondentes aos tratamentos 19, 24, 30, 36 e 41 (tabela 5) que foram os níveis aproximados de proteína bruta nas dietas. A quantidade de dieta experimental, fornecida aos animais, foi a mesma do experimento 1, durante

todos os dias correspondentes a este período experimental. A seqüência dos tratamentos, nos 5 dias de teste, para cada animal, foi sorteada, de acordo com o delineamento “Cross Over”. (apêndice 4)

O objetivo deste experimento foi relacionar o efeito de diferentes níveis de proteína na dieta, com os níveis de uréia sanguínea, resultantes destas dietas.

3.6.3. Experimento 3

Neste experimento, seguindo o mesmo procedimento dos experimentos anteriores, os cães foram alimentados com as dieta dos tratamentos 0,58, 0,62, 0,66 e 0,70, representando as relações met+cis/lisina da dieta (tabela 6), durante 4 dias. A quantidade de dieta experimental, fornecida aos animais, foi a mesma do experimento 1, durante todos os dias correspondentes a este período experimental. A seqüência dos tratamentos, nos 4 dias de teste, para cada animal, foi sorteada, de acordo com o delineamento “Cross Over”. (apêndice 5)

TABELA 4. Dieta basal

Ingredientes (%)	Dieta basal %
Grão de arroz	55,30
Farinha de vísceras	40,00
Palatabilizante*	4,00
Sal	0,70
Lisina	0,00
Treonina	0,00
Triptofano	0,00
DL.metionina	0,00
Nutrientes (%)	
Proteína	29,89
Carboidrato	40,37
Fibra bruta	0,72
Gordura	6,70
Cálcio	1,80

Fósforo total	1,13
Sódio	0,48
Arginina	1,86
Lisina	1,49
Met+Cis	0,86
Metionina	0,54
Triptofano	0,25
Treonina	1,01

Relações (%)

Treonina/lisina	0,68
Triptofano/lisina	0,17
Met+Cis/lisina	0,58

* Hidrolizado de carne e vísceras de aves

TABELA 5. Dietas utilizadas no 2º experimento

Ingredientes	19 %	24 %	30 %	36 %	41 %
Grão de arroz	75,30	65,30	55,30	45,30	35,30
Farinha de vísceras	20,00	30,00	40,00	50,00	60,00
Palatabilizante	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
Sal	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70
Lisina	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Treonina	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Triptofano	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
DL.metionina	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Nutrientes					
Proteína	18,62	24,26	29,89	35,54	41,18
Carboidrato	54,97	47,67	40,37	33,07	25,77
Fibra bruta	0,97	0,85	0,72	0,59	0,46
Gordura	4,42	5,56	6,70	7,84	8,98
Cálcio	0,91	1,36	1,80	2,24	2,69
Fósforo total	0,70	0,92	1,13	1,34	1,55
Sódio	0,39	0,44	0,48	0,53	0,58
Arginina	1,18	1,52	1,86	2,20	2,55
Lisina	0,88	1,19	1,49	1,79	2,09
Met+Cis	0,57	0,72	0,86	1,01	1,16
Metionina	0,35	0,45	0,54	0,63	0,73
Triptofano	0,17	0,21	0,25	0,28	0,32
Treonina	0,63	0,82	1,01	1,21	1,39

Relações					
Treonina/lisina	0,71	0,69	0,68	0,67	0,66
Triptofano/lisina	0,19	0,17	0,17	0,16	0,15
Met+Cis/lisina	0,64	0,60	0,58	0,56	0,55

TABELA 6. Dietas utilizadas no 3º experimento

Ingredientes	0,58	0,62	0,66	0,70
Grão de arroz	55,00	55,00	55,00	55,00
Farinha de vísceras	40,00	40,00	40,00	40,00
Palatabilizante	4,00	4,00	4,00	4,00
Sal	0,70	0,70	0,70	0,70
Lisina	0,00	0,00	0,00	0,00
Treonina	0,00	0,02	0,03	0,05
Triptofano	0,00	0,02	0,04	0,06
DL.metionina	0,00	0,06	0,12	0,19
Amido de milho	0,30	0,20	0,11	0,00
Nutrientes				
Proteína	29,89	29,95	30,01	30,06
Carboidrato	40,37	40,30	40,22	40,15
Fibra bruta	0,72	0,71	0,71	0,71
Gordura	6,70	6,70	6,70	6,70
Cálcio	1,80	1,80	1,80	1,80
Fósforo total	1,13	1,13	1,13	1,13
Sódio	0,48	0,48	0,48	0,48
Arginina	1,86	1,86	1,86	1,86
Lisina	1,49	1,49	1,49	1,49
Met+Cis	0,86	0,92	0,98	1,04
Metionina	0,54	0,60	0,66	0,72
Triptofano	0,25	0,26	0,28	0,30
Treonina	1,01	1,03	1,04	1,06
Relações				
Treonina/lisina	0,68	0,69	0,70	0,71
Triptofano/lisina	0,17	0,17	0,19	0,20
Met+Cis/lisina	0,58	0,62	0,66	0,70

O objetivo deste experimento foi de relacionar dietas com o mesmo conteúdo protéico, porém com diferentes níveis de inclusão de aminoácidos, com os níveis de uréia sanguínea, tentando obter um balanço adequado de aminoácidos, em dietas para cães. Para tanto, foram adicionados os aminoácidos metionina, treonina e triptofano, em diferentes níveis, de forma a obter, no tratamento 3, as relações met+cis:lis, treonina:lisina e triptofano:lisina, de acordo com as propostas para suínos por Rostagno (2000).

O uso das propostas para suínos foi devido ao fato das dietas comerciais para cães utilizarem, atualmente, níveis superiores de aminoácidos em relação às tabelas tanto do NRC quanto da AFFCO. O uso de valores para suínos foi o mais indicado para os testes, já que são superiores aos encontrados nas tabelas nutricionais para cães.

3.7. Análises laboratoriais

As dosagens de uréia sanguínea foram realizadas no laboratório de análises clínicas veterinárias Pet Lab, situado em Porto Alegre, RS.

3.7.1 Procedimentos de coleta

As coletas foram feitas com seringas descartáveis, na quantidade aproximada de cinco mililitros de sangue. Imediatamente, depois de coletado, o sangue foi depositado em tubos de coleta e levado para análise laboratorial.

Nos animais, os vasos utilizados para a coleta de sangue foram à veia cefálica, localizada no antebraço e, quando necessário, a veia jugular externa, localizada na lateral do pescoço.

3.7.2. Método de determinação da uréia sanguínea

Existem vários métodos para a determinação da uréia, mas os que utilizam acoplamento de enzimas são os mais convenientes e extensivamente usados em laboratórios clínicos (Bergmeyer, 1985). Neste método a uréia é hidrolisada pela urease, gerando amônia e dióxido de carbono. A amônia reage com o 2 cetoglutarato e NADH, em uma reação catalisada pela glutamato desidrogenase, ocorrendo oxidação do NADH a NAD. A conseqüente redução da absorvância, medida em 340 nm, é proporcional à concentração de uréia na amostra. Estas medidas são feitas em fotômetro com cubeta termostizada, capaz de medir com exatidão a absorvância em 340 nm. O resultado final é expresso em miligramas de uréia por decilitro de soro sanguíneo.

3.8. Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado para o experimento 1 foi em blocos casualizados, sendo blocos os animais individuais, e os tratamentos os tempos de coleta de sangue, após a refeição teste. Os dados foram analisados por análise de covariância, sendo os blocos a variável classificatória e o tempo a variável contínua, conforme o modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + h_j + h_j^2 + e_{ijk}$$

Sendo μ a média geral, Y_{ijk} cada observação, A_i o efeito do animal i ; h_j , o efeito linear da hora da coleta j ; h_j^2 , o efeito quadrático da hora de coleta j e e_{ijk} , o erro aleatório associado a cada observação.

Para os experimentos 2 e 3, foi utilizado o delineamento "Cross-Over", onde os tratamentos foram sorteados para cada animal, em cada dia, para estabelecer independência de efeitos, por se tratar de medidas repetidas. A disposição dos animais, tratamentos e dias estão nos apêndices 7 e 8. A análise seguiu o modelo linear aditivo:

$Y_{ijk} = \mu + A_i + D_j + T_k + e_{ijk}$, onde:

Y_{ijk} é a observação, μ a média geral, A_i é o efeito do animal, D_j é o efeito do dia da coleta j , T_k é o efeito linear do tratamento (nível de proteína bruta ou aminoácidos) e e_{ijk} é o erro aleatório.

A análise estatística foi procedida pelo modelo linear generalizado com covariáveis, utilizando-se o pacote estatístico STATGRAPHICS plus 4.1.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinação do pico de uréia sérica pós-alimentação

TABELA 7. Níveis individuais de uréia sérica pós-alimentação em mg/dL

Animais	Hora 1	Hora 2	Hora 3	Hora 4	Hora 5	Média (QM) ¹
Animal 1	16,63	17,52	16,34	14,82	12,93	15,64a
Animal 2	17,96	21,91	23,86	18,34	12,12	18,83ab
Animal 3	15,47	23,15	21,32	18,99	11,69	18,12ab
Animal 4	19,42	19,10	17,96	17,47	14,72	17,73ab
Animal 5	20,29	23,97	23,91	23,53	13,47	21,03bc
Animal 6	23,06	28,48	29,29	27,78	27,20	27,16d
Animal 7	24,93	28,36	31,39	31,39	29,12	29,03de
Animal 8	26,21	33,48	37,93	37,54	36,86	34,40e
Animal 9	20,68	24,80	28,24	27,95	26,55	25,64cd
Média (QM)	20,18a	24,54ab	25,58b	24,20ab	20,52ab	

1. Média dos quadrados mínimos

*- Letras diferentes na mesma coluna ou mesma linha indicam diferença significativa segundo o teste de Tukey (5%)

A determinação do pico de uréia sérica pós-alimentação teve o intuito de determinar o ponto ideal de coleta a ser utilizado nos experimentos 2 e 3. O pico máximo de uréia foi encontrado três horas após a alimentação. Eggum (1970), trabalhando com ratos, também obteve resultados semelhantes de pico de uréia plasmática após a alimentação. Neste estudo a uréia plasmática manteve-se em um platô durante um período aproximado de duas horas. Zentek & Mischke (1997), trabalhando com cães e Tauson & Wamberg (1998), trabalhando com fêmeas de marta, obtiveram um pico de uréia plasmática aproximadamente entre três e quatro horas após a alimentação, e os níveis começaram a cair três horas após este pico. Naquele trabalho, os níveis, após

doze horas, voltaram aos níveis encontrados durante o período de jejum. Dietas com alto teor de proteína resultaram em níveis de uréia sanguínea maiores em relação às dietas com baixo teor de proteína, porém a curva do nível de uréia após alimentação mostra-se semelhante em ambas dietas, apresentando um nível crescente nas primeiras três horas, formando a partir daí um platô, durante três horas, e caindo nas horas seguintes (Tauson & Wamberg, 1998).

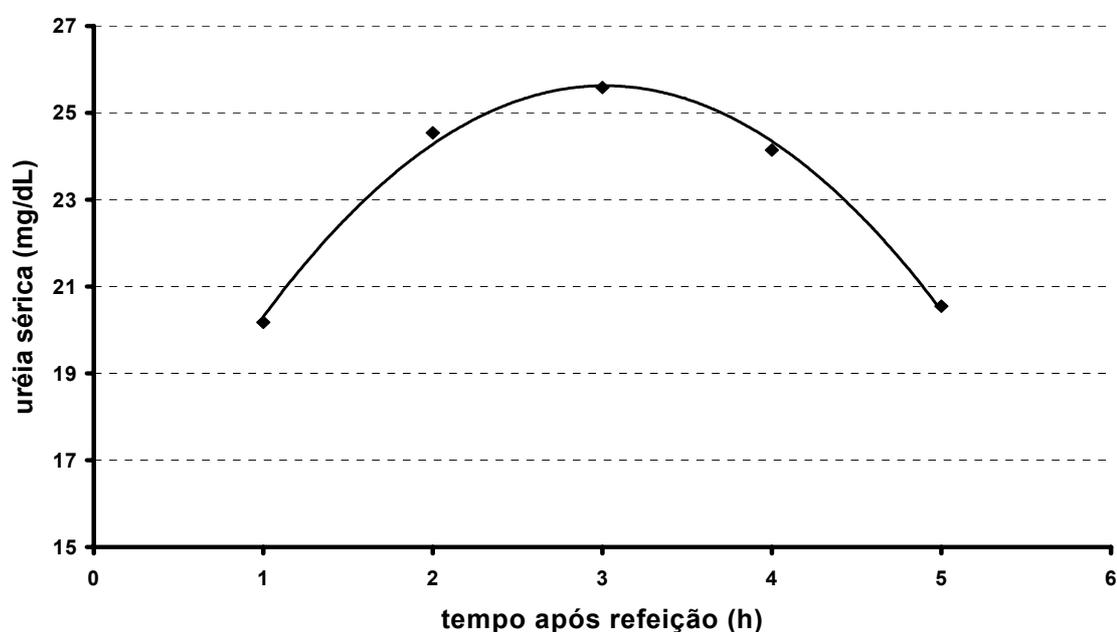


FIGURA 1. Concentrações de uréia sérica após alimentação dos animais. Curvas de regressão conforme a equação $Y = 13,7076 + \text{efeito do animal} + 7,9106h - 1,3127 h^2$, $R^2=0,74$

Os presentes resultados não evidenciaram a presença de platô, e sim uma resposta quadrática bem definida segundo a equação $y = 13,7076 + G$ (efeito do animal) $+ 7,9106 \times h - 1,3127 \times h^2$ ($p < 0,001$), que estima o ponto máximo exatamente em 3,00 horas. Às 5 horas, os níveis, aparentemente, já estavam próximos do nível de jejum.

4.2. Determinação da relação entre níveis de proteína e níveis de uréia sérica

TABELA 8. Relação entre diferentes níveis de proteína e valores individuais de uréia sérica em mg/dL em cães em crescimento, 3 horas após a refeição

Animais	18% PB	24% PB	29% PB	33% PB	41% PB	Média (QM) ¹
Animal 1	9,72	16,09	21,41	25,25	22,89	19,07a
Animal 2	15,26	18,50	19,26	23,00	33,27	21,85abc
Animal 3	14,55	17,90	24,60	29,65	35,90	24,52abcd
Animal 4	13,17	17,94	16,58	17,01	28,93	20,58ab
Animal 5	19,16	23,83	29,04	33,00	25,64	26,13bcd
Animal 6	23,24	26,09	28,54	28,65	30,69	27,44cd
Animal 7	25,28	27,99	29,88	31,68	32,15	29,39de
Animal 8	28,57	30,77	33,84	39,68	40,85	34,74e
Animal 9	25,81	27,45	31,20	28,95	35,44	29,77de
Média QM	19,09 a	22,90 ab	25,94 bc	29,77 cd	31,78 d	

1-Média dos quadrados mínimos

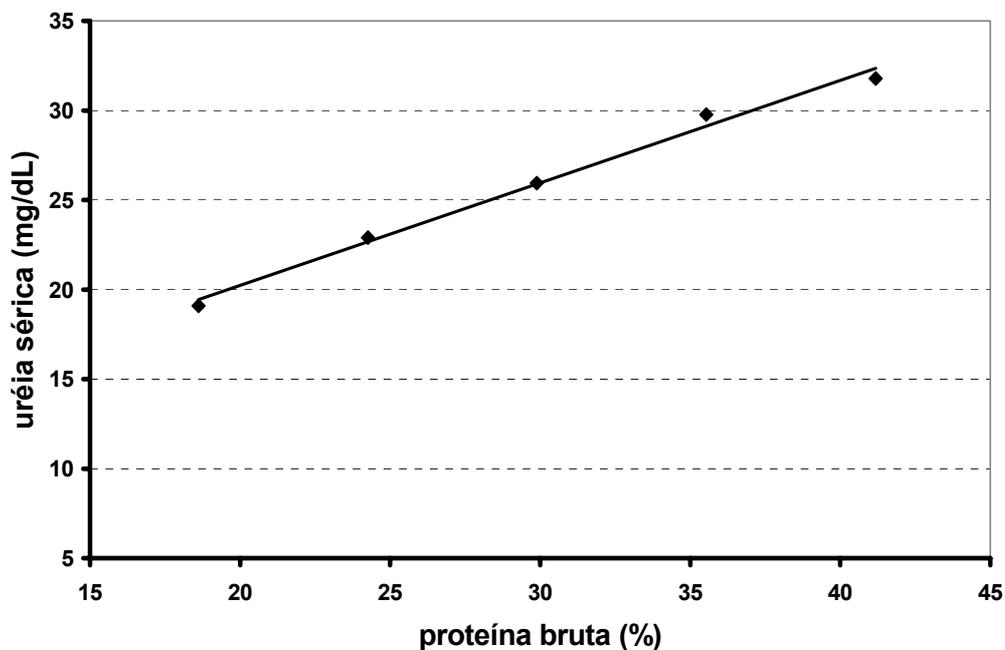
*-Letras diferentes na mesma coluna ou mesma linha indicam diferença significativa segundo o teste de Tukey (5%)

Este experimento relacionou os níveis de proteína da dieta e seus respectivos valores de uréia sérica de cães filhotes, medidos três horas após a refeição. A curva resultante (Figura 2) foi semelhante àquela obtida por Eggun (1970), trabalhando com ratos. Naquele estudo, os valores de uréia plasmática aumentaram de acordo com o aumento da proteína da dieta. Bovée (1991) trabalhando com cães observou aumento nos níveis de uréia plasmática a medida em que se aumentou o teor de proteína da dieta. Nap et al., (1991), em experimento com cães em crescimento observaram que a uréia plasmática mantinha-se sempre mais alta em cães submetidos com dietas de alta

proteína, do que cães alimentados com níveis médios ou baixos de proteína. O aumento da proteína na dieta acarreta um aumento dos níveis de uréia plasmática e um aumento da filtração glomerular (Nap et al 1991).

FIGURA 2. Relação entre diferentes níveis de proteína na dieta e níveis de uréia sérica nos animais. Curvas de regressão conforme a equação $Y = 8,82069 + \text{efeito do animal} + 0,5711PB$, $R^2=0,88$

A tabela 8 mostra que houve efeito do animal, sendo que os animais



mais jovens registraram níveis inferiores de uréia sérica em relação aos mais velhos. Mesmo com níveis mais baixos de uréia, os animais apresentaram o mesmo padrão de aumento de uréia no soro, a medida em que se aumentou a proteína da dieta, apresentado pelos animais mais velhos. Este menor nível de uréia plasmática nos animais mais jovens pode ser devido ao menor consumo de ração ou devido a uma maior retenção de nitrogênio, podendo ser também resultado da soma destes fatores.

4.3 Relação entre diferentes níveis de inclusão de aminoácidos na dieta e níveis de uréia plasmática.

Tabela 9. Relação entre diferentes níveis de inclusão de aminoácidos na dieta e níveis individuais de uréia sérica em mg/dL, em cães em crescimento, 3 horas após a refeição

Animais	relação met+cis/lis				Média (QM) 1
	0,58	0,62	0,66	0,70	
Animal 1	20,43	16,14	14,02	13,01	15,90a
Animal 2	22,84	21,75	20,72	19,86	21,29b
Animal 3	22,15	19,12	19,61	16,83	19,42b
Animal 4	28,57	27,90	26,33	25,80	27,15c
Animal 5	27,37	26,18	24,83	23,54	25,48c
Animal 6	36,10	37,71	33,02	30,63	34,36e
Animal 7	32,41	31,64	31,59	28,75	31,09d
Média QM	27,17 a	25,35 b	24,35 b	22,70 c	

1- Média dos quadrados mínimos

*-Letras diferentes na mesma coluna ou mesma linha indicam diferença significativa segundo o teste de Tukey (5%)

O tratamento 0,70 foi aquele que resultou em menor nível de uréia sérica, indicando que maiores quantidades de metionina, em relação às recomendações para cães, possam vir a ser benéficas. Rogers & Morris (1983) relatam que a metionina é normalmente o aminoácido limitante em alimentos comerciais para cães e gatos.

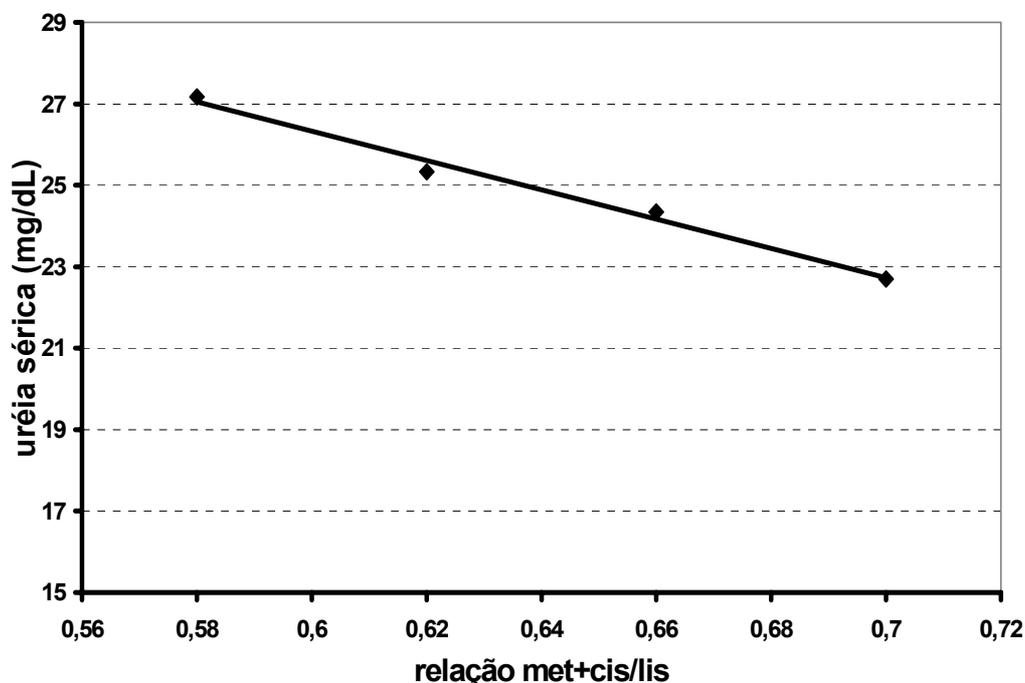


FIGURA 3. Relação entre os diferentes níveis de inclusão de aminoácidos na dieta e níveis de uréia sérica dos animais. Curvas de regressão conforme a equação $Y = 47,503 + \text{efeito do animal} - 35,962 \cdot \text{M+C/L}$, $R^2=0,91$)

Os animais apresentaram curvas semelhantes. Todos atingiram valores mais altos de uréia sérica no tratamento 0,58, e níveis decrescentes nos tratamentos 0,62 e 0,66 respectivamente. O tratamento 0,70, aquele de maior inclusão de aminoácidos, foi o que resultou, de forma linear e paralela em todos os animais, em menores valores médios de uréia sérica. A equação geral linear, ($y = 47,503 + A - 35,962 \cdot \text{AA}$; $p < 0,001$) demonstra que a redução nos níveis de uréia sérica contrasta com o aumento na relação met+cis/lis, e indica que a redução deve continuar em níveis mais altos. As quantidades totais de aminoácidos presentes nas dietas utilizadas no experimento 3 (tabela 6) foram sempre superiores as recomendações da

AAFCO (tabela 2). Como os resultados obtidos no experimento 3 demonstraram que os níveis de uréia sérica foram decrescentes à medida em que os níveis de aminoácidos suplementados aumentaram, pode-se especular que mesmo em níveis de aminoácidos essenciais superiores aos recomendados pela AAFCO, as relações entre eles e portanto o estabelecimento do conceito de proteína ideal para cães geram melhores respostas nos animais. A relação Met-Cis/Lis recomendada pela AAFCO é de 0,69, semelhante aquela que obteve menor nível de uréia sérica no experimento 3 (0,70). Por outro lado, é comum em dietas de níveis mais altos de PB para cães fique em valores mais baixos desta relação, como no caso da dieta basal deste experimento. Com a suplementação de DL-metionina, para elevar a relação met+cis/lis, também se elevou a relação met/cis, que foi de 0,54%/0,32% na ração basal para 0,74%/0,32% no tratamento 0,70. Os valores do tratamento 0,70 são os mais próximos do valor de 0,77%/0,15%, que mostraram as melhores respostas em cães Labrador no trabalho de Blaza et al (1982). Quanto às relações treonina/lisina e triptofano/lisina, na tabela da AAFCO encontram-se as relações 0,75:1 e 0,26:1, ambas superiores às utilizadas neste trabalho, embora os níveis destes aminoácidos sejam bem menores em valores absolutos. O efeito isolado destas relações deve ser estudado em trabalhos futuros. Nestes trabalhos podem ser comparadas dietas com relações entre aminoácidos idênticas, porém com diferentes quantidades totais de aminoácidos e/ou dietas com relações entre aminoácidos diferentes e com idênticas quantidades totais de aminoácidos na sua

composição. Com isto determina-se a importância da real da relação entre aminoácidos, bem como a quantidade total destes nas dietas para cães.

5. CONCLUSÕES

A curva de uréia sérica, demonstrou, em cães em crescimento, que o pico máximo de uréia ocorre 3 horas após o consumo, sendo este, portanto o melhor horário para coleta.

A medida em que foi aumentada a proteína bruta da dieta aumentaram os níveis de uréia sérica

A relação metionina+cistina/lisina de 0,70:1 foi aquela que resultou em menores níveis de uréia sérica

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSOCIATION OF AMERICAN FEED CONTROL OFFICIALS, **Official Publication**, AAFCO, 1994.
- BENEVENGA, N. J.; STEELE, R.D. Adverse effects of excessive consumption of amino acids. **Annu. Rev. Nutr.** , 4:157, 1984.
- BERGMEYER, H. U. **Methods of enzymatic analysis**. 3 ed., vol 8, Ed. Deerfield, Deerfield Beach: 444-449, 1985.
- BLAZA, S. E.; BOOLES, D.; BURGER I. H. Is carbohydrate essential for pregnancy and lactation in dogs? **Nutrition of the cat and dog**, pp.229-242, Cambridge University Press, Nova Iorque, 1989.
- BOVÉE, C. K. Influence of dietary on renal function in dogs. **J. Nutr. Supplement**.121: 128-139, 1991.
- BROWN, R. G. Protein in dog foods. **Can. Vet. J.** , 30:528-531, 1989.
- BURNS, R.A.; LA FAIVRE, M.H.; MILNER, J.A. Effects of dietary protein quantity and quality on the growth of dogs and rats. **J. Nutr.**,112:1843-1853, 1982.
- BURNS R. A.; MILNER, J. A. Sulfur amino acids Requirements of the immature beagle dog. **J. Nutr.** , 111: 2117-2122, 1981.
- BURNS R.A.; MILNER, J.A.; CORBIN J.E. Arginine an indispensable amino acid for mature dogs. **J. Nutr.**, 111: 1020-1024, 1981.
- CASE. L. P.; CAREY, D.; HIRAKAWA, D. **Nutrição canina e felina. Manual para profissionais**, Ed. Harcour Brace, Philadelphia, 389p., 1998.
- CHRISTENSEN, H. N. Interorgan amino acid nutrition. **Physiol. Rev.**, 62:1193, 1982.
- COWLEY, D. J.; CODE, C. F. Effects of secretory inhibitors on mucosal blood flow in nonsecreting stomach of conscious dogs. **Amer. J. Physiol.**, 218:270, 1970.

- CZARNECKI, G. L.; BAKER, D. H., Urea cycle function in the dog emphasis on role of arginine. **J. Nutr.** , 114: 581-590, 1984.
- DAVENPORT, H. W. **Physiology of the digestive tract.**, 4 ed, Year Book Medical Publishers, Chicago, 101-156, 1985.
- DIAMOND, J. D. Evolutionary design of intestinal nutrient absorption: enough but not too much. **News. Physiol. Sci.**, 6:92-96, 1991.
- DOHM, G. L. Protein metabolism during endurance exercise. **Fed. Proc.**, 44:348, 1985.
- DOOLITTLE, R. F. Proteins. **Sci.Am.**, 253 (Oct), 88-99, 1985.
- DOORNENBAL, H.; TONG, A.K.W.; MARTIN, A.H. Studies on the performance, development and carcass composition of the growing pig: effects of sex, feeding regime and age on blood serum parameter. **Can. J. Anim. Sci.**, 63:977-984, 1983.
- EGGUM, B. O. Blood urea measurement as a technique for assessing protein quality. **Br. J. Nutr.**, 24:983, 1970.
- FERRARIS, R. P.; DIAMOND, J. M. Specific regulation of intestinal nutrient transports by their dietary substrats. **Annu. Rev. Physiol.**, 51:125, 1989.
- GESSERT, C. G.; PHILLIPS, P. H. Protein in the nutrition of the growing dog. **J. Nutr.**, 58:415-421, 1956.
- GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Textbook of Medical Physiology**, 9. ed. Ed. Harcour Brace, Philadelphia, 877-882, 1996.
- HARPER, A. E. et al. Branched-chain amino acid metabolism. **Annu. Rev. Nutr.**, 4:409, 1984.
- HAZEWINKEL, H. A. W.; NAP, R. C. The influence of the dietary protein content on Growth in giant breed dogs. **Veterinary and Comparative Orthopedics and Traumatology**, 6: 1-8,1993.
- JENTOFT, N. et al. At crossroads of chemistry and immunology: catalyst antibodies. **Science**, 252: 659-667, 1991.
- KANE, E.; MORRIS, J. G.; ROGERS, Q. R. Acceptability and digestibility by adult cats diets made with various sources and levels of fat, **J. Anim. Sci.**, 53:1516-1523, 1981.

- KESSLER, A. M. Níveis de feno de alfafa em rações para suínos com relações energia: proteínas similares. **Dissertação de Mestrado**. Faculdade de Agronomia – UFRGS, 1987.
- KIMBALL, S. R., et al.: Regulation of protein synthesis by insulin. **Annu. Rev. Physiol.**, 56:321, 1994.
- KRONFELD, D.S. Protein quality and amino acid profiles of commercial dog foods. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, 18:679-683, 1982.
- KUNTA, U. S.; HARPER, A. E. Effects of dietary additions of amino acids on food intake and blood urea concentrations of rats fed low protein diets containing fibrin. **J. Nutr.**, 74:139, 1961.
- MELNICK, D.; COWGILL, G. R. The protein minima for nitrogen equilibrium with Different proteins, **J. Nutr.**, 13:401-424, 1937.
- MILNER, J. A., Assessment of the essentiality of metionine, threonine, tryptophan, histidine and isoleucine in immature dogs. **J. Nutr.**, 109:1351-1357, 1979.
- MILNER, J. A., Lisine requeriments of the immature dog. **J. Nutr.**, 111:40-45, 1981.
- NAP, R. C. et al. Growth and skeletal development in great dane pups fed different levels of protein intake. **J. Nutr. Supplement**, 121:107-113, 1991.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dogs**. Washington, DC, National Academy of Sciences, National Academy Press, 1985.
- OSER, B. L. An integrated essential amino acid index for predicting the biological value of proteins. **Protein and amino acid nutrition**, Academic Press, Nova Iorque, 281-295, 1959.
- ROGERS, Q. R.; MORRIS, J. G. Protein and amino acid nutrition of the cat. **American animal hospital association proceedings**, p. 333-336, 1983.
- ROSTAGNO, H.S., Composição de Alimentos e Exigências Nutricionais. **Tabelas Brasileiras para aves e suínos**, 2.ed., Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG p. 21-34, 2000.

- SCHAEFFER, M. C.; ROGERS, Q. R.; MORRIS, J. G. Protein in the nutrition of dogs and cats. **Nutrition of the dog and cat**, 159-205, Cambridge University Press, Nova lorque, 1989.
- SHEFFY, B. E. The 1985 revision of the National Research Council nutrient requirements of dogs and its impact on the pet food industry. **Nutrition of the dog and cat**, 11-26, Cambridge University Press , Nova lorque, 1989.
- STRYER, L., **Biochemistry**, W. H. Freeman Co., New York, p. 13-26, 1988 .
- SZEPESI, B.; FREEDLAND, R. A. Effect of thyroid hormones on metabolism. IV. Comparative aspects of enzyme responses. **Amer. J. Physiol.**, 216:1054, 1969.
- TAUSON, A. H.; WAMBERG, S., Effects supply on plasma urea and creatinina concentrations in female mink. **J. Nutr.**, 128: 25845-25868, 1998.
- ZENTEC, J.; MISCHKE, R. Soya and casein as dietary proteins for dog. **Journal of Animal and Animal Nutrition**, 77:139-148, 1997.

7. APÊNDICES

APÊNDICE 1. Composição química dos ingredientes utilizados nas dietas .

Nutrientes		Arroz quirera	Visceras farinha aves
Matéria Seca	%	88,10	90,00
Proteína Bruta	%	7,70	64,10
Gordura	%	1,20	12,60
Amido	%	73,00	-
Matéria Mineral	%	0,97	15,68
Cálcio	%	0,03	4,46
Fósforo Total	%	0,25	2,41
Potássio	%	0,13	0,53
Sódio	%	0,03	0,48
Lisina*	%	0,30	3,32
Metionina	%	0,18	1,11
Metionina + Cistina	%	0,29	1,76
Triptofano	%	0,10	0,48
Treonina	%	0,26	2,18
Arginina	%	0,52	3,94
Glicina + Serina	%	0,79	7,81
Isoleucina	%	0,32	2,43
Valina	%	0,38	2,80
Leucina	%	0,65	4,46
Histidina	%	0,17	1,22
Fenilalanina	%	0,37	2,55

* Aminograma executado pela Ajinomoto Biolatina

APÊNDICE 2. Efeito da retirada total ou parcial de aminoácidos sobre o consumo de ração, ganho de peso e balanço nitrogenado, segundo Milner, (1979).

Tratamento	Cons. ração g/d	Ganho de peso g/14dd	Balanço N g/7dd
Experimento 1			
Controle	234 ^b	577 ^c	7,22 ^c
50% Metionina	239 ^b	410 ^{b,c}	7,16 ^c
0% Metionina	65 ^a	-474 ^a	-1,33 ^a
50% Treonina	225 ^b	282 ^b	4,75 ^b
0% Treonina	75 ^a	-411 ^a	-0,21 ^a
Experimento 2			
Controle	313 ^c	716 ^d	6,52 ^d
50% Triptofano	236 ^b	108 ^b	1,72 ^b
0% Triptofano	119 ^a	-410 ^a	-2,78 ^a
50% Histidina	278 ^{b,c}	364 ^c	3,79 ^{b,c}
0% Histidina	125 ^a	-428 ^a	-1,37 ^a
50% Isoleucina	276 ^{b,c}	500 ^c	5,65 ^{c,d}
0% Isoleucina	102 ^a	-455 ^a	-1,97 ^a

APÊNDICE 3. Efeito da retirada total ou parcial de aminoácidos sobre os níveis de uréia plasmática e creatinina urinária, segundo Milner, (1979).

Tratamento	Uréia plasmática mg/100ml	Creatinina mg/dia
Experimento 1		
Controle	17,8 ^a	21,9 ^a
50% Metionina	26,6 ^b	16,9 ^a
0% Metionina	80,8 ^d	8,5 ^b
50% Treonina	43,2 ^c	19,4 ^a
0% Treonina	75,9 ^d	7,0 ^b
Experimento 2		
Controle	8,6 ^a	35,7 ^a
50% Triptofano	27,6 ^{b,c}	26,2 ^{b,c}
0% Triptofano	34,8 ^c	19,5 ^c
50% Histidina	19,9 ^b	36,9 ^a
0% Histidina	49,2 ^d	21,9 ^c
50% Isoleucina	8,5 ^a	31,5 ^{a,b}
0% Isoleucina	30,8 ^c	25,3 ^{b,c}

APÊNDICE 4. Experimento 2. Variáveis independentes.

Animais = (1,2,3,4, 5,6, 7,8 e 9)

Período (dia) de medição = 1,2,3,4 e 5

Tratamentos (% de proteína na dieta)= 19,24,30,36 e 41%

Delineamento em "Cross-Over"

Animal	Períodos (dias)				
	1	2	3	4	5
1	19	36	30	41	24
2	36	41	24	30	19
3	24	30	36	19	41
4	41	24	19	36	30
5	30	19	41	24	36
6	36	19	30	41	24
7	41	30	19	24	36
8	19	24	36	30	41
9	24	41	19	36	30

APÊNDICE 5. Experimento 3. Variáveis independentes.

Animais = (1,2,3,6,7,8 e 9)

Período (dia) de medição = 1,2,3 e 4

Tratamentos (relação metionina+cistina/lisina)= 0,58; 0,62;
0,66; 0,70

Delineamento em "Cross-Over"

Animal	Períodos (dias)			
	1	2	3	4
1	0,58	0,70	0,66	0,62
2	0,70	0,66	0,62	0,58
3	0,62	0,58	0,70	0,66
4	0,62	0,66	0,58	0,70
5	0,66	0,58	0,70	0,62
6	0,58	0,70	0,66	0,62
7	0,66	0,62	0,58	0,70

APÊNDICE 6. Análise da variância de uréia sérica usando hora como covariável.

CAUSAS DA VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F	P
Animal	8	1630,29	203,786	28,36	0,0000
Hora	1	210,825	210,825	29,34	0,0000
Hora ²	1	217,12	217,12	30,22	0,0000
Erro	34	244,282	7,18475		
Total	44	2091,79			

APÊNDICE 7. Análise da variância de uréia sérica usando hora como classificatória.

CAUSAS DA VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F	P
Animal	8	1630,29	203,786	26,83	0,0000
Hora	4	218,45	54,6124	7,19	0,0003
Erro	32	243,059	7,59559		
Total	44	2091,79			

APÊNDICE 8. Análise da variância de uréia sérica usando proteína como classificatória.

CAUSAS DA VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F	P
Animal	8	1029,38	128,673	13,68	0,0000
Dia	4	39,0223	9,75558	1,04	0,4057
Proteína	4	921,409	230,352	24,49	0,0000
Erro	28	263,386	9,40663		
Total	44	2553,2			

APÊNDICE 9. Análise da variância de uréia sérica usando proteína como covariável.

CAUSAS DA VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F	P
Animal	8	1029,38	128,673	14,68	0,0000
Dia	4	39,0223	9,75558	1,11	0,3680
Proteína	1	913,144	913,144	104,2	0,0000
Erro	31	271,65	8,76291		
Total	44	2553,2			

APÊNDICE 10. Análise da variância de uréia sérica usando animal e proteína como covariável.

CAUSAS DA VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F	P
Animal	8	1029,38	128,673	14,68	0,0000
Dia	4	33,8422	8,46056	0,97	0,4403
Proteína	4	913,144	913,144	104,2	0,0000
Erro	34	271,65	8,76291		
Total	44	2553,2			

APÊNDICE 11. Análise da variância de uréia sérica usando animal e proteína como classificatórias.

CAUSAS DA VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F	P
Animal	8	1029,38	128,673	13,68	0,0000
Dia	4	35,2088	8,8022	0,94	0,4576
Proteína	4	921,409	230,352	24,49	0,0000
Erro	28	263,386	9,40663		
Total	44	2553,2			

APÊNDICE 12. Análise da variância dos níveis de uréia sérica usando aminoácidos como classificatória.

CAUSAS DA VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F	P
Animal	6	992,561	165,427	201,4	0,0000
Medida	3	4,48664	1,49555	1,82	0,1867
Aminoácidos	3	72,3137	24,1046	29,34	0,0000
erro	15	12,3226	0,82151		
total	27	1084,97			

APÊNDICE 13. Análise da variância dos níveis de uréia sérica usando aminoácidos como covariável.

CAUSAS DA VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F	P
Animal	6	992,561	165,427	214,7	0,0000
Medida	3	7,77018	2,59006	3,36	0,0433
Aminoácidos	1	71,5352	71,5352	92,82	0,0000
erro	17	13,1012	0,77065		
total	27	1084,97			

APÊNDICE 14. Análise da variância dos níveis de uréia sérica usando animal, medida e aminoácidos como covariáveis.

CAUSAS DA VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F	P
Animal	6	992,561	165,427	201,3	0,0000
Medida	3	4,48664	1,49555	1,82	0,1867
Aminoácidos	3	72,3137	24,1046	29,34	0,0108
erro	15	12,3226	0,82151		
total	27	1084,97			

APÊNDICE 15. Análise da variância dos níveis de uréia sérica usando animal, medida e aminoácidos como classificatórias.

CAUSAS DA VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F	P
Animal	6	992,561	165,427	214,6	0,0000
Medida	3	4,01157	1,33719	1,74	0,1977
Aminoácidos	1	71,5352	71,5352	92,82	0,0000
erro	17	13,1012	0,77065		
total	27	1084,97			

APÊNDICE 16. Dados originais de uréia sérica nos experimentos 1, 2 e 3, conforme as variáveis utilizadas.

Experimento 1			Experimento 2				Experimento 3			
animal	hora	ureia	animal	dia	prot	ureia	animal	dia	aas	ureia
1	1	13,63	1	1	18,62	9,72	1	1	0,58	20,43
2	1	17,96	2	5	18,62	15,26	2	4	0,58	22,84
3	1	15,47	3	4	18,62	14,55	3	2	0,58	22,15
4	1	19,42	4	3	18,62	10,93	1	4	0,62	16,14
5	1	20,29	5	2	18,62	19,16	2	3	0,62	21,75
1	2	17,58	1	5	24,26	16,09	3	1	0,62	19,12
2	2	21,91	2	3	24,26	18,5	1	3	0,66	14,02
3	2	23,15	3	1	24,26	17,9	2	2	0,66	20,72
4	2	19,1	4	2	24,26	17,24	3	4	0,66	19,61
5	2	23,97	5	4	24,26	23,83	1	2	0,7	13,01
1	3	16,34	1	3	29,89	21,41	2	1	0,7	19,86
2	3	23,86	2	4	29,89	19,26	3	3	0,7	16,83
3	3	21,32	3	2	29,89	24,6	4	3	0,58	28,57
4	3	17,96	4	5	29,89	16,58	5	2	0,58	27,37
5	3	23,91	5	1	29,89	29,04	4	1	0,62	27,9
1	4	14,82	1	2	35,54	25,25	5	4	0,62	26,18
2	4	18,34	2	1	35,54	23	4	2	0,66	26,33
3	4	18,99	3	3	35,54	29,65	5	1	0,66	24,83
4	4	17,47	4	4	35,54	27,01	4	4	0,7	25,8
5	4	23,53	5	5	35,54	33	5	3	0,7	23,54
1	5	12,93	1	4	41,18	22,89	6	1	0,58	36,1
2	5	12,12	2	2	41,18	33,27	7	3	0,58	32,41
3	5	11,69	3	5	41,18	35,9	6	4	0,62	35,71
4	5	14,72	4	1	41,18	28,93	7	2	0,62	31,64
5	5	13,47	5	3	41,18	25,64	6	3	0,66	33,02
6	1	23,06	6	2	18,62	23,24	7	1	0,66	31,59
7	1	24,93	7	3	18,62	25,28	6	2	0,7	30,63
6	2	28,48	6	5	24,26	26,09	7	4	0,7	28,75
7	2	28,36	7	4	24,26	27,99				
6	3	29,29	6	3	29,89	28,54				
7	3	31,39	7	2	29,89	29,88				
6	4	27,28	6	1	35,54	28,65				
7	4	31,39	7	5	35,54	31,68				
6	5	27,2	6	4	41,18	30,69				
7	5	29,12	7	1	41,18	32,15				
8	1	26,21	8	1	18,62	28,57				
9	1	20,68	9	3	18,62	25,81				
8	2	33,48	8	2	24,26	30,77				
9	2	24,8	9	1	24,26	27,45				
8	3	37,93	8	4	29,89	33,84				
9	3	28,24	9	5	29,89	31,2				
8	4	37,54	8	3	35,54	39,68				
9	4	27,95	9	4	35,54	28,95				
8	5	36,86	8	5	41,18	40,85				
9	5	26,85	9	2	41,18	35,44				

Vita

José Eduardo Salazar Maciel, filho de Carlos Hagel Maciel e Jair Sueda Salazar Maciel, nasceu em 10 de setembro de 1965, em Guaíba, Rio Grande do Sul.

Cursou o primeiro grau no grupo escolar Uruguai, em Porto Alegre, e o segundo grau no colégio Nossa Senhora do Rosário em Porto Alegre.

Formou-se em Medicina Veterinária em agosto de 1996, pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Trabalhou em clínica de pequenos animais até o final de 2000.

Em março de 2001 ingressou no Mestrado em Nutrição Animal – Nutrição de Monogástricos, no Departamento de Zootecnia, da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.