

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

ESTIMATIVA DAS NECESSIDADES DE NITROGÊNIO E
AMINOÁCIDOS SULFURADOS PARA GATOS EM
CRESCIMENTO

Autora: Joyce Sato
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Souza Vasconcellos
Co-orientador: Prof. Dr. Claudio Scapinello

MARINGÁ
Estado do Paraná
Fevereiro – 2017

ESTIMATIVA DAS NECESSIDADES DE NITROGÊNIO E DE
AMINOÁCIDOS SULFURADOS PARA GATOS EM
CRESCIMENTO

Autora: Joyce Sato
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Souza Vasconcellos
Co-orientador: Claudio Scapinello

“Tese apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá - Área de concentração Produção Animal.”

MARINGÁ
Estado do Paraná
Fevereiro – 2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

S253e Sato, Joyce
Estimativa das necessidades de nitrogênio e aminoácidos sulfurados para gatos em crescimento / Joyce Sato. - - Maringá, 2017.
74 f. : il., tabs., figs.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Souza Vasconcellos.
Co-orientador: Prof. Dr. Claudio Scapinello.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, 2017.

1. Metionina - Cistina. 2. Felinos - nutrição. 3. Felinos - Proteína e metionina + cistina. 4. Felinos - Balanço de nitrogênio. 5. Metionina - Exigência nutricional. I. Vasconcellos Ricardo Souza, orient. II. Scapinello, Claudio, co-orient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Departamento de Zootecnia. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. IV. Título.

CDD 21. ed 636.8

MGC-001865



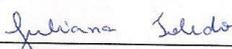
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

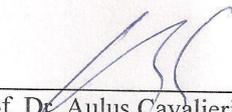
**ESTIMATIVAS DAS NECESSIDADES DE
NITROGÊNIO E AMINOÁCIDOS SULFURADOS
PARA GATOS EM CRESCIMENTO**

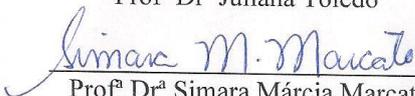
Autora: Joyce Sato
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Souza Vasconcellos

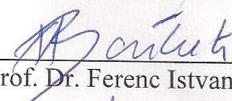
TITULAÇÃO: Doutora em Zootecnia - Área de Concentração Produção
Animal

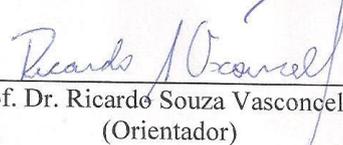
APROVADA em 24 de fevereiro de 2017.


Prof.ª Dr.ª Juliana Toledo


Prof. Dr. Aulus Cavaliere Carciofi


Prof.ª Dr.ª Simara Márcia Marcato


Prof. Dr. Ferenc Istvan Bánkuti


Prof. Dr. Ricardo Souza Vasconcellos
(Orientador)

*“O menor dos felinos é uma obra de arte”
(Leonardo da Vinci)*

À Kenti Cristina, minha gata com quem convivi por quinze anos
À minha família (Jorge, Shirley, Francielle e Medina)
Ao Fernando Enz, meu namorado

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade de trabalhar com nutrição de animais de companhia.

À minha família: Jorge, Shirley, Francielle e Medina e ao meu namorado, Fernando, pelo apoio e paciência, e espero que Deus os abençoe por tudo que fizeram por mim.

Ao meu orientador, Ricardo Souza Vasconcellos, pela humildade, paciência e exemplo de ética, professor que é um exemplo de pessoa e profissional.

Aos professores da banca de qualificação: Simara Marcato, Diogo Rossoni, Antônio Medina Neto e Paulo Pozza. Aos membros da banca de defesa: Aulus C. Carciofi, Simara Marcato, Ferenc I. Bankuti, Juliana Toledo e Ricardo Souza Vasconcellos obrigada por aceitarem o convite e contribuírem para as correções.

À equipe do CEENUFEL pelos momentos de trabalho e companheirismo, em especial: Mônica Merenda, companheira de experimento e que é uma pessoa “tudo de bom”; Aline Uemoto, minha filha adotiva; Mateus Pereira, Zé Barro, sempre prestativo e animado; Layne, a querida agregada; Tânia Miltenburg, a mãe da Sisi, nossa princess.

Às antigas orientadas: Bruna Ponciano, amiga mineira; Karla Felssner, lorão e agora a mais nova baiana; Marianne; Suellen e Marina. Aos novos membros: Pamela, Jeice, Julia, Joyce, Fernanda, Leonir, Priscila e Mayara.

Aos colegas da UNESP-Jaboticabal do Labnutri, Thaila, Bruna, Peterson, Fernanda Mendonça e Katy, obrigada por auxiliarem na elaboração das rações experimentais.

Aos amigos de Jaboticabal: Ana Carolina, Allan, Dako, Dani, Edney, Giuliana Milan, Hilda, Íris, Jaqueline Gobi, Juliano Dorigan, Katy, Leticia (Pombi), Mel, Miryelli, Rafael Suzuki (Kuki-filhão) e Robson.

Às amigas da graduação: Livian, Ana, Claudia, Celma e Satilla; as amigas de longa data: Aline, Fernanda e Paula; as amigas do doutorado: Laura e Kellen.

Aos professores do departamento de Zootecnia-UEM, em especial: Simara, Sheila Tavares, Juliana Toledo, Carlos, Paulo Pozza, Ferenc, Claudio Scapinello e Antônio Claudio Furlan. Aos funcionários da FEI: Sr. Luis, Cido, Toninho e Wilson que ajudaram no desenvolvimento do gatil e do experimento.

À Itami sensei, pelas divertidas aulas de nihongo e à Karline, querida professora de inglês.

Ao meu grupo de corrida, que proporcionaram momentos de descontração.

Ao Colégio Brasileiro de Nutrição Animal (CBNA) e à Waltham que proporcionaram a minha ida e apresentação de parte da minha tese em um evento internacional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela bolsa concedida durante o doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do projeto de pesquisa.

À Universidade Estadual de Maringá, por possibilitar a execução deste trabalho.

Às empresas que doaram ingredientes às rações experimentais: Manfrim, Cargill, Ajinomoto e Auster.

Aos meus animais: Kenti, Lilo, Zuka, Cido e Nina e às minhas crianças do gatil, que foram a maior motivação para o desenvolvimento deste trabalho.

BIOGRAFIA

JOYCE SATO, filha de Jorge Osamo Sato e Shirley Sato, nasceu na cidade de Maringá, Paraná, no dia 22 de abril de 1986. Em março de 2006, iniciou o curso de Zootecnia pela Universidade Estadual de Maringá – Paraná, concluindo-o em dezembro de 2010.

Em março de 2011, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, em nível de Mestrado, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual de Paulista-Campus de Jaboticabal, realizando estudos na área de exigências nutricionais de aves, onde foi bolsista pela FAPESP, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Nilva Kazue Sakomura.

Em março de 2013, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, da Universidade Estadual de Maringá, em nível de Doutorado, sob orientação do Prof. Dr. Ricardo Souza Vasconcellos, na área de Produção Animal, realizando estudos na área de exigências nutricionais para cães e gatos. Em junho de 2016, submeteu-se ao Exame Geral de de Qualificação e, em fevereiro de 2017, submeteu-se à defesa de Tese de Doutorado.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xii
RESUMO	vii
ABSTRACT	xvi
I – INTRODUÇÃO GERAL	1
1. Revisão bibliográfica	3
1.1. Proteína e sua função no organismo animal	3
1.1.1. Necessidades de proteína para gatos	3
1.1.2. Necessidades de aminoácidos sulfurados para gatos	6
1.1.2.1 Metionina	6
1.1.2.2. Metabolismo da metionina	8
1.1.2.3. Cisteína/ Cistina	8
1.1.2.4. Cistina e suas funções	9
1.1.2.5. Glutathione	9
1.1.2.6. Mecanismo de ação da glutathione	10
1.2. Qualidade da pelagem	11
1.2.1. Definição e anatomia de pelo	11
1.2.2. Composição do pelo	13
1.2.3. Folículo do pelo	13
1.2.4. Ciclo de Crescimento do pelo	14
1.3. Métodos para estimar exigências de proteína e aminoácidos	15

1.3.1. Método de Göttingen.....	17
LITERATURA CITADA.....	18
II- OBJETIVOS GERAIS.....	24
III- Estimativa das necessidades de nitrogênio e aminoácidos sulfurados para gatos em crescimento pelo método de Göttingen	25
ABSTRACT.....	26
INTRODUÇÃO	27
MATERIAL E MÉTODOS	27
RESULTADOS.....	35
DISCUSSÃO.....	39
LITERATURA CITADA.....	46
IV- Distribuição calórica da dieta e níveis de ingestão alimentar afetam o crescimento e indicadores da qualidade de pelagem em gatos em crescimento.....	48
ABSTRACT.....	49
INTRODUÇÃO	50
MATERIAL E MÉTODOS	50
RESULTADOS.....	61
DISCUSSÃO.....	67
LITERATURA CITADA.....	72

LISTA DE TABELAS

	Página
I. Introdução geral.....	1
Tabela 1. Comparação do tamanho relativo do cérebro, taxa metabólica cerebral (TMC) e estimativa da demanda de glicose cerebral absoluta (DGC) em gatos e outros mamíferos	5
III- Estimativa das necessidades de nitrogênio e aminoácidos sulfurados para gatos em crescimento pelo método de Göttingen	25
Tabela 1. Composição das dietas experimentais ¹	30
Tabela 2. Aminoácidos totais analisados (%) dos principais ingredientes das dietas	31
Tabela 3. Composição dos aminoácidos totais (aa) previstos e analisados na matéria seca (MS) e a relação aminoácido:lisina (aa:lis) para a dieta N5	31
Tabela 4. Dados sumarizados utilizados para determinação dos parâmetros do modelo dos gatos aos 150, 195 e 240 dias de idade	36
Tabela 5. Estimativa de nitrogênio para manutenção (NMR), máximo teórico de deposição de nitrogênio diário (ND_{maxT}) máximo teórico de retenção de nitrogênio diário (NR_{maxT}) de acordo com a idade, conforme calculado pelos modelos.....	37
Tabela 6. Cálculo das necessidades de metionina+cistina (M+C), dependendo da deposição de proteína (DP) e eficiência de utilização de M+C, b (10^{-6}) valor para qualidade da proteína para gatos em crescimento aos 150, 195 e 240 dias de idade	39
IV- Distribuição calórica da dieta e níveis de ingestão alimentar afetam o crescimento e indicadores da qualidade de pelagem em gatos em crescimento	48

Tabela 1. Composição das dietas experimentais ¹	52
Tabela 2. Atribuições das principais bandas Raman presentes em pelos	56
Tabela 3. Atribuições das principais bandas FTIR presentes em pelos.....	58
Tabela 4. Carga fatorial para definição dos componentes	62
Tabela 5. Média e intervalo de confiança (IC) para cada <i>cluster</i> de baixa, moderada e alta ingestão de energia metabolizável (IEM) (g/PV _{kg} ^{0,67}), proteína bruta (IPB) (g/PV _{kg} ^{0,67}) e aminoácidos sulfurados (IMC) (g/PV _{kg} ^{0,67}) dos gatos aos 240 dias de idade	63
Tabela 6. Balanço de nitrogênio (BN), indicadores de crescimento e bioquímica sérica de gatos em crescimento de acordo com os <i>clusters</i> de baixa, média e alta ingestão de nutrientes e energia metabolizável.....	65
Tabela 7. Comparação de médias das variáveis de indicadores de pelagem de acordo com as ingestões de baixa, moderada e alta PB, M+C e EM	65
Tabela 8. Médias padronizadas e erro padrão da média (EPM) dos <i>clusters</i> baixa, moderada e alta ingestão de PB, M+C e EM com os componentes	66

LISTA DE FIGURAS

	Página
I. Introdução geral.....	1
Figura 1. Esquema representando a fibra capilar e as subunidade componentes da cutícula e córtex (Fonte: Zahn, 2002).....	12
III- Estimativa das necessidades de nitrogênio e aminoácidos sulfurados para gatos em crescimento pelo método de Göttingen	25
Figura 1. Estimativa das exigências de nitrogênio para manutenção (NMR) ajustado a partir uma função exponencial entre ingestão nitrogênio (NI) e excreção de nitrogênio (NEX) para gatos em crescimento em diferentes idades 150, 195 e 240 dias.....	37
Figura 2. Estimativa do máximo potencial teórico de deposição de nitrogênio ajustado a partir uma função exponencial entre ingestão de nitrogênio e nitrogênio depositado, para gatos em crescimento em diferentes de idades, 150, 195 e 240 dias	38
IV- Distribuição calórica da dieta e níveis de ingestão alimentar afetam o crescimento e indicadores da qualidade de pelagem em gatos em crescimento	48
Figura 1. (A) Espectro Raman, normalizados em 2927 cm^{-1} (pico nº 1), de pelos de gatos em crescimento. (B) Banda da Raman referente ao estiramento ν (S-S) e a área calculada	56
Figura 2. Espectro de FTIR-ATR, normalizado em 1740 cm^{-1} (ν (C-O)), de pelos de gatos. As posições das áreas calculadas, sob a banda, estão indicadas, na região rachurada.....	57

Figura 3. Distribuição das calorias provenientes de proteína (PB), lipídeos (EE) e carboidratos (ENN) nas dietas dos animais pertencentes aos *clusters* de baixa, moderada e alta ingestão..... 64

Figura 4. Representação gráfica dos componentes principais (F1 – indicadores de crescimento; F2 – indicadores de saúde; F3 – indicadores de ingestão de compostos nitrogenados; F4 – indicadores de qualidade de pelos), nos quadrantes I, II, III e IV em associação e distribuição dos *clusters*..... 67

RESUMO

Embora existam muitos alimentos comerciais para gatos, ainda pouco é conhecido sobre as exigências de proteína e aminoácidos para esta espécie, considerada estritamente carnívora com alta exigência de proteína. O método de Göttingen é considerado de fácil execução, utilizando apenas variáveis do balanço de nitrogênio. Através dele, é possível estimar a necessidade de manutenção de nitrogênio e do aminoácido limitante na dieta. Tendo isto em vista, neste trabalho objetivou-se em um primeiro momento estimar as necessidades de nitrogênio e de aminoácidos sulfurados (metionina+cistina) pelo método de Göttingen, e depois associar aos parâmetros de saúde como indicadores do status oxidativo, qualidade de pelagem e indicadores de crescimento para gatos em crescimento, dos 150-240 dias de idade. Trinta e seis gatos foram empregados no estudo e o período experimental foi de 90 dias (150-240 dias de idade). Os animais foram distribuídos em seis tratamentos, de acordo com peso e ninhada, sendo cada tratamento composto por seis repetições. As estimativas de nitrogênio para manutenção foram de 591, 517 e 457 $\text{mg/PV}_{\text{kg}}^{0,67}/\text{d}$, de acordo com cada idade 150, 195 e 240 dias respectivamente. Para a metionina+cistina, estimou-se uma necessidade de 581; 510 e 318 $\text{mg/PV}_{\text{kg}}^{0,67}/\text{dia}$ para os animais no mesmo período. No segundo momento, buscou-se relacionar parâmetros de saúde e a ingestão dos nutrientes (proteína bruta e metionina+cistina) e energia metabolizável, na qual foram aplicados métodos estatísticos multivariados. Os animais foram divididos em *clusters* de baixa, moderada e alta ingestão proteica, energética e de metionina+cistina. Os parâmetros de saúde utilizados relacionado aos aminoácidos sulfurados e a proteína foram: resistência dos pelos, crescimento dos pelos, determinação das pontes de enxofre e da amida dos pelos por espectroscopia Raman e FTIR (indicadores de qualidade de pelagem); determinação da glutatona reduzida, oxidada e a relação entre ambas, composição corporal e

parâmetros bioquímicos sanguíneos. Foi realizada análise fatorial exploratória, para definição de fatores que foram: indicadores de crescimento, indicadores de saúde, indicadores de ingestão de nitrogênio e indicadores de resistência dos pelos. Os indicadores de crescimento foram significativos ($P < 0,05$) na comparação entre os *clusters* de baixa e moderada ingestão, sendo os menores resultados obtidos no *cluster* de baixa e os maiores no *cluster* de moderada ingestão. Os indicadores de ingestão de nitrogênio tiveram efeito significativo ($P < 0,05$) na comparação entre os *clusters* de baixa, moderada e alta ingestão, sendo reflexo direto da ingestão de PB crescente dos *clusters*. Dietas que contenham teores de PB acima de 85 g/1000 kcal de EM, relação E:P abaixo de 12,4 kcal/g e teores de M+C acima de 2,8 g/1000 kcal parecem favorecer as condições de saúde de gatos dos 150-240 dias de idade. A ingestão energética abaixo de $153,22 \text{ kcal/PV}_{\text{kg}}^{0,67}/\text{d}$ parece prejudicar o desempenho dos gatos nesta fase de crescimento.

Palavras-chave: metionina+cistina, felinos, exigência, multivariada

ABSTRACT

Although there are many commercial cat foods, little is known about the protein and amino acid requirements for this species, which is considered strictly carnivorous with a high protein requirement. The Göttingen method is considered easy to perform, using only nitrogen balance variables. Through it is possible to estimate the need for nitrogen and limiting amino acid maintenance in the diet. With this in mind, this study aimed to at a first estimate the needs of nitrogen and sulfur amino acids (methionine and cystine) at Göttingen method , and then associate with health parameters as indicators of oxidative status, coat quality, and growth indicators for growing cats from 150-240 days of age. Thirty-six cats were employed in the study and the experimental period was 90 days (150-240 days of age). The animals were distributed in six treatments, according to weight and brood, each treatment consisting of six replicates. Nitrogen estimates for maintenance were 591, 517 and 457 mg / PV kg^{0.67} / d, according to each age 150, 195 and 240 days respectively. For methionine + cystine, a need was estimated for 581; 510 and 318 mg / PV kg^{0.67} / day for the animals in the same period. In the second moment, we sought to relate health parameters and nutrient intake (crude protein and methionine + cystine) and metabolizable energy, in which multivariate statistical methods were applied. The animals were divided into clusters of low, moderate and high protein, energetic and methionine + cystine intakes. The health parameters related to sulfur amino acids and protein were: hair resistance, hair growth, determination of the sulfur and hair amide bridges by Raman spectroscopy and FTIR (hair quality indicators); determination of reduced, oxidized glutathione and the relationship between both, Body composition and Biochemical parameters. An exploratory factorial analysis was performed to define factors that were: growth indicators, health indicators,

indicators of nitrogen intake and indicators of hair resistance. The growth indicators were significant ($P < 0.05$) in the comparison between low and moderate ingestion clusters, with the lowest results being obtained in the low cluster and the highest in the cluster of moderate ingestion. The nitrogen intake indicators had a significant effect ($P < 0.05$) on the comparison between the low, moderate and high ingestion clusters, being a direct reflection of the increasing CP intake of the clusters. Diets containing CP levels above 85 g / 1000 kcal MS, E:P ratio below 12.4 kcal / g and M + C contents above 2.8 g / 1000 kcal appear to favor the health conditions of cats of 150-240 days of age. Energy intake below 153.22 kcal / PV kg^{0.67} / d appears to impair the performance of cats at this stage of growth.

Keywords: methionine plus cysteine, felines, requirements, multivariate

I – INTRODUÇÃO GERAL

Uma adequada e equilibrada dieta para cães e gatos é fundamental para o crescimento e saúde do animal. Para isso, deve atender às necessidades nutricionais do animal e fornecer nutrientes que possam otimizar as condições de saúde. O correto atendimento das exigências é alvo de muitos estudos, pois existe uma grande dificuldade na escolha dos métodos experimentais.

Muitas metodologias empregadas em animais de produção (Sakomura e Rostagno, 2007) são invasivas e necessitam de um grande número de animais, como por exemplo, o abate comparativo. Existem metodologias aperfeiçoadas com modelagem matemática, como o método de Göttingen, que utiliza variáveis do balanço de nitrogênio, para estimar necessidades de nitrogênio de manutenção e do aminoácido limitante na dieta. Este método é bastante utilizado para animais de produção; uma vez que esta técnica se apresenta efetiva para monogástricos o estudo em gatos pode ser considerado apropriado.

Grande parte dos trabalhos encontrados sobre determinação das exigências nutricionais, especialmente com proteína para cães e gatos, foi realizada há mais de 30 anos atrás (Allison e Anderson, 1945; Arnold e Schad, 1954; Blaza et al., 1982; Miller e Allison, 1958), havendo uma lacuna no aprofundamento destes estudos nos anos posteriores. Duas possíveis explicações para isto residem no fato de que os cães foram modelos experimentais para humanos neste período, sendo substituídos posteriormente por roedores e suínos e, além disto, como dito acima, muitos métodos de determinação das exigências nutricionais são invasivos, tornando-se incompatíveis com as condições de bem-estar de animais de companhia. Para gatos, estas informações são ainda mais escassas.

Os gatos são considerados animais carnívoros estritos e com alta exigência de proteínas (MacDonald et al., 1984). Na natureza, sua dieta era baseada em pequenos roedores e pássaros. Estas presas contém pouco carboidrato, assim, os gatos foram metabolicamente adaptados para preferencialmente usarem proteína e gordura como fonte de energia (Green et al., 2008; Morris, 2002).

Dentre os aminoácidos presentes na proteína, a metionina é considerada um aminoácido essencial, por não ser produzida nas quantidades que o organismo necessita (Smalley et al., 1983). As principais funções da metionina são: participação na formação das proteínas corporais; formação da pele e pelagem; participação em funções metabólicas como doador do grupo metil, sendo precursor para formação de outros aminoácidos como a cisteína por transsulfuração (Smalley et al., 1983).

As dietas comerciais de animais de companhia são normalmente formuladas contendo subprodutos e co-produtos de origem animal e vegetal. A maior parte destes ingredientes é relativamente deficiente em metionina em relação às exigências dos animais, havendo a necessidade de suplementação. Este fato juntamente com as elevadas necessidades de aminoácidos essenciais dos gatos, ressalta a metionina como um elemento importante na formulação de alimentos nutricionalmente equilibrados, sendo considerado nesta espécie o primeiro aminoácido limitante (Case, 2011; NRC, 2006).

Formulações de rações mais precisas são importantes não somente para o animal, mas também do ponto de vista econômico, pois fornecerão os nutrientes necessários de forma equilibrada, sem excessos ou deficiências nutricionais. Atualmente, devido à natureza carnívora dos gatos, tem-se formulado alimentos comerciais com proteína bruta (PB) geralmente acima de 80 g PB/1000 kcal de Energia Metabolizável do alimento. No entanto, o equilíbrio dos aminoácidos é tão importante quanto o teor de PB da dieta, além da relação da proteína com a energia metabolizável. Ainda existem poucos subsídios científicos para dar suporte aos formuladores sobre balanceamento preciso de aminoácidos e relação E:P em alimentos para cães e gatos.

Em algumas situações, o excesso de oferta de aminoácidos pode ser prejudicial à saúde dos animais, como no caso de animais insuficientes renais (Morris, 2010). O conhecimento mais aprofundado sobre as necessidades nutricionais pode favorecer a elaboração de alimentos de melhor qualidade.

Por este motivo, propõe-se estimar as necessidades de nitrogênio e de aminoácidos sulfurados para gatos em crescimento, empregando-se o método de Göttingen proposto por Samadi e Liebert (2006), e associar a avaliação de parâmetros nutricionais e de saúde dos animais com a ingestão de proteína, M+C e energia metabolizável.

1. Revisão bibliográfica

1.1. Proteína e sua função no organismo animal

As proteínas são compostos orgânicos constituídos principalmente por nitrogênio, carbono, hidrogênio e oxigênio, mas também, podendo conter outros átomos como, o fósforo, enxofre e ferro (Nelson e Cox, 2014). São formadas por unidades denominadas aminoácidos, os quais apresentam um carbono alfa assimétrico, que se liga a um grupo amina (NH_3), a um grupo carboxílico (COOH), a um hidrogênio e uma cadeia lateral, com exceção da prolina (Marzzoco e Torres, 2007).

As proteínas apresentam diversas funções no organismo animal, como função estrutural, representada pelas proteínas fibrosas, como colágeno, elastina e queratina; são constituintes de enzimas, moléculas que catalisam as reações metabólicas essenciais ao organismo (Case, 2011); alguns hormônios com a insulina e o glucagon, que influenciam diretamente no controle glicêmico; as proteínas presentes no sangue, bem como na membrana plasmática das células transportando moléculas (Nelson e Cox, 2014). Além disso, as proteínas são constituintes dos anticorpos, apresentando importante função do sistema imunológico (Nelson e Cox, 2014; NRC, 2006).

A ingestão de proteína deve ser suficiente para atender à demanda de aminoácidos essenciais em proporções adequadas, além da quantidade para fornecer aminoácidos não-essenciais e compostos nitrogenados (Smalley et al., 1985) como os ácidos nucleicos, purinas, pirimidinas e neurotransmissores.

1.1.1. Necessidades de proteína para gatos

Os gatos domésticos são considerados animais carnívoros estritos ou hipercarnívoros, pertencentes à família *Felidae*. Nesta mesma ordem, existem outras famílias que são em sua maioria onívoros, como é o caso do panda (Hendriks, 1996; Zoran, 2002). Os felinos possuem maior necessidade de proteína quando comparados

aos mamíferos onívoros (MacDonald et al., 1984; Miller e Allison, 1958; NRC, 2006; Piechota et al., 1995).

Os cães, também pertencem à ordem Carnivora, porém possuem necessidade de proteína menor, em relação ao gato. Os cães tiveram mutação e a seleção de genes para digestão de amido a partir dos ancestrais lobos foi um passo importante para a domesticação precoce dos mesmos (Axelsson et al., 2013). Já os gatos tiveram uma domesticação mais tardia, 9000 a 10000 anos atrás, além de terem uma digestão de carboidratos limitada. A capacidade de um gato para digerir rapidamente e absorver açúcares e carboidratos é reduzida devido à falta de adaptação das enzimas que metabolizam glicose (Eisert, 2011; Kirk, 2013).

A maior necessidade de proteína dos gatos pode ser explicada por alguns fatores do metabolismo particular dessa espécie como: a alta exigência de nitrogênio para manutenção e também por não conseguirem ter grandes reservas de nitrogênio em quantidades, como é o caso de gorduras e carboidratos (Baker e Czarnecki-Maulden, 1991a; Rogers et al., 1977); as enzimas catabólicas hepáticas dos gatos possuem alta atividade e limitada habilidade para ajustar a oxidação, quando ingerem dietas com baixa proteína (Morris, 2002; Eisert, 2011).

Apesar de terem limitada habilidade para ajustar a oxidação quando é oferecida uma dieta com baixo teor proteico, os gatos conseguem se adaptar à oxidação de proteína, desde que o mínimo de exigência proteica seja atendida (Green et al., 2008). Essa flexibilidade metabólica em gatos provavelmente representa uma adaptação evolutiva, já que a alimentação no passado fornecia abundante proteína, através das presas (pequenos pássaros e roedores). A atividade de moderada à alta das enzimas do ciclo da ureia, oferece uma garantia contra toxicidade da amônia, após uma ingestão rica em proteínas (Green et al., 2008).

Um estudo comparativo da proporção do cérebro em relação ao corpo e de sua demanda de glicose metabólica em diferentes espécies foi desenvolvido por (Eisert, 2011). Neste estudo, levantou-se a hipótese, de que a via da gliconeogênese seria a grande causa para a maior exigência de proteína em gatos. Essa via metabólica atenderia principalmente uma maior atividade metabólica cerebral, como mostrado na Tabela 1.

Os gatos têm cérebro relativamente grande comparado ao seu tamanho corporal e este órgão consome como nutriente, principalmente a glicose. Existe uma deficiência enzimática nos felinos, que dificulta a digestão de carboidratos, para fornecer glicose

(via glicólise), porém quando cozido. Desta forma, esses animais utilizam os aminoácidos dietéticos (via gliconeogênese) para atender essa demanda de glicose cerebral, além da utilização imediata de esqueleto de carbono proveniente dos aminoácidos para produzir energia através da oxidação direta (Green et al., 2008).

Tabela 1. Comparação do tamanho relativo do cérebro, taxa metabólica cerebral (TMC) e estimativa da demanda de glicose cerebral absoluta (DGC) em gatos e outros mamíferos

Espécie	Massa corporal (kg)	Massa cerebral (g)	Cérebro (%MC)**	DGC (g/d)*	(TMC) (g/PC ^{0,75} /d)
Valores publicados					
Rato ¹	0,20 ^a	1,75 ^b	0,85	0,29	0,96
Gato ²	3,41 ^c	30,20 ^c	0,89	3,10	1,20
Cão ³	19,90 ^d	85,20 ^d	0,43	7,50	0,80
Humano ⁴	70,00 ^e	1,40 ^e	2,00	94 (110)	3,9 (4,5)
Valores previstos A: Animais de tamanho semelhante ao gato de diferentes ordens					
Coelho ⁵	3,68 ^f	10,6 ^f	0,29	1,30	0,49
Tatu ⁶	3,40 ^f	7,50 ^f	0,22	0,97	0,39
Macaco prego ⁷	3,10 ^f	72,2 ^f	2,30	7,10	3,00
Valores previstos B: Animais carnívoros					
Vison ⁸	1,56 ^g	9,35 ^g	0,62	1,20	0,84
Tigre ⁹	159 ^h	279 ^h	0,18	22	0,50

Valores publicados foram limitados ao cérebro inteiro DGC de adultos. Valores previstos de DGC foram calculados usando relação alométrica. Espécies domésticas são indicadas por “dom”.

* DGC calculado a partir do cérebro e massa cerebral, valores para líquido e total de DGC

**Massa corpórea, %

^a Hawkins et al. (1974), ^b Even et al. (2001), ^c Rohrs e Ebinger (1999), ^d Bronson (1979), ^e Sokoloff et al. (1977), ^f Crile e Quiring (1940), ^g Kruska (1993), ^h Gittleman (1986)

¹*Rattus norvegicus dom.*; ²*Felis silvestris dom.*; ³*Canis lupus dom.*; ⁴*Homo sapiens*; ⁵*Oryctolagus cuniculus dom.*; ⁶*Dasyurus novemcinctus*; ⁷*Cebus capuchin*; ⁸*Mustela vison dom*; ⁹*Panthera tigris*

(Adaptado de Eisert, 2011)

Outro combustível usado pelo cérebro e outros órgãos, como os nervos periféricos, são os corpos cetônicos. A cetogênese ocorre em algumas condições como: baixa relação insulina: glucagon; altas taxas de lipólise e oxidação de ácidos graxos; reduzida disponibilidade de glicose celular. Normalmente, ocorre em casos em jejum e dietas deficientes em carboidrato. Porém, o gato não produz corpos cetônicos quando alimentado com uma dieta com pouco carboidrato, como ocorre com animais onívoros. A condição de cetogênese para o gato acontece em estado de jejum (Blanchard et al., 2002; Laffel, 1999) e em caso de diabetes (Kirk, 2013; Kirk, 2006)

A falta de acumulação de corpos cetônicos, em gatos alimentados com dietas de pouco carboidrato, seria a priorização da via da gliconeogênese, ao invés da cetogênese. Provavelmente, devido ao tipo de alimentação no passado ser a base de presas, esta rota metabólica foi suficiente para suprimir a cetogênese no estado alimentado. A redução da gliconeogênese e a substituição parcial de glicose por corpos cetônicos, seria para poupar a proteína durante o jejum prolongado, que pode ser comprovado pela redução da perda de nitrogênio diário (Eisert, 2011).

No estudo desenvolvido por Eisert (2011) afirma que gatos provavelmente evoluíram em condições de mudanças sazonais na quantidade e composição de presas, para manter a capacidade de utilizar hipercetonemia como uma resposta adaptativa durante a inanição total.

1.1.2. Necessidades de aminoácidos sulfurados para gatos

1.1.2.1 Metionina

A metionina é um aminoácido considerado essencial para muitas espécies, por não ser produzido endogenamente na velocidade e quantidade necessária, por esse motivo os gatos, assim como outros animais devem receber a metionina via alimentação (Smalley et al., 1983). A metionina é importante por algumas funções como: síntese proteica (é o primeiro aminoácido a ser adicionado na cadeia polipeptídica); é o principal doador do grupo metil; participa da estrutura das proteínas (queratina, colágeno); na formação da creatina (reserva de energia nas células musculares); na síntese da epinefrina (hormônio produzido em situações de estresse); participa da síntese da carnitina (importante na β -oxidação de ácidos graxos), participa da síntese das poliaminas, participa da síntese de cistationina e cisteína/cistina em um processo irreversível (intermediários do ciclo da metionina), a metionina e cistina na dieta influenciam o equilíbrio ácido-básico (Baker e Czarnecki-Maulden, 1991), fornece homocisteína no metabolismo do folato (atua na produção e manutenção das células) (Finkelstein, 1990; Nelson et al., 2008).

A metionina é importante no crescimento de pelos, como mostra trabalho de (Rasmussen e Børsting, 2000), que avalia o crescimento dos pelos em furão (carnívoro) e a ingestão de uma dieta com proteína de alta qualidade. Verificou-se que a metionina é necessária para uma produção de fibras saudáveis, sendo considerado o primeiro aminoácido limitante para o crescimento dos pelos.

Em gatos em crescimento, a deficiência de metionina pode ocasionar retardo no crescimento além de dermatite crostosa. Isso ocorre quando há baixa quantidade de metionina na dieta, podendo ser agravado quando há excesso de cistina. Portanto é necessário que haja equilíbrio entre os dois aminoácidos (Kirk et al., 2000).

A metionina pode ter efeito sobre o pH urinário, de acordo com as pesquisas de (Jeremias et al., 2013; Markwell et al., 1998), relatando que os níveis de metionina e cisteína tem ação acidificante, prevenindo o aparecimento de estruvita e consequentemente a urolitíase em gatos.

As formas D- e L- metionina foram testadas por Smalley et al., (1993), que avaliaram o ganho de peso e retenção de nitrogênio. A forma L-metionina foi mais eficaz para síntese de proteína em gatos recém-desmamados.

A metionina quando suplementada em excesso é considerada o aminoácido mais tóxico para os animais, podendo ocasionar hipermetioninemia e hiperhomocisteinemia. A hipermetioninemia pode causar edema cerebral em humanos; e a hiperhomocisteína tem demonstrado estar associada a um risco de acidente vascular cerebral neonatal em humanos (Huang et al., 2012).

Estudo realizado em ratos com restrição de metionina na dieta avaliou a longevidade e os níveis de GSH (glutathiona reduzida). Foram administradas duas dietas, uma com restrição de metionina (0,17%) e a controle (0,86%), que resultou em aumento de 44% na longevidade e aumento de GSH sanguínea. A dieta com menor conteúdo de metionina obteve 191 semanas de vida, enquanto o grupo com 0,86% de metionina (controle) alcançou 133 semanas de vida. Foi observada diminuição nos níveis de cisteína plasmáticos no grupo com restrição de metionina, além de uma inibição no crescimento. Os autores concluíram que pode ter ocorrido uma adaptação no metabolismo de aminoácidos sulfurados, como resultado da restrição crônica de metionina, levando ao aumento dos níveis de GSH e conservação deste nos tecidos (Richie et al., 1994).

Os aminoácidos sulfurados são bastante exigidos para os gatos quando comparados a outras espécies animais, provavelmente por produzirem alguns metabólitos específicos, como a felinina, um composto sulfurado encontrado principalmente na urina de gatos machos, com função de demarcação territorial (Hendriks et al., 1995; NRC, 2006; Zoran, 2002).

Alguns ingredientes proteicos de origem vegetal podem causar deficiência nutricional de aminoácidos sulfurados, por não apresentarem grandes quantidades dos

mesmos. Uma dieta com proteína de origem vegetal em maiores proporções deve ser suplementada com DL-metionina (Zoran, 2002). Considerando apenas a exigência de metionina na ausência de cistina para gatos em crescimento, foi verificada uma necessidade de 0,75% (Schaeffer et al., 1982).

1.1.2.2. Metabolismo da metionina

O metabolismo da metionina é iniciado com uma reação catalisada pela enzima metionina adenosiltransferase, na qual ocorre a transferência de uma unidade adenosil de ATP para o átomo de enxofre da metionina, que irá formar um composto de alta energia a S-adenosil-L-metionina (SAM), precursor para formação das poliaminas (Finkelstein, 1990; Stipanuk, 1986).

A S-adenosil-L-metionina é o principal doador de grupamento metil para as reações de metilação. A ligação entre o enxofre e o carbono 5 da adenosina é rapidamente hidrolisada, deixando a adenosina e homocisteína livre. Durante a doação do grupo metil da SAM forma-se S-adenosil-homocisteína (SAH). A homocisteína pode ser metabolizada através de duas vias: remetilada (em caso de deficiência de metionina) com a presença da vitamina B12 ou quando há excesso de metionina, a homocisteína combina com a serina (por transulfuração) formando a cistationina. A cistationina é posteriormente hidrolisada, formando a cisteína (Baker e Czarnecki-Maulden, 1991; Huang et al., 2012; Nelson et al., 2008). O produto intermediário no metabolismo da metionina, a homocisteína, é um produto central nesta via metabólica e tem sido identificada como um fator de risco para doenças cardiovasculares, doença de Alzheimer em humanos adultos; acidente vascular cerebral isquêmico e hemorrágico em recém-nascidos, crianças e adultos (Ball et al., 2006). Apesar disso, não existe relação entre a hiperhomocisteinemia e doenças em gatos.

1.1.2.3. Cisteína/ Cistina

A cisteína/cistina é considerada um aminoácido semi essencial, sendo obtido pelo metabolismo da metionina (Brosnan e Brosnan, 2006; Smalley et al., 1983). A denominação cisteína e cistina é muitas vezes confundida, sendo geralmente encontrada cistina, pois a cisteína é rapidamente oxidada em cistina. Em alimentos,

tecidos proteicos e sangue, a forma principal existente é a cistina, já no interior das células a cisteína prevalece (Yin et al., 2015).

1.1.2.4. Cistina e suas funções

A cistina possui diversas funções, principalmente em processos biológicos e metabólicos dos seres vivos, como exemplo a manutenção da homeostasia celular (Ball et al., 2006; Brosnan e Brosnan, 2006), além de ser um componente estrutural e funcional para estabilizar proteínas extracelulares (Grunwell et al., 2015; Ohtsu et al., 2010).

A formação da cistina se dá pela via da transsulfuração, o átomo de enxofre proveniente da metionina é transferido para a cistina; e o esqueleto de carbono da cistina é doado para serina. A cistina não é um precursor de metionina, devido à irreversibilidade da reação da enzima cistationase sintase (Ball et al., 2006).

A cistina pode ser incorporada na proteína e também está envolvida na produção da glutatona, taurina, coenzima A (relacionada com a síntese de ácidos graxos), e enxofre inorgânico (Brosnan e Brosnan, 2006). A cistina, glutatona e taurina desempenham papel no mecanismo de defesa, antioxidante (Huang et al., 2012).

1.1.2.5. Glutatona

A glutatona é um tripeptídeo solúvel em água e de baixo peso molecular (Wu et al., 2004) composto por glutamina, glicina e cisteína (Bridgeman et al., 1991; Meister and Anderson, 1983; Rover Júnior et al., 2001; Sies, 1999; Townsend et al., 2003). É considerado o tiol não proteico de maior importância no meio intracelular (Dringen, 2000; Pastore et al., 2003) e tem como principal função a ação antioxidante (Pastore et al., 2003; Rover Júnior et al., 2001; Sies, 1999). A cisteína é um aminoácido limitante na síntese de glutatona, mas é eficientemente utilizado, sendo pouco perdido para formar sulfato e taurina (Stipanuk et al., 1992; Tateishi et al., 1977).

A porção ativa da glutatona é representada pelo tiol (-SH) do resíduo de cisteína, um potente agente redutor (Pastore et al., 2003; Townsend et al., 2003).

Existem as formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) nas células (Meister e Anderson, 1983; Rover Júnior et al., 2001; Townsend et al., 2003), além das enzimas glutaciona peroxidase e glutaciona redutase (Huber et al., 2008).

Glutaciona reduzida (GSH): GSH é a forma reduzida da glutaciona, possui um grupo sulfidríla livre, que interage com o radical livre e forma a glutaciona oxidada (forma dimerizada). Nos eritrócitos, encontra-se principalmente a forma reduzida, pois a forma GSSG atravessa facilmente a membrana celular (Schott et al., 2007).

Glutaciona oxidada (GSSG): A forma GSSG é rapidamente revertida para GSH pela enzima glutaciona redutase (GR), transferindo elétrons a partir da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) para a GSSG. (Dringen, 2000; Janiak et al., 2010) **Glutaciona peroxidase (GPx):** é uma enzima composta por 4 subunidades idênticas, que tem como principal função detoxificar peróxidos com atuação da GSH doando elétrons por reação de redução, produzindo GSSG (Townsend et al., 2003). A enzima glutaciona peroxidase possui um resíduo de cisteína contendo selênio covalentemente ligado ao restante da enzima (Rover Júnior et al., 2001).

Glutaciona redutase (GR): é uma enzima responsável pela regeneração da glutaciona, convertendo GSSG para GSH. Sob condições de stress oxidativo, GR é regulada ao nível da transcrição, bem como por modificações pós-tradução. Esta enzima transfere elétrons a partir da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida) (NADPH) para GSSG, regenerando a GSH. (Dringen, 2000).

1.1.2.6. Mecanismo de ação da glutaciona

Durante a detoxificação de espécies reativas de oxigênio (ROS), a glutaciona está envolvida em dois tipos de reações: primeiro, reage de forma não enzimática com radicais tais como: ânion superóxido, óxido nítrico ou radical hidroxil. A outra reação seria o GSH como doador de elétron para redução de peróxidos na reação de GPx. O produto final da oxidação de GSH é a glutaciona oxidada (GSSG). Dentro das células, a GSH é regenerada a partir de GSSG pela reação catalisada pela glutaciona redutase (GR). O produto da reação da GPx é a GSSG, que é substrato da flavoenzima GR. Esta enzima transfere elétrons a partir da adenina dinucleotídeo nicotinamida fosfato (forma reduzida) (NADPH) para GSSG, assim regenerando o GSH. Assim, a glutaciona usada para esses processos tem que ser repostada pela resíntese a partir de constituintes aminoacídicos. A GSH não reage diretamente com hidropéroxidos, sendo

usada como substrato para glutathione peroxidase (GPx) como mecanismo para redução de H₂O₂ e hidroperóxidos de lipídios (Comporti, 1987).

1.2. Qualidade da pelagem

A qualidade da pelagem é um aspecto relevante para animais de companhia e a nutrição pode interferir neste indicador. Desbalanços de ácidos graxos, vitaminas, minerais e aminoácidos refletem diretamente na qualidade dos pelos, o que é um aspecto relevante para se avaliar o estado de saúde geral do animal na clínica veterinária e também, esteticamente pelo proprietário.

Determinar a qualidade dos pelos é uma tarefa difícil, pois não existem métodos precisos e específicos. Existem avaliações feitas por pessoas treinadas, quanto ao aspecto e brilho dos pelos (Kirby et al., 2009; Rees et al., 2001) ou análises mais invasivas, como as utilizadas com animais de pelagem como furões e raposas (Dahlman et al., 2003), em que deve ser feita a eutanásia dos animais.

Avaliações utilizadas em cabelos humanos como: indicadores de brilho, resistência (Velasco et al., 2009), concentração de queratina e ligações relacionadas (Kuzuhara et al., 2007), taxa de crescimento e a avaliação microscópica (Harland et al., 2011) podem ser utilizadas na determinação da qualidade da pelagem em animais de companhia.

1.2.1. Definição e anatomia de pelo

Pelos e cabelos são filamentos proteicos queratinosos e estão divididos em raiz e haste (Bernard, 2002). A haste é a parte que se projeta da superfície da pele e a raiz está inserida na pele, sendo que se desenvolvem a partir de células da matriz de folículos pilosos (Combs, 1987). O folículo estende-se através da epiderme e está incorporado no tecido conjuntivo da derme. Cada folículo piloso é um órgão em miniatura com músculo liso, glândulas sudoríparas apócrina sebáceas, nervos e um rico plexo de vasos sanguíneos (Mescher e Junqueira, 2013).

O eixo do fio produz queratina de fibras longas que se ligam entre si fortemente, através da substituição de grupos SH com ligações S-S e através ligação química com outras proteínas. O resultado é uma estrutura muito forte e altamente estável com grande quantidade de enxofre (Harkey, 1993; Kuzuhara, 2005; Velasco et al., 2009).

As características físicas das fibras dos pelos dependem da espécie animal, estado nutricional e fisiológico, e o comprimento da fibra depende do tempo da fase de crescimento (anágena) (Marshall et al., 1991).

O pelo possui três camadas principais: a cutícula (cerca de 10% da fibra), o córtex (cerca de 88% da fibra) e o complexo da membrana celular (cerca de 2% da fibra) que une as células corticais e cuticulares adjacentes (Fraser e Gillespie 1976). Alguns fios também podem apresentar a medula na região central (Feughelman, 1997; Wolfram, 2003).

Todas as camadas são compostas de células mortas, que são preenchidas pela queratina. A queratina é caracterizada por elevado conteúdo de cistina, um aminoácido que tem a capacidade de se ligar à proteína pelas suas ligações dissulfeto intermoleculares, além de possuir outras ligações peptídicas e grupos CO- e NH-, formando pontes de hidrogênio com outras moléculas (Wei et al., 2005).

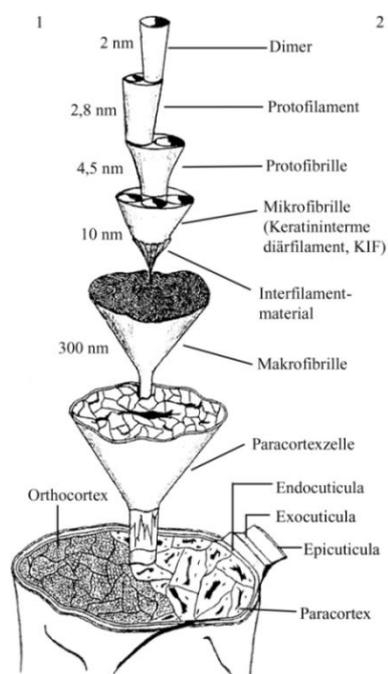


Figura 1. Esquema representando a fibra capilar e as subunidade componentes da cutícula e córtex (Fonte: Zahn, 2002).

A cutícula é constituída por material proteico e amorfo, possui células anucleadas e achatadas, sendo a parte mais externa do fio e a responsável pela proteção das células corticais (Wolfram, 2003). Possui de 6 a 8 camadas de células sobrepostas, sendo responsáveis pelas propriedades de brilho e resistência (Smith e Swift 2002).

O córtex é o componente em maior proporção do fio, representando cerca de 75% (Velasco et al., 2009). As células são fundidas fortemente e orientadas paralelamente ao eixo da fibra. Cada célula da camada cortical é formada por macrofibrilas, e estas são compostas por microfibrilas unidas pela matriz intercelular e formadas por queratina amorfa preenchidas por ligações cruzadas de enxofre. Cada microfibrila (ou filamentos intermediários) é formada por cerca de 7 protofibrilas (estrutura formada pelas cadeias de α - queratina em duplas hélices). Dependendo da disposição e do arranjo espacial, essas células são classificadas em paracorticais ou ortocorticais (Gama, 2010; Robbins e Crawford, 1991; Velasco et al., 2009).

A medula está localizada no centro do fio e pode estar ausente, como na lã ou ser fragmentada ou contínua quando presente (Harkey, 1993; Leon, 1972). A composição química da medula apresenta alto teor de lipídios, pobre em cistina, quando comparada ao restante da fibra (de Cassia Comis Wagner et al., 2007; Leon, 1972).

1.2.2. Composição do pelo

O pelo contém pouca quantidade de água, sendo composto por aproximadamente 65-95% de proteína, 15-35% de umidade, 1-9% de lipídios e 0,25-0,95% de minerais (Harkey, 1993). A porção lipídica é composta por sebo e as secreções da glândula apócrina, como ácidos graxos livres, mono, di, e triglicerídeos, ceramidas e glicolipídios (Harkey, 1993; Marshall et al., 1991) A porção proteica, das queratinas rígidas de mamíferos, contém mistura complexa de proteínas. Elas são dispostas numa estrutura de filamentos de matriz, que é estabilizada por ligações dissulfeto (Frenkel et al., 1973; Marshall, 1983).

1.2.3. Folículo do pelo

O folículo piloso está incorporado no epitélio da epiderme, aproximadamente, 3-4 mm abaixo da superfície da pele. Está associado com a glândula sebácea e glândula apócrina. Na maior parte do corpo, o folículo piloso e a glândula sebácea são fundidos tanto anatomicamente e funcionalmente, sendo chamado de uma unidade pilossebácea, (Harkey, 1993)

O folículo piloso é onde o fio é produzido e pode ser dividido em 3 regiões anatômicas: o infundíbulo, istmo e segmento inferior (Feughelman, 1997; Randall, 2008).

O infundíbulo e istmo são permanentes e não ocorre mudanças significativas do ciclo de crescimento do pelo neste local. Já o segmento inferior se regenera a cada ciclo do folículo piloso. O istmo, é a porção média, se estende a partir do ducto da glândula sebácea até o músculo eretor do pelo. A região transitória se estende da inserção da musculatura eretora até à base do folículo ou bulbo piloso. Este segmento é dividido em duas porções: bulbo piloso e porção germinativa, onde ocorrem modificações morfológicas ao longo do ciclo do crescimento do pelo (Alonso e Rosenfield, 2003; Randall et al., 2008; Waters et al., 2007).

O bulbo piloso possui queratinócitos proliferativos e melanócitos (produtores de pigmento) que circundam a papila dérmica, eles se deslocam para cima e diferenciam-se na haste do fio (Randall et al., 2008). O tamanho do bulbo do pelo, a duração da fase de seu crescimento e, conseqüentemente, o comprimento e diâmetro do fio estão diretamente relacionados com o volume de células germinativas existentes na papila dérmica (Bernard, 2002; Ohyama, 2007). A produção e o crescimento do pelo são determinados pela matriz do folículo (Schneider et al., 2009).

As células da matriz localizadas no ápice da papila dão origem aos três componentes do pelo: cutícula, córtex e medula. Os folículos pilosos não apresentam crescimento contínuo e cada haste se encontra em uma fase do ciclo de crescimento. Existem três fases do ciclo de crescimento do folículo piloso: *anágena*, *catágena* e *telógena* (Alonso e Rosenfield, 2003).

1.2.4. Ciclo de Crescimento do pelo

Os pelos possuem um desenvolvimento cíclico em todos os animais e o modo como essa ciclicidade se comporta é dependente da espécie animal (Stenn e Paus 2001).

Em muitos animais, o ciclo de crescimento é dependente da estação do ano, sendo a taxa de crescimento mais intensa normalmente anterior à estação do inverno e a perda de pelo ocorre mais nos meses de calor; mas os ciclos são bastante variáveis para cada espécie animal (Bost, 1993).

Existem muitos fatores que interferem no crescimento do folículo piloso como: hormônios, idade e estágio de desenvolvimento ou alterações ambientais como a

duração do dia (Randall, 2008). Os hormônios ditam as alterações no folículo para o próximo ciclo (Randall, 2008; Randall et al., 2008). Existem três fases do ciclo de crescimento do folículo piloso:

Anágena: é a fase ativa de crescimento do fio. A duração da fase de crescimento é variável: entre espécies, em uma mesma espécie e entre as diversas localizações do tegumento. No final desta fase, é formado o bulbo capilar em torno da papila dérmica e o novo eixo do fio emerge a partir da superfície da pele e por razões desconhecidas essa fase é interrompida abruptamente (Feughelman, 1997; Ohyama, 2007; Schneider et al., 2009).

Catágena: é a fase de involução e ocorre intensa remodelação por processos apoptóticos. No início da fase catágena, a proliferação e diferenciação de queratinócitos da matriz do pelo reduzem-se drasticamente. A base do eixo do pelo torna-se totalmente queratinizado (Harkey, 1993). A fase catágena necessita de energia, apesar de ser considerado um evento regressivo, pois dessa forma, assegura a renovação de uma nova geração do folículo piloso (Marshall et al., 1991).

Telógena: Na fase telógena ou de repouso, uma nova matriz se forma gradualmente, a partir das células germinativas da camada basal da raiz do pelo (Bernard, 2002). O pelo se separa da papila dérmica, sendo facilmente destacado. A porção inferior apresenta-se queratinizada e o comprimento do folículo é reduzido. A queda de um pelo telógeno normal delimita o fim de um ciclo e o início de outro (Ohyama, 2007).

1.3. Métodos para estimar exigências de proteína e aminoácidos

Existem alguns métodos para estimar exigências nutricionais para animais e humanos, como: balanço de nitrogênio (Rand e Young, 1999), isótopos marcados (Millward and Jackson, 2012) e abate comparativo (Heger et al., 2008).

O balanço de nitrogênio é basicamente a diferença entre o que foi ingerido (nitrogênio da dieta) e excretado (nitrogênio das fezes e urina). Porém, existem outras rotas de eliminação de nitrogênio, que geralmente não são contabilizadas, como: suor, descamação gastrointestinal, unhas, cabelo, chamadas de perdas endógenas. O método é bastante utilizado na determinação de exigências de proteína e aminoácidos, devido à fácil execução experimental. Existem algumas críticas ao balanço de nitrogênio, como susceptibilidade de erro na quantificação de perdas do alimento não consumido, superestimando a ingestão. Outra questão que ocasiona na superestimação da ingestão de nitrogênio é a dificuldade de quantificar e analisar as diversas perdas de nitrogênio,

como por exemplo: via suor, descamação, perda de unhas e cabelos (FAO/WHO, 2007).

Os estudos com isótopos marcados podem ser por oxidação de aminoácido indicador ou oxidação direta do aminoácido. Ambas são técnicas baseadas no conceito, de que quando um aminoácido essencial está deficiente para síntese proteica, todos os outros aminoácidos, inclusive o aminoácido indicador (geralmente usa-se a L-[1-¹³C] fenilalanina), serão oxidados. Ao aumento da ingestão do aminoácido limitante, a oxidação do aminoácido indicador irá diminuir a incorporação na proteína. Uma vez que a exigência é atendida para o aminoácido limitante, não haverá mudança na oxidação do aminoácido indicador e a exigência será definida quando se alcança o platô (Elango et al., 2008). O aminoácido marcado é injetado por via intravenosa, alcançando um enriquecimento isotópico do aminoácido no plasma para um valor de platô. Além disso, são feitas medidas da taxa de expiração do carbono marcado na respiração, que permite calcular a taxa de oxidação. Têm como vantagem serem estudos de curta duração, já que a coleta dos dados de oxidação do aminoácido é geralmente entre 4 e 24 horas e serem consideradas uma técnica pouco invasiva. Como desvantagem, a oxidação de aminoácido indicador para alguns aminoácidos não podem ser diretamente mensurados pelo enriquecimento do precursor, devendo optar pelo método de oxidação de aminoácido indicador (FAO/WHO, 2007).

O abate comparativo é um método direto para estimar a composição corporal e verificar os acréscimos de deposição de tecidos e nutrientes, sendo analisada a carcaça inteira para cada nutriente ou energia. Este método é mais utilizado para animais de produção, como gado de corte (Fontes et al., 2005).

Para avaliar exigências aminoacídicas corretamente, deve se atentar para o delineamento utilizado, a análise estatística e a interpretação dos resultados. (Shoveller e Atkinson, 2008). A grande maioria dos experimentos com exigências utilizam como variáveis: o crescimento, conversão alimentar, ureia plasmática, aminoácidos plasmáticos ou balanço de nitrogênio, sendo que a alimentação deve fornecer níveis crescentes do aminoácido (Baker, 1986). Um mínimo de três, mas preferencialmente seis ou mais, níveis dietéticos de aminoácidos são exigidos, e tais dados podem ser ajustados para a resposta, para avaliar a exigência. As diferenças estatísticas ou a falta entre qualquer nível próximo é sem sentido (Baker, 1986).

Em relação ao período de adaptação, existem controvérsias, sendo um período curto de adaptação às novas dietas com o aminoácido a ser testado. Ele pode ser

inadequado, sendo que os dados são sempre coletados de animais alimentados. A adaptação às dietas pode ter um problema devido ao balanço de nitrogênio e exigir longos períodos de adaptação de 7 a 10 dias para estabilizar a excreção de nitrogênio urinário, assim como a rota metabólica do aminoácido pode exigir um longo período para que uma resposta seja obtida de acordo com a troca da dieta. Entretanto, alterações de ingestão de aminoácido mudam a expressão de RNA-T-aminoacil em menos de 4 horas (Shoveller e Atkinson, 2008).

1.3.1. Método de Göttingen

O método foi inicialmente desenvolvido por Gebhardt entre 1970 e 1990 na Universidade de Leipzig, porém foram os pesquisadores da Universidade de Göttingen, na Alemanha que endossaram a metodologia com a modelagem de exigências aminoacídicas, unindo assim fisiologia com a matemática (Sakomura e Gous, 2014).

O método de Göttingen já foi utilizado para estimar exigências de aminoácidos para diversas espécies de animais de produção como aves de postura e corte; suínos, peixes (Liebert e Benkendorff, 2007b; Pastor et al., 2013; Wecke e Liebert, 2009), porém, ainda não havia sido aplicado para animais de companhia, assim como a técnica de formulação de ração, a técnica da diluição.

A escolha de um melhor método que consiga conciliar a parte matemática com os fenômenos biológicos, tem sido alvo de muitos estudos na área de exigências nutricionais.

Existem diversos métodos que são capazes de estimar exigências nutricionais, como abate comparativo, balanço de nitrogênio, oxidação de aminoácidos. No entanto, a maior dificuldade na comparação dos resultados entre estudos nutricionais de cães e gatos é o pequeno volume de publicações, a grande variação nas metodologias empregadas e falta de padronização do genótipo.

O método de Göttingen utiliza função exponencial, que descreve a retenção de nitrogênio no organismo (nitrogênio depositado somado ao nitrogênio de manutenção), dependente da quantidade e qualidade do nitrogênio ingerido. As variáveis de nitrogênio ingerido, excretado e depositado são obtidas pelo ensaio de balanço de nitrogênio. Enquanto os valores de NMR (exigência de nitrogênio de manutenção), b e $NR_{max}T$ (retenção máxima teórica de nitrogênio diário) provém da análise de

regressão. A exigência do aminoácido deve ser modelada segundo a deposição de proteína desejada, utilizando-se porcentagens do $NR_{max}T$. Em animais de produção, é comum utilizar uma deposição de proteína almejada e fornecer uma ração de acordo com esse objetivo. E, no caso de aminoácido, seria uma quantidade x para atingir a deposição. Além disso, para aves de corte, existem diferentes linhagens com determinada deposição de proteína para cada uma, o que ajuda na escolha de uma porcentagem do $NR_{max}T$. No caso de animais de companhia, o objetivo não seria a deposição de proteína para um rendimento de melhor carcaça, mas sim, em relação à composição corporal e maior porcentagem de massa magra, em detrimento da gordura corporal. A maior porcentagem de gordura no corpo para cães e gatos acarreta em problemas como obesidade, diabetes, problemas de articulação entre outros (Laflamme e Hannah, 2005).

LITERATURA CITADA

- Allison, J. B.; J. A. Anderson. 1945. The Relation between Absorbed Nitrogen, Nitrogen Balance and Biological Value of Proteins in Adult Dogs: Two Figures. *The Journal of Nutrition* 29: 413-420.
- Alonso, L. C.; R. L. Rosenfield. 2003. Molecular Genetic and Endocrine Mechanisms of Hair Growth. *Hormone Research in Paediatrics* 60: 1-13.
- Arnold, A.; J. S. Schad. 1954. Nitrogen Balance Studies with Dogs on Casein or Methionine-Supplemented Casein. *The Journal of Nutrition* 53: 265-273.
- Axelsson, E. et al. 2013. The genomic signature of dog domestication reveals adaptation to a starch-rich diet. *Nature* 495: 360-364.
- Baker, D. H. 1986. Problems and Pitfalls in Animal Experiments Designed to Establish Dietary Requirements for Essential Nutrients. *The Journal of Nutrition* 116: 2339-2349.
- Baker, D. H.; G. L. Czarnecki-Maulden. 1991. Comparative nutrition of cats and dogs. *Annual Reviews Nutrition* 11: 239-263.
- Ball, R. O., G. Courtney-Martin e P. B. Pencharz. 2006. The In Vivo Sparing of Methionine by Cysteine in Sulfur Amino Acid Requirements in Animal Models and Adult Humans. *The Journal of Nutrition* 136: 1682S-1693S.
- Bernard, B. A. 2002. Hair biology: an update. *International Journal of Cosmetic Science* 24: 13-16.
- Blanchard, G., B. M. Paragon, F. Milliat; C. Lutton. 2002. Dietary L-carnitine supplementation in obese cats alters carnitine metabolism and decreases ketosis during fasting and induced hepatic lipidosis. *J Nutr* 132: 204-210.
- Blaza, S. E., I. H. Burger, D. W. Holme e P. T. Kendall. 1982. Sulfur-Containing Amino Acid Requirements of Growing Dogs. *The Journal of Nutrition* 112: 2033-2042.
- Bost, R. O. 1993. Hair analysis — perspectives and limits of a proposed forensic method of proof: a review. *Forensic Science International* 63: 31-42.

- Bridgeman, M. M., M. Marsden, W. MacNee, D. C. Flenley; A. P. Ryle. 1991. Cysteine and glutathione concentrations in plasma and bronchoalveolar lavage fluid after treatment with N-acetylcysteine. *Thorax* 46: 39-42.
- Brosnan, J. T.; M. E. Brosnan. 2006. The Sulfur-Containing Amino Acids: An Overview. *The Journal of Nutrition* 136: 1636S-1640S.
- Case, L. P. D., L. ; Hayek, M. G. ; Raasch, M. F. 2011. *Canine and Feline Nutrition. A Resource for Companion Animal Professionals. Third Edition ed, Missouri.*
- Combs, D. K. 1987. Hair Analysis as an Indicator of Mineral Status of Livestock. *Journal of Animal Science* 65: 1753-1758.
- Comporti, M. 1987. Glutathione depleting agents and lipid peroxidation. *Chemistry and Physics of Lipids* 45: 143-169.
- Dahlman, T., J. Valaja, T. Jalava e A. Skrede. 2003. Growth and fur characteristics of blue foxes (*Alopex lagopus*) fed diets with different protein levels and with or without DL-methionine supplementation in the growing-furring period. *Canadian Journal of Animal Science* 83: 239-245.
- de Cassia Comis Wagner, R., P. K. Kiyohara, M. Silveira e I. Joekes. 2007. Electron microscopic observations of human hair medulla. *J Microsc* 226: 54-63.
- Dringen, R. 2000. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progress in Neurobiology* 62: 649-671.
- Eisert, R. 2011. Hypercarnivory and the brain: protein requirements of cats reconsidered. *Journal of comparative physiology. B, Biochemical, systemic, and environmental physiology* 181: 1-17.
- Elango, R., R. O. Ball e P. B. Pencharz. 2008. Indicator Amino Acid Oxidation: Concept and Application. *The Journal of Nutrition* 138: 243-246.
- FAO/WHO, Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization, United Nations University. 2007. Protein and amino acid requirements in human nutrition: report of a joint FAO/WHO/UNU expert consultation, Geneva: World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Feughelman, M. 1997. Morphology and properties of hair. *Cosmetic Science and Technology Series*: 1-12.
- Finkelstein, J. D. 1990. Methionine metabolism in mammals. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 1: 228-237.
- Fontes, C. A. d. A., R. C. d. Oliveira, E. D. Á. Erbesdobler e D. S. d. Queiroz. 2005. Uso do abate comparativo na determinação da exigência de energia de manutenção de gado de corte pastejando capim-elefante: descrição da metodologia e dos resultados. *Revista Brasileira de Zootecnia* 34: 1721-1729.
- Fraser, R. D. B., e J. M. Gillespie. 1976. Wool structure and biosynthesis. *Nature* 261: 650-654.
- Frenkel, M. J., J. M. Gillespie, e E. F. Woods. 1973. The Isolation and Properties of a Tyrosine-Rich Protein from Wool: Component 0.62. *European Journal of Biochemistry* 34: 112-119.
- Gama, R. M. 2010. Avaliação do dano a haste capilar ocasionado por tintura oxidativa aditivada ou não de substâncias condicionadoras, São Paulo.
- Green, A. S. et al. 2008. Cats Are Able to Adapt Protein Oxidation to Protein Intake Provided Their Requirement for Dietary Protein Is Met. *The Journal of Nutrition* 138: 1053-1060.
- Grunwell, J. R. et al. 2015. Comparison of Glutathione, Cysteine, and their Redox Potentials in the Plasma of Critically Ill and Healthy Children. *Frontiers in Pediatrics* 3.

- Harkey, M. R. 1993. Anatomy and physiology of hair. *Forensic Science International* 63: 9-18.
- Harland, D. P., J. A. Vernon, R. J. Walls, e J. L. Woods. 2011. Transmission electron microscopy staining methods for the cortex of human hair: a modified osmium method and comparison with other stains. *Journal of Microscopy* 243: 184-196.
- Heger, J., P. Patráš, S. Nitrayová, J. Karcol, e P. Dolešová. 2008. Lysine maintenance requirement and efficiency of its utilisation in young pigs as estimated by comparative slaughter technique. *Archives of Animal Nutrition* 62: 182-192.
- Hendriks, W. H., P. J. Moughan, M. F. Tarttelin, e A. D. Woolhouse. 1995. Felinine: a urinary amino acid of Felidae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 112: 581-588.
- Hendriks, W. H. 1996. Protein Metabolism in the Adult Domestic Cat (*Felis catus*), Massey University, Palmerston North, New Zealand.
- Huang, L. et al. 2012. Methionine requirement of the enterally fed term infant in the first month of life in the presence of cysteine. *The American Journal of Clinical Nutrition* 95: 1048-1054.
- Huber, P. C., W. P. Almeida, e Â. d. Fátima. 2008. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. *Química Nova* 31: 1170-1179.
- Janiak, M., M. Suska, W. Dudzińska, e E. Skotnicka. 2010. Blood glutathione status and activity of glutathione-metabolizing antioxidant enzymes in erythrocytes of young trotters in basic training. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 94: 137-145.
- Jeremias, J. T. et al. 2013. Predictive formulas for food base excess and urine pH estimations of cats. *Animal Feed Science and Technology* 182: 82-92.
- Kirby, N. A. et al. 2009. Skin surface lipids and skin and hair coat condition in dogs fed increased total fat diets containing polyunsaturated fatty acids. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 93: 505-511.
- Kirk, C. 2013. Feline Nutrition: What Is Excess Carbohydrate? *Companion Animal Nutrition Summit Tackling Myths About Pet Nutrition*. p 90. Nestlé Purina, Atlanta, Georgia.
- Kirk, C. A. 2006. Feline Diabetes Mellitus: Low Carbohydrates Versus High Fiber? *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 36: 1297-1306.
- Kirk, C. A., J. Debraekeleer, e P. J. Armstrong. 2000. Normal cats *Small animal clinical nutrition* No. 4th. p 291-351. Philadelphia: WB Saunders Co, Philadelphia.
- Kuzuhara, A. 2005. Protein structural changes in keratin fibers induced by chemical modification using 2-iminothiolane hydrochloride: A Raman spectroscopic investigation. *Biopolymers* 79: 173-184.
- Kuzuhara, A., N. Fujiwara, e T. Hori. 2007. Analysis of internal structure changes in black human hair keratin fibers with aging using Raman spectroscopy. *Biopolymers* 87: 134-140.
- Laffel, L. 1999. Ketone bodies: a review of physiology, pathophysiology and application of monitoring to diabetes. *Diabetes/metabolism research and reviews* 15: 412-426.
- Laflamme, D. P., e S. S. Hannah. 2005. Increased Dietary Protein Promotes Fat Loss and Reduces Loss of Lean Body Mass During Weight Loss in Cats. *Intern J Appl Res Vet Med* 3.
- Lenninger, A. L. 1996. *Princípios de Bioquímica*. Sarvier, São Paulo.

- Leon, N. 1972. Structural aspects of keratin fibres. *J Soc Cosmet Chem GB* 23: 427-445.
- Liebert, F., e K. Benkendorff. 2007. Modeling lysine requirements of *Oreochromis niloticus* due to principles of the diet dilution technique. *Aquaculture* 267: 100-110.
- MacDonald, M. L., Q. R. Rogers, e J. G. Morris. 1984. Nutrition of the domestic cat, a mammalian carnivore *Annual Review of Nutrition* 4: 521-562.
- Markwell, P. J., C. T. Buffington, e B. H. E. Smith. 1998. The Effect of Diet on Lower Urinary Tract Diseases in Cats. *The Journal of Nutrition* 128: 2753S-2757S.
- Marshall, R. C. 1983. Characterization of the Proteins of Human Hair and Nail by Electrophoresis. *Journal of Investigative Dermatology* 80: 519-524.
- Marshall, R. C., D. F. G. Orwin, e J. M. Gillespie. 1991. Structure and biochemistry of mammalian hard keratin. *Electron Microscopy Reviews* 4: 47-83.
- Marzoco, A., e B. B. Torres. 2007. *Bioquímica básica*, Rio de Janeiro.
- Meister, A., e M. E. Anderson. 1983. Glutathione. *Annual review of biochemistry* 52: 711-760.
- Mescher, A. L., e L. C. U. Junqueira. 2013. *Junqueira's basic histology : text and atlas*. <http://accessmedicine.mhmedical.com/book.aspx?bookId=574>.
- Miller, S. A., e J. B. Allison. 1958. The Dietary Nitrogen Requirements of the Cat. *The Journal of Nutrition* 64: 493-501.
- Millward, D. J., e A. A. Jackson. 2012. Protein requirements and the indicator amino acid oxidation method. *The American Journal of Clinical Nutrition* 95: 1498-1501.
- Morris, J. G. 2002. Idiosyncratic nutrient requirements of cats appear to be diet-induced evolutionary adaptations. *Nutrition Research Reviews* 15: 153-168.
- Morris, M. 2010. *Small Animal Clinical Nutrition*.
- Nelson, D. L., e M. M. Cox. 2014. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. Artmed, Porto Alegre.
- NRC. 2006. *Nutrient requirements of dogs and cats* Washington.
- Ohtsu, I. et al. 2010. The l-Cysteine/l-Cystine Shuttle System Provides Reducing Equivalents to the Periplasm in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 285: 17479-17487.
- Ohyama, M. 2007. Hair follicle bulge: A fascinating reservoir of epithelial stem cells. *Journal of Dermatological Science* 46: 81-89.
- Pastor, A., C. Wecke, e F. Liebert. 2013. Assessing the age-dependent optimal dietary branched-chain amino acid ratio in growing chicken by application of a nonlinear modeling procedure. *Poultry Science* 92: 3184-3195.
- Pastore, A., G. Federici, E. Bertini, e F. Piemonte. 2003. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clinica Chimica Acta* 333: 19-39.
- Piechota, T. R., Q. R. Rogers, e J. G. Morris. 1995. Nitrogen requirement of cats during gestation and lactation. *Nutrition Research* 15: 1535-1546.
- Rand, W. M., e V. R. Young. 1999. Statistical Analysis of Nitrogen Balance Data with Reference to the Lysine Requirement in Adults. *The Journal of Nutrition* 129: 1920-1926.
- Randall, A. V. 2008. The Endocrine Control of the Hair Follicle. In: U. Blume-Peytavi, A. Tosti and M. R. Trüeb (eds.) *Hair Growth and Disorders*. p 23-39. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Randall, V. A., N. V. Botchkareva, and G. Ahluwalia. 2008. The biology of hair growth. *Cosmetic applications of laser and light based systems*. William Andrew Inc., NY, USA: 3-35.

- Rasmussen, P. V., e C. F. Børsting. 2000. Effects of variations in dietary protein levels on hair growth and pelt quality in mink (*Mustela vison*). *Canadian Journal of Animal Science* 80: 633-642.
- Rees, C. A. et al. 2001. Effects of dietary flax seed and sunflower seed supplementation on normal canine serum polyunsaturated fatty acids and skin and hair coat condition scores. *Veterinary Dermatology* 12: 111-117.
- Richie, J. P. et al. 1994. Methionine restriction increases blood glutathione and longevity in F344 rats. *The FASEB Journal* 8: 1302-1307.
- Robbins, C., e R. Crawford. 1991. Cuticle damage and the tensile properties of human hair. *J Soc Cosmet Chem* 42: 59-67.
- Rogers, Q. R., J. G. Morris, e R. A. Freedland. 1977. Lack of hepatic enzymatic adaptation to low and high levels of dietary protein in the adult cat. *Enzyme* 22: 348-356.
- Rover Júnior, L., N. F. Höehr, A. P. Vellasco, e L. T. Kubota. 2001. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. *Química Nova* 24: 112-119.
- Sakomura, N. K., e R. M. Gous. 2014. *Nutritional Modelling for Pigs and Poultry*.
- Sakomura, N. K., e H. S. Rostagno. 2007. *Métodos de pesquisa em nutrição de monogástricos*. Funep, Jaboticabal.
- Samadi, e F. Liebert. 2006. Modeling of Threonine Requirement in Fast-Growing Chickens, Depending on Age, Sex, Protein Deposition, and Dietary Threonine Efficiency. *Poultry Science* 85: 1961-1968.
- Schaeffer, M. C., Q. R. Rogers, e J. G. Morris. 1982. Methionine Requirement of the Growing Kitten, in the Absence of Dietary Cystine. *The Journal of Nutrition* 112: 962-971.
- Schneider, M. R., R. Schmidt-Ullrich, e R. Paus. 2009. The Hair Follicle as a Dynamic Miniorgan. *Current Biology* 19: R132-R142.
- Schott, K. L. et al. 2007. Influência de desproteinizantes ácidos na quantificação da glutatona reduzida eritrocitária por CLAE-UV. *Química Nova* 30: 592-596.
- Shoveller, A. K., e D. J. L. Atkinson. 2008. Assessment of protein and amino acid requirements in adult mammals, with specific focus on cats, dogs and rabbits. In: J. France and E. Kebreab (eds.) *Mathematical modelling in animal nutrition*. CAB International.
- Sies, H. 1999. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radical Biology and Medicine* 27: 916-921.
- Smalley, K. A., Q. R. Rogers, e J. G. Morris. 1983. Methionine requirement of kittens given amino acid diets containing adequate cystine. *British Journal of Nutrition* 49.
- Smalley, K. A., Q. R. Rogers, J. G. Morris, e E. Dowd. 1993. Utilization of d-methionine by weanling kittens. *Nutrition Research* 13: 815-824.
- Smalley, K. A., Q. R. Rogers, J. G. Morris, e L. L. Eslinger. 1985. The nitrogen requirement of the weanling kitten. *British Journal of Nutrition* 53: 501-512.
- Smith, J. R., e J. A. Swift. 2002. Lamellar subcomponents of the cuticular cell membrane complex of mammalian keratin fibres show friction and hardness contrast by AFM. *Journal of Microscopy* 206: 182-193.
- Stenn, K. S., e R. Paus. 2001. Controls of Hair Follicle Cycling. *Physiological Reviews* 81: 449-494.
- Stipanuk, M. H. 1986. Metabolism of sulfur-containing amino acids. *Annu Rev Nutr* 6: 179-209.

- Stipanuk, M. H., R. M. Coloso, R. A. G. Garcia, e M. F. Banks. 1992. Cysteine Concentration Regulates Cysteine Metabolism to Glutathione, Sulfate and Taurine in Rat Hepatocytes. *The Journal of Nutrition* 122: 420-427.
- Tateishi, N., T. Higashi, A. Naruse, K. Nakashima, e H. Shiozaki. 1977. Rat liver glutathione: possible role as a reservoir of cysteine. *J Nutr* 107: 51-60.
- Townsend, D. M., K. D. Tew, e H. Tapiero. 2003. The importance of glutathione in human disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 57: 145-155.
- Velasco, M. V. R. et al. 2009. Hair fiber characteristics and methods to evaluate hair physical and mechanical properties. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 45: 153-162.
- Waters, J. M., G. D. Richardson, e C. A. B. Jahoda. 2007. Hair follicle stem cells. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 18: 245-254.
- Wecke, C., e F. Liebert. 2009. Lysine requirement studies in modern genotype barrows dependent on age, protein deposition and dietary lysine efficiency. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 93: 295-304.
- Wei, G., B. Bhushan, e P. M. Torgerson. 2005. Nanomechanical characterization of human hair using nanoindentation and SEM. *Ultramicroscopy* 105: 248-266.
- Wolfram, L. J. 2003. Human hair: A unique physicochemical composite. *Journal of the American Academy of Dermatology* 48: S106-S114.
- Wu, G., Y.-Z. Fang, S. Yang, J. R. Lupton, e N. D. Turner. 2004. Glutathione Metabolism and Its Implications for Health. *The Journal of Nutrition* 134: 489-492.
- Yin, J. et al. 2015. l-Cysteine metabolism and its nutritional implications. *Molecular Nutrition & Food Research*: n/a-n/a.
- Zahn, H. 2002. Progress report on hair keratin research. *International Journal of Cosmetic Science* 24: 163-169.
- Zoran, D. L. 2002. The carnivore connection to nutrition in cats. *Vet Med Today: Timely Topics in Nutrition* 221.

II- OBJETIVOS GERAIS

Estimar as necessidades proteicas e de aminoácidos sulfurados totais para gatos em crescimento, dos 150-240 dias de idade.

Objetivos específicos

Estimar as necessidades de nitrogênio de manutenção e de aminoácidos sulfurados totais para gatos em crescimento, pelo método de Göttingen.

Relacionar as ingestões de proteína bruta, aminoácidos sulfurados totais e energia metabolizável com parâmetros de saúde (indicadores de crescimento, qualidade de pelagem, parâmetros sanguíneos) relacionados ao metabolismo de proteína e metionina+cistina, para gatos dos 150-240 dias de idade.

III- Estimativa das necessidades de nitrogênio e aminoácidos sulfurados para gatos em crescimento pelo método de Göttingen

(Journal of Animal Science)

J. Sato*, **M. E. Z. Merenda***, **A. T. Uemoto***, **M. P. Santos***, **E. P. Silva†**, **A. C. Carcioffi†**, **M. Barion‡**, **R. S. Vasconcellos***

* Universidade Estadual de Maringá-UEM, Maringá, Paraná, Brasil; † Universidade Estadual Paulista-UNESP-FCAV, Jaboticabal, São Paulo, Brasil; ‡ Médica veterinária autônoma, Autor correspondente: joycesato1986@yahoo.com.br

RESUMO: O objetivo do estudo foi estimar a necessidade de nitrogênio para manutenção e metionina+cistina (M+C) para gatos em crescimento, dos 150 aos 240 dias de idade. Os animais foram avaliados em três ensaios de balanço de nitrogênio, aos 150, 195 e 240 dias de idade, utilizando o método de regressão exponencial de Göttingen. Foram utilizados trinta e seis gatos com idade inicial de 150 dias, distribuídos em blocos casualizados em seis tratamentos e seis repetições cada. Os tratamentos consistiam de níveis M+C variando de 0,65 a 1,60%. A relação dos aminoácidos com a lisina foi mantida constante em todos os tratamentos, de acordo com o preconizado pelo NRC (2006), exceto os aminoácidos teste, os quais estavam relativamente deficientes. Para manter a relação dos aminoácidos idêntica entre os tratamentos, empregou-se a técnica da diluição para formulação das dietas. Os gatos foram alojados em gaiolas de metabolismo durante cinco dias de adaptação e seis dias de coleta total de fezes e urina separadamente. Foi aplicado modelo exponencial para determinar o máximo teórico de retenção de nitrogênio diário ($NR_{max}T$) e o nitrogênio para manutenção (NMR). Considerou-se 55% do $NR_{max}T$ para o cálculo da deposição de proteína, eficiência de utilização da M+C e, conseqüentemente, para a exigência de M+C. Foram estimados 591; 517 e 457 mg/kg^{0,67}/dia para nitrogênio de manutenção e a exigência de M+C foi de 581, 510, 318 mg/kg^{0,67}/dia da dieta respectivamente aos 150, 195 e 240 dias de idade. Os valores encontrados para exigência de M+C, para as duas primeiras idades são mais altos do que os recomendados pelo NRC para gatos em crescimento.

Palavras-chave: deposição proteica, felinos, Göttingen, metionina, proteína, técnica da diluição.

ABSTRACT: The aim of the study was to estimate the requirements of nitrogen and methionine plus cystine (M+C) for kittens aged 150- 240 days old. The animals were evaluated in three nitrogen balance trials at 150, 195 and 240 days old, using the exponential regression of Göttingen method. Thirty six cats were used with initial age of 150 days and distributed in a randomized block design in six treatments and six replications. The treatments consisted of M+C levels ranging from 0.65 to 1.60%. The ratio of amino acids to lysine was maintained constant in all treatments, as recommended by NRC (2006), except the test amino acids, which were relatively deficient. To maintain the identical amino acid ratio between the treatments, the dilution technique was applied to formulate the diets. Cats were housed in metabolism cages for five days of adaptation and six days of total collection of feces and urine separately. An exponential model was applied to determine the theoretical maximum of daily nitrogen retention ($NR_{max}T$) and nitrogen for maintenance (NMR). It was considered 55% of $NR_{max}T$ for protein deposition calculated, efficiency of utilization M+C and consequently of the M+C requirement. It was estimated 591; 517 and 457 mg / $BW_{kg}^{0.67}$ /day for maintenance nitrogen and the M+C requirement was 581, 510, 318 mg / $BW_{kg}^{0.67}$ /day of the diet respectively at 150, 195 and 240 days old. The values found for M+C requirement for the first two ages are higher than those recommended by the NRC for kittens.

Key words: protein deposition, felines, Göttingen, methionine, protein, dilution technique.

INTRODUÇÃO

Estudos na área de exigências para animais de companhia são necessários, visto que existem muitas lacunas sobre tal assunto. No entanto, a dificuldade neste campo de pesquisa está relacionada às técnicas adotadas, as quais geralmente são invasivas e dificultam a sua aplicação em espécies, nas quais se objetiva apenas a saúde e qualidade de vida, como cães e gatos, semelhante ao que ocorre com seres humanos.

A determinação das necessidades fisiológicas de nitrogênio para manutenção em cada fase da vida é importante, pois define a concentração mínima necessária para repor as perdas do organismo. Porém, há certa dificuldade na escolha da técnica, devido às limitações metodológicas. Os métodos com modelagem matemática são uma alternativa para estimar exigências. Através da regressão, extrapola-se a ingestão de nitrogênio para zero, e estima-se as necessidades de manutenção (Liebert et al., 2000), não restringindo nutrientes aos animais a níveis críticos.

O método de Göttingen utiliza a regressão exponencial com a modelagem de exigências aminoacídicas. Por este método, a partir do uso de dados de ensaio de balanço de nitrogênio, calcula-se a necessidade de nitrogênio para manutenção, a deposição de proteína e a necessidade do aminoácido teste. Este método já foi utilizado para estimar exigências de aminoácidos para vários animais de produção (Bonato et al., 2015; Samadi e Liebert, 2006; Thong e Liebert, 2004), porém ainda não foi aplicado para animais de companhia.

Para cães e gatos, ainda existe uma lacuna na literatura científica sobre as necessidades de aminoácidos e suas relações na dieta. A metionina é o primeiro aminoácido limitante para gatos (NRC, 2006), e geralmente é restrita nos ingredientes convencionais, sendo necessária sua suplementação na dieta.

Tendo isto em vista, neste estudo utilizou-se o método de Göttingen para estimar as necessidades de nitrogênio e aminoácidos sulfurados totais, para gatos em crescimento, dos 150-240 dias de idade.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais e instalações

O experimento foi conduzido no Laboratório de estudos nutricionais em felinos domésticos, localizado na Fazenda Experimental de Iguatemi, pertencente à Universidade Estadual de Maringá (FEI/UEM). Todos os procedimentos experimentais foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Instituição, sob o número de protocolo 2339130214/2014.

Trinta e seis gatos em crescimento, com idade de 150 dias foram empregados no estudo. Todos os animais foram vacinados, vermifugados e livres de ectoparasitos. Anteriormente ao início do estudo, os animais receberam dieta comercial, para gatos em crescimento com 82 g/1000kcal de PB. Os animais que não estavam nas gaiolas metabólicas, para a coleta de fezes e urina, eram alojados coletivamente em uma área de 49m² (24m² de área coberta e 25m² de área de solário), com água disponível ad libitum. No período de 8:00 às 10:00 e 14:00 às 16:00, ficavam em gaiolas para alimentação individualizada. Os animais em fase de coleta de fezes e urina eram mantidos em gaiolas metabólicas individuais de aço inoxidável, com fundo de vidro (1,0m x 0,5m x 0,5m), durante 5 dias de adaptação e 6 dias de coleta, com alimentação e água disponíveis durante todo este período. A quantidade de alimento foi calculada individualmente, visando atender às exigências energéticas para gatos em crescimento, segundo o National Research Council – Nutrient Requirements of Dogs and Cats (NRC, 2006). O estudo foi realizado por um período de 90 dias, dos 150-240 dias de idade.

Delineamento experimental

Os gatos foram distribuídos entre seis tratamentos, quando atingiam os 150 dias de idade e foram separados conforme ninhada e peso entre os tratamentos. Desta forma, o estudo seguiu um delineamento em blocos casualizados. Os tratamentos eram compostos por seis dietas isoenergéticas, formuladas segundo o método da diluição, descrito a seguir. Cinco das dietas (N1, N2, N3, N4 e N5) eram relativamente deficientes em metionina+cistina (M+C), com o objetivo de se determinar as exigências destes aminoácidos. Uma sexta dieta, chamada de contra-prova foi formulada, para confirmar as respostas experimentais, em função da deficiência relativa de M+C. Cada dieta foi fornecida para seis gatos durante o experimento, totalizando 36 animais (N=36).

Dietas e distribuição dos tratamentos

Para a formulação das dietas, foi adotada a técnica da diluição (Fisher e Morris, 1970). Esta técnica consiste na diluição sequencial de uma dieta com alto teor de proteína (N5), mas com deficiência relativa do aminoácido teste, por uma dieta isenta de nitrogênio. As dietas foram isoenergéticas e as concentrações de minerais e vitaminas mantidas semelhantes. A relação dos aminoácidos com a lisina foi considerada de acordo com os níveis estabelecidos pelo NRC (2006), tomando-se como referência o nível de lisina, exceto para M+C, as quais estavam relativamente deficientes em relação à lisina. Para o preparo das demais dietas do experimento, a dieta (N5) foi sequencialmente diluída com a dieta isenta de nitrogênio, respectivamente nas seguintes proporções: 0,60:0,40; 0,55:0,45; 0,30:0,70; 0,15:0,85 e 0,0:1,00. A relação dos aminoácidos com a lisina (aa:lis) foi mantido em: Arginina (1,08), Fenilalanina+tirosina (1,46), Fenilalanina (0,83), Histidina (0,38), Isoleucina (0,68), Leucina (1,72), Metionina+cistina (0,61), Metionina (0,46), Taurina (0,74), Triptofano (0,18) e Valina (0,81). Na Tabela 1 está apresentada a formulação das dietas experimentais, na sequência a Tabela 2 com aminoácidos totais analisados dos principais ingredientes das dietas que foram utilizados na formulação e na Tabela 3 o aminograma da dieta N5 com o previsto e analisado, assim como a relação aminoácido: lisina (aa:lis).

Tabela 1. Composição das dietas experimentais¹

Ingredientes	Diluição						
	1,00	0,60	0,45	0,30	0,15	0,00	0,60
Isenta de proteína	1,00	0,60	0,45	0,30	0,15	0,00	0,60
Alta proteína (N5)	0,00	0,40	0,55	0,70	0,85	1,00	0,40
Ingredientes	Isenta⁵	N1	N2	N3	N4	N5	Contra prova⁶
Amido de milho	66,39	39,83	29,88	19,92	9,96	-	39,83
Quirera de arroz	-	6,57	9,03	11,49	13,96	16,42	6,54
Farinha de vísceras de aves	-	14,00	19,25	24,50	29,75	35,00	13,93
Gordura de aves	17,03	12,18	10,36	8,54	6,72	4,90	12,17
Farelo glúten de milho 60%	-	8,33	11,46	14,58	17,71	20,83	8,29
Concentrado proteico soja	-	6,22	8,55	10,89	13,22	15,55	6,19
Palatabilizante	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Fosfato bicálcico	6,65	4,07	3,10	2,13	1,16	0,19	4,07
Fibra de cana	4,44	3,40	3,01	2,62	2,23	1,84	3,40
Cloreto de potássio	0,88	0,53	0,39	0,26	0,13	-	0,53
Sal	1,51	1,21	1,10	0,99	0,88	0,77	1,21
Cloreto de colina	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43	0,42
L-Lisina HCL	-	0,24	0,33	0,42	0,51	0,60	0,24
DL-Metionina	-	0,08	0,11	0,14	0,17	0,20	0,28
Premix para gatos ²	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
L-Arginina	-	0,10	0,14	0,18	0,21	0,25	0,10
L-Treonina	-	0,10	0,14	0,18	0,21	0,25	0,10
Antifúngico ³	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
L-Triptofano	-	0,04	0,06	0,07	0,09	0,10	0,04
Taurina	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
Antioxidante sintético ⁴	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Total	100,00	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99
Composição nutricional (Matéria seca)							
Matéria seca, %	90,47	90,81	90,94	91,07	91,19	91,32	90,63
Proteína bruta, %	0,63	21,02	28,97	35,06	42,93	49,71	21,91
Extrato etéreo, %	18,79	15,74	14,6	13,46	12,31	11,17	15,72
Fibra bruta, %	2,21	2,20	2,20	2,20	2,19	2,19	2,20
Matéria mineral, %	10,32	9,77	9,56	9,35	9,14	8,94	9,75
EM, kJ/g MS	16,82	16,81	16,80	16,79	16,78	16,78	16,77

¹N1= 6,5g/kg M+C; N2= 8,8g/kg M+C; N3= 11,3g/kg M+C; N4= 13,6g/kg M+C; N5= 16,0g/kg M+C
²Adição por quilograma de produto: Ferro 100 mg, Cobre 10 mg, Manganês 10 mg, Zinco 150 mg, Iodo 2 mg, Selênio 0,3 mg, Vitamina A 18000 UI, Vit. D 1200 UI, Vit. E 200 UI, Tiamina 6 mg, Riboflavina 10 mg, Ácido pantotênico 40 mg, Niacina 60 mg, Piroxidina 6 mg, Ácido fólico 0,30 mg, Vit. B12 0,1 mg.
³Mold Zap Aquativa, Alltech Brasil Agroindustrial Ltda: propionato de amônio, propanodiol, ácido propiônico, ácido acético, ácido láctico, ácido ascórbico, ácido fórmico, sorbato de potássio, veículo q.s.p.
⁴Banox, Alltech Brasil Agroindustrial Ltda: BHA, BHT, galato de propila e carbonato de cálcio
⁵Esta dieta foi apenas usada na técnica de formulação, mas não foi fornecida aos animais como tratamento, por ser deficiente em proteína.
⁶Esta dieta apresenta a mesma composição da dieta N1, porém, com as correções nos níveis de M+C, conseguidos pela adição de aminoácidos industriais. Adição de 0,20%DL-Metionina

Tabela 2. Aminoácidos totais analisados (%) dos principais ingredientes das dietas

Aminoácidos totais	Farinha Vísceras frango	Quirera arroz	Concentrado proteico de soja
Lisina	3,631	0,289	3,384
Treonina	2,267	0,279	2,308
Metionina	1,124	0,206	0,747
Cistina	0,499	0,139	0,621
M+C	1,624	0,345	1,368
Alanina	3,962	0,418	2,437
Arginina	3,950	0,575	3,820
Ácido aspártico	4,686	0,670	6,209
Ácido glutâmico	7,246	1,251	9,733
Glicina	6,517	0,312	2,371
Histidina	1,212	0,170	1,341
Isoleucina	2,109	0,304	2,513
Leucina	3,934	0,610	4,278
Fenilalanina	2,318	0,392	2,925
Serina	2,340	0,387	2,912
Tirosina	1,688	0,318	2,161
Valina	2,640	0,453	2,701
Prolina	-	-	-
Triptofano	0,533	0,108	0,725

Tabela 3. Composição dos aminoácidos totais (aa) previstos e analisados na matéria seca (MS) e a relação aminoácido:lisina (aa:lis) para a dieta N5

aa	aa totais (%)			aa:lis		
	previsto	analisado MS	analisado	previsto	analisado MS	desvio
Arginina	2,89	2,98	2,81	1,08	1,12	3,41
Fenilalanina+ tirosina	3,91	4,10	3,87	1,46	1,54	5,26
Fenilalanina	2,22	2,31	2,18	0,83	0,87	4,43
Histidina	1,02	0,96	0,91	0,38	0,36	-5,12
Isoleucina	1,83	1,83	1,73	0,68	0,69	0,54
Leucina	4,61	4,70	4,44	1,72	1,76	2,43
Lisina	2,68	2,67	2,52	1,00	1,00	0,00
M+C	1,60	1,62	1,53	0,60	0,61	1,70
Metionina	1,23	1,07	1,01	0,46	0,40	-12,33
Treonina	1,98	2,03	1,92	0,74	0,76	3,13
Triptofano	0,49	0,48	0,45	0,18	0,18	-2,33
Valina	2,17	2,15	2,03	0,81	0,81	-0,51
MS	100,00	100,00	94,40			
PB	49,00	48,05	45,36			

Para aproximar os resultados do experimento da realidade, as dietas foram formuladas com ingredientes comumente usados em dietas comerciais para gatos, como o glúten de milho, a farinha de vísceras de frango, o concentrado proteico de soja, o óleo de frango e a quirera de arroz. Por esta razão a dieta N1 apresentou uma quantidade mínima de PB e não foi isenta de nitrogênio.

As dietas foram processadas na unidade de extrusão da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista (FCAV-UNESP), Brasil. Após a mistura dos ingredientes das dietas isenta e N5, as mesmas foram moídas em moinho de martelos (Sistema Tigre de Mistura e Moagem, Tigre, São Paulo) equipado com peneiras com furos de 0,8 mm. Após a moagem das duas dietas, procedeu-se à diluição das mesmas na proporção descrita anteriormente para compor as 6 dietas experimentais (N1-N5) e o tratamento contra prova, e então procedeu-se à mistura. Em seguida, cada dieta foi extrusada em extrusora de rosca simples (MEX 250, Manzoni, Campinas, Brasil), com capacidade de processamento de 250 kg/hora. Após extrusão, as dietas foram secas em secador horizontal de dupla esteira pelo período de 20 minutos a 105°C e, posteriormente, recobertos com óleo de frango e palatabilizante, após resfriamento. A adição de água e vapor, a velocidade da rosca e a alimentação da extrusora foram ajustadas de acordo com a formulação da dieta, visando manter a densidade dos extrusados semelhantes entre os tratamentos.

Ensaio de balanço de nitrogênio e energia metabolizável

Os ensaios de balanço de nitrogênio foram determinados em três momentos no estudo: aos 150, 195 e 240 dias de idade. A energia metabolizável das dietas foi determinada a partir do material coletado no último ensaio, aos 240 dias de idade.

Para acompanhar o crescimento dos animais e corrigir a quantidade de alimento ofertada, os gatos eram pesados a cada 15 dias em balança digital, individualmente, sempre no mesmo horário (8:00-9:00h), para correção das quantidades de ração fornecida. A quantidade de alimento fornecida foi corrigida quinzenalmente, a partir da determinação das necessidades energéticas, para gatos em crescimento e estimativa da energia metabolizável das dietas, ambas equações preconizadas pelo NRC (2006).

O ensaio de digestibilidade seguiu o protocolo de coleta total de fezes e urina, de acordo com (AAFCO, 2011), sendo o período de adaptação à dieta de 5 dias,

seguido de 6 dias de coleta total de fezes e urina. O alimento foi oferecido as 8:00 h e ficou disponível até o dia seguinte, quando as sobras foram recolhidas quantitativamente e pesadas, registrando-se o consumo. A água foi oferecida à vontade. As fezes foram coletadas integralmente duas vezes ao dia, as 08:00h e 16:00h, pesadas e acondicionadas em sacos plásticos individuais, previamente identificados, fechados e armazenados em freezer (-15°C) para posterior análise. A urina foi coletada duas vezes ao dia, em recipientes plásticos colocados sob o funil coletor da gaiola, contendo 1 ml de ácido clorídrico 1N, para evitar perdas de nitrogênio e proliferação de bactérias. Logo após a coleta, foi mensurado o volume urinário produzido, sendo estas, então, armazenadas em garrafas plásticas identificadas e mantidas em freezer (-15°C) até realização das análises laboratoriais.

Ao final do período de cada coleta, as fezes e a urina de cada animal foram descongeladas e homogeneizadas, confeccionando uma amostra por animal. As fezes foram secas em estufa de ventilação forçada, a 55°C por 72h (320-SE, FANEM, São Paulo, Brasil). A urina foi colocada (cerca de 10 ml) em cadinhos de celulose e mantidas em estufa de ventilação forçada (320-SE, FANEM, São Paulo, Brasil) a 55°C, durante 72 horas, para redução do volume e posterior determinação da energia bruta (EB). Fezes pré-secas e rações foram então moídas em moinho de bola (MOD 340, ART LAB, São Paulo) para as análises laboratoriais. Foram analisadas a matéria seca e nitrogênio, de acordo com (AOAC, 1995). A Energia Bruta foi determinada em bomba calorimétrica (6200, PARR Instruments, EUA) nas fezes, urina e rações. Todas as análises laboratoriais foram conduzidas em duplicata, sendo repetida quando variaram mais de 5%.

Cálculos para a estimativa das necessidades de nitrogênio de manutenção e necessidades de M+C

Para a estimativa das necessidades de nitrogênio para manutenção, considera-se que o animal em estado de jejum continua excretando (perda endógena) nitrogênio. Assim, procedeu-se uma regressão exponencial entre a ingestão de nitrogênio (NI, mg/PV_{kg}^{0,67}/dia) e o total excretado de nitrogênio (NEX, mg/PV_{kg}^{0,67}). No eixo Y tem-se o NEX e no eixo X o NI, o intercepto no eixo Y para NI=0 é a quantidade de nitrogênio que deve ser ingerida, para compensar as perdas endógenas. O NI e NEX foram obtidos pelo ensaio de balanço de nitrogênio descrito anteriormente, a partir da

ingestão crescente de nitrogênio proporcionada pelas dietas N1 a N5. Este método utiliza variáveis comuns do método dose-resposta e permite o fracionamento das exigências em manutenção e crescimento/deposição, por meio de um fatorial. Desta forma, a partir da estimativa do nitrogênio depositado, foi possível estimar as necessidades proteicas para crescimento.

Para determinar a exigência de M+C, é realizado uma segunda regressão entre as variáveis NI e nitrogênio depositado (ND), sendo ND o próprio balanço de nitrogênio (BN)

$$BN = NI - NEX \quad (1)$$

Onde:

NEX = Nitrogênio das fezes e urina.

As funções matemáticas que descrevem o perfil da retenção e deposição de nitrogênio foram representadas por equações, segundo Liebert et al., (2000).

$$NR = NR_{\max}T (1 - e^{-b \times NI}) \quad (2)$$

$$ND = NR_{\max}T (1 - e^{-b \times NI}) - NMR \quad (3)$$

Onde:

NR = Nitrogênio retido;

$NR_{\max}T$ = retenção máxima teórica dependente do genótipo do animal;

e = número base do logaritmo natural (ln);

b = inclinação da curva de retenção do nitrogênio que indica a qualidade proteica do alimento e independe da ingestão de nitrogênio;

NMR= exigência de nitrogênio para manutenção

O máximo potencial teórico de retenção de proteína ($NR_{\max}T$) é calculado a partir de $ND = NR_{\max}T (1 - e^{-b \times NI}) - NMR$. Este valor teórico indica que o valor estimado ($ND_{\max}T$ e $NR_{\max}T$) não é real, mas é uma estimativa do potencial genético, o qual não é atingido com fatores dietéticos. Samadi e Liebert (2006) preconizam que este valor teórico, não pode ser totalmente considerado para otimizar as respostas, mas que é possível considerar percentagens geralmente entre 50-80% desses valores teóricos.

A partir dos parâmetros $NR_{\max}T$, NMR e b obtidos pelas regressões exponenciais e c determinado pela concentração de M+C, é possível calcular a ingestão do aminoácido limitante pela fórmula (LAAI), conforme descrito pela Eq. (4):

$$LAAI = [\ln NR_{\max} T - \ln (NR_{\max} T - NR)] / 16bc^{-1} \quad (4)$$

$$b = \ln NR_{\max} T - \ln (NR_{\max} T - NR) / NI \quad (4)$$

Onde LAAI = ingestão diária do aminoácido limitante

bc^{-1} = inclinação entre a concentração de M+C (c) e qualidade da proteína alimentar (b).

A exigência do aminoácido foi modelada para deposição de proteína e eficiência de utilização do aminoácido. Neste estudo, foi adotado o valor de 55 % do potencial máximo teórico de deposição diária de nitrogênio ($ND_{\max} T$).

Análise estatística

Os dados foram analisados por meio do procedimento PROC NLIN para ajuste de modelos não lineares. O método para ajustar o conjunto de dados, foi o algoritmo de Levenberg-Marquardt, que tinha o objetivo de obter a soma dos quadrados das distâncias entre o modelo e cada um dos pontos, de tal modo que essa distância fosse a menor possível, através do programa estatístico SAS, versão 9.1.

RESULTADOS

As médias do balanço de nitrogênio, para cada idade avaliada encontram-se na Tabela 4. O peso médio dos animais aumentou significativamente durante o experimento, sendo verificado efeito de tratamento ($p < 0,001$).

Tabela 4. Dados sumarizados utilizados para determinação dos parâmetros do modelo dos gatos aos 150, 195 e 240 dias de idade

<i>Variáveis</i>	M+C, g/kg					Contra prova
	N1⁴	N2	N3	N4	N5	
	6,5	8,8	11,3	13,6	16	
<i>150 dias</i>						
Peso médio, kg	2,22	2,22	2,32	2,12	2,18	2,34
Ingestão de MS, g/d	70	83	79	71	80	73
NI, mg/PV_{kg}^{0,67}/d¹	1455	2263	2564	2991	3789	1470
NEX, mg/PV_{kg}^{0,67}/d²	742	1250	1528	1899	2369	835
ND, mg/PV_{kg}^{0,67}/d³	713	1013	1036	1091	1420	635
NR, mg/PV_{kg}^{0,67}/d	1324	1653	1703	1755	2118	1230
Ingestão de EM, kcal/PV_{kg}^{0,67}/d	165	179	176	165	195	160
<i>195 dias</i>						
Peso médio, kg	2,50	2,87	2,85	2,66	2,63	2,72
Ingestão de MS, g/d	73	101	89	89	95	82
NI, mg/PV_{kg}^{0,67}/d¹	1337	2383	2577	3283	4079	1506
NEX, mg/PV_{kg}^{0,67}/d²	769	1254	1384	1900	2371	785
ND, mg/PV_{kg}^{0,67}/d³	568	1130	1193	1382	1708	721
NR, mg/PV_{kg}^{0,67}/d	1127	1689	1752	1941	2267	1280
Ingestão de EM, kcal/PV_{kg}^{0,67}/d	149	183	172	177	203	160
<i>240 dias</i>						
Peso médio, kg	2,67	3,23	3,2	2,99	2,94	2,96
Ingestão de MS, g/d	69	97	86	92	91	83
NI, mg/PV_{kg}^{0,67}/d¹	1218	2052	2288	3099	3556	1404
NEX, mg/PV_{kg}^{0,67}/d²	692	1173	1428	2150	2401	838
ND, mg/PV_{kg}^{0,67}/d³	526	879	860	948	1154	565
NR, mg/PV_{kg}^{0,67}/d	981	1334	1351	1403	1609	1021
Ingestão de EM, kcal/PV_{kg}^{0,67}/d	138	162	155	170	181	152

¹NI: Nitrogênio ingerido; ²NEX: Nitrogênio excretado; ³ND: Nitrogênio depositado

⁴N1= 6,5g/kg M+C; N2= 8,8g/kg M+C; N3= 11,3g/kg M+C; N4= 13,6g/kg M+C; N5= 16,0g/kg M+C.

O balanço de nitrogênio (ND) apresentou em geral respostas crescentes, influenciadas pelo fornecimento de proteína bruta nas dietas, as quais variaram de 210

g/kg à 490g/kg na MS (Tabela 4).O aumento do nitrogênio excretado (NEX, mg/PV_{kg}^{0,67}) acompanhou o aumento da ingestão de nitrogênio (NI, mg/PV_{kg}^{0,67}) pelos animais dentro de cada idade avaliada.

Tabela 5. Estimativa de nitrogênio para manutenção (NMR), máximo teórico de deposição de nitrogênio diário (ND_{max}T) máximo teórico de retenção de nitrogênio diário (NR_{max}T) de acordo com a idade, conforme calculado pelos modelos

Idade, dias		NMR, mg/PV _{kg} ^{0,67} /d ¹	ND _{max} T, mg/PV _{kg} ^{0,67} /d ²	NR _{max} T, mg/PV _{kg} ^{0,67} /d ³
150	591	2366	2957	
195	517	2215	2733	
240	457	1272	1729	

¹Nitrogênio de manutenção (NMR), ²Máximo teórico de deposição de nitrogênio diário, ³Máximo teórico de retenção de nitrogênio diário

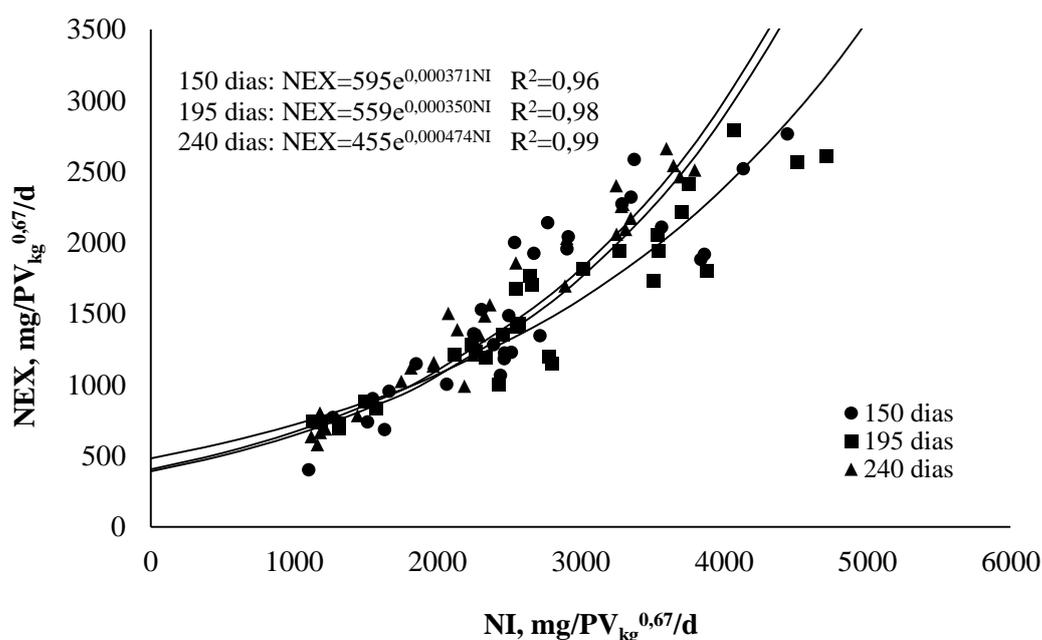


Figura 1. Estimativa das exigências de nitrogênio para manutenção (NMR) ajustado a partir uma função exponencial entre ingestão nitrogênio (NI) e excreção de nitrogênio (NEX) para gatos em crescimento em diferentes idades 150, 195 e 240 dias.

Os parâmetros NI, NEX e ND são necessários para estimar as necessidades diárias para manutenção (NMR, mg/PV_{kg}^{0,67}), a qual corresponde às perdas endógenas de nitrogênio quando se extrapola a ingestão para zero (Fig. 1). À medida que os gatos cresceram, a NMR, mg/PV_{kg}^{0,67}/d foi reduzida (Tabela 5).

O máximo teórico de retenção de nitrogênio diário ($NR_{\max T}$, $\text{mg/PV}_{\text{kg}}^{0,67}/\text{d}$) e de deposição de nitrogênio diário ($ND_{\max T}$, $\text{mg/PV}_{\text{kg}}^{0,67}/\text{d}$) foram estimados para as três idades, respectivamente (Tabela 5 e Fig. 2).

O $ND_{\max T}$, $\text{mg/PV}_{\text{kg}}^{0,67}/\text{d}$ e $NR_{\max T}$, $\text{mg/PV}_{\text{kg}}^{0,67}/\text{d}$ elevaram-se no segundo balanço de nitrogênio e voltaram a reduzir na idade de 240 dias (Fig. 2).

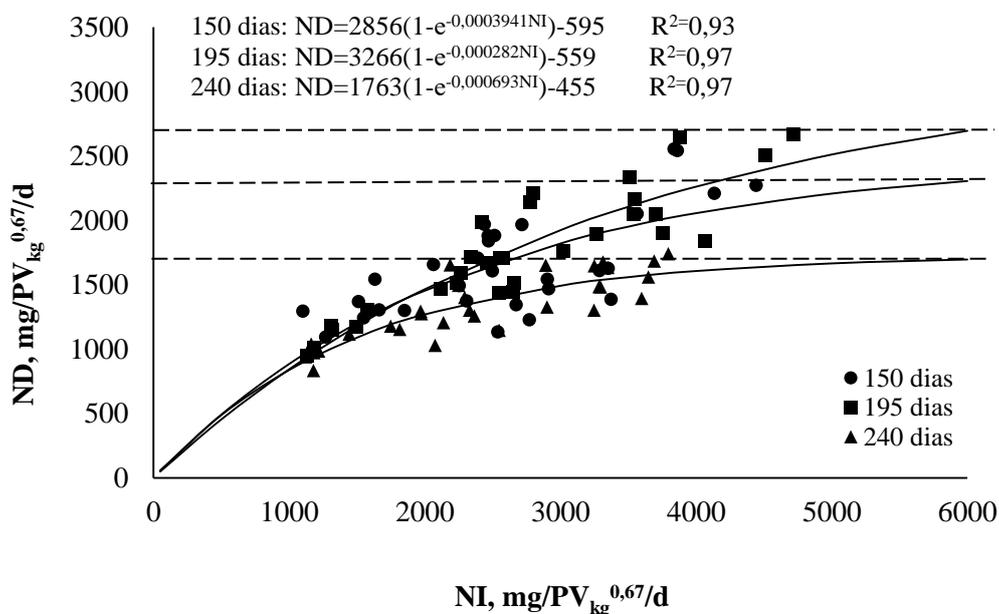


Figura 2. Estimativa do máximo potencial teórico de deposição de nitrogênio ajustado a partir uma função exponencial entre ingestão de nitrogênio e nitrogênio depositado, para gatos em crescimento em diferentes de idades, 150, 195 e 240 dias

A função exponencial entre NI e ND fornece os valores de $ND_{\max T}$ e consequentemente de $NR_{\max T}$, considerando que $ND=NR-NMR$.

Para o cálculo da necessidade M+C, é necessário determinar o valor de b (valor biológico da proteína) e a eficiência de utilização do aminoácido limitante (bc^{-1}). Os cálculos para necessidade do aminoácido limitante basearam-se em 55% do $NR_{\max T}$, sendo o valor que mais se aproximou do valor real calculado para deposição de proteína nos gatos deste estudo. Para constatar que não houve diferença entre o NR dos tratamentos N2, N3 e N4, foi realizado teste de Tukey entre os todos os tratamentos.

Tabela 6. Cálculo das necessidades de metionina+cistina (M+C), dependendo da deposição de proteína (DP) e eficiência de utilização de M+C, b (10^{-6}) valor para qualidade da proteína para gatos em crescimento aos 150, 195 e 240 dias de idade

	Idade (dias)		
	150	195	240
DP (g/dia)	8,13	7,61	4,37
(bc⁻¹)*	130	93	228
b (10^{-6})	394	282	693
M+C (mg/PV_{kg}^{0,67}/d)	580,91	510,21	318,37
M+C (g/d)	810,05	779,96	527,66

*eficiência de utilização de M+C

Para se chegar a este percentual, calculou-se a média do NR entre os tratamentos N2 (PB=289,7g/kg; M+C=8,8g/kg), N3 (PB=350,3g/kg; M+C=11,3g/kg) e N4 (PB=429,3g/kg; M+C=13,6g/kg), os quais não diferiram em função da elevação do nível de PB e M+C em todos os períodos experimentais, refletindo uma limitação dos animais em responder a partir deste ponto à inclusão destes nutrientes. Desta forma, chegou-se a LAAI de M+C em cada fase, respectivamente, de 581, 510 e 318 mg/PV_{kg}^{0,67}/d.

DISCUSSÃO

O método de Göttingen se mostrou uma alternativa viável para estudo de exigência para animais de companhia, assim como os trabalhos com monogástricos como: aves de postura e corte, suínos e peixes (Liebert e Benkendorff, 2007; Pastor et al., 2013; Wecke e Liebert, 2009). Este método é de fácil execução, por utilizar um ensaio de BN e não ser invasivo, e ser baseado na mensuração de nitrogênio da dieta, fezes e urina. Apesar de ser um ensaio dose resposta, é também considerado um fatorial, pois estima-se a necessidade de manutenção por extrapolação matemática. Os resultados encontrados no presente estudo apresentaram bom ajuste ao modelo exponencial, proposto pelo próprio método. Apesar dos animais não terem uma padronização da raça, como ocorre com aves e suínos.

A escolha de um melhor método, que consiga conciliar a parte matemática com os fenômenos biológicos, tem sido alvo de muitos estudos, na área de exigências nutricionais em animais, assim o próprio balanço de nitrogênio é muito criticado.

Existem diversos métodos que são capazes de estimar exigências nutricionais, como abate comparativo, balanço de nitrogênio e oxidação de aminoácidos. No entanto, a maior dificuldade na comparação dos resultados entre estudos nutricionais de cães e gatos é o pequeno volume de publicações e ao mesmo tempo a grande variação nas metodologias empregadas.

O método de Göttingen utiliza modelo exponencial, que é capaz de verificar pequenos acréscimos de aminoácidos na dieta nas respostas. Este método empregado aplica o BN como base para os cálculos. A técnica do balanço de nitrogênio apresenta várias limitações (Rand e Young, 1999). As estimativas do balanço de nitrogênio são altamente dependentes das perdas não mensuráveis, como a quantidade assumida para a perda em secreções, pelos, suor (quando presente), podendo subestimar esses valores. Existe uma dificuldade em avaliar a perda de gás nitrogênio, após desnitrificação pela microbiota do cólon e perdas de nitrogênio através da pele (uréia) e ar expirado (amoníaco), comprometendo a acurácia do balanço de nitrogênio. Além disso, o método geralmente usado para quantificar nitrogênio, o método de Kjeldahl, não consegue detectar o teor de nitrato nos alimentos e na urina (Tomé e Bos, 2000). Apesar das críticas a esta metodologia, frente à escassez de dados disponíveis na literatura, mesmo que por outros métodos mais avançados.

Os dados de necessidades de aminoácidos e proteína existentes para animais de companhia são de pesquisas, que geralmente foram conduzidas, utilizando-se dietas purificadas ou semipurificadas. Esse tipo de dieta tende a subestimar as necessidades nutricionais reais de gatos, pois utiliza ingredientes de mais alta digestão e absorção, quando comparadas às dietas convencionais extrusadas, as quais são formuladas com co-produtos e subprodutos de origem animal e vegetal menos digeríveis.

Os alimentos atualmente fornecidos para gatos são em sua maior parte, processados por extrusão. Na formulação de dietas para animais de companhia, utilizam-se principalmente milho ou arroz como fontes de amido, farinha de vísceras de frango ou farinha de carne como fontes proteicas (origem animal), glúten de milho e farelo de soja (origem vegetal) e gordura de aves e de peixe como fontes de lipídeos. Desta forma, no presente estudo utilizou-se ingredientes comuns em rações comerciais, aproximando os dados da realidade dos produtos convencionais.

As dietas neste estudo foram formuladas de acordo com a relação dos aminoácidos totais preconizada pelo NRC (2006) para gatos em crescimento, uma vez que nesta espécie não se trabalha com aminoácidos digestíveis.

Apesar do NRC (2006) apresentar uma tabela completa de recomendações nutricionais (“recommended allowances”) e exigências nutricionais mínimas (“minimal requirement”) para todos os aminoácidos essenciais, muitas pesquisas ainda são necessárias para se atingir com maior exatidão as recomendações nutricionais, as quais ainda são relativamente empíricas, baseadas em estimativas a partir da exigência mínima (25% acima do mínimo determinado experimentalmente), visando atender às exigências mínimas, mesmo com a utilização de dietas com menor digestibilidade.

Neste experimento, o teor de PB das dietas variou de valores próximos a 200g/kg até 500g/kg na MS. O objetivo ao elaborar-se tais dietas, foi verificar se o incremento nos níveis de PB e aminoácidos essenciais, além dos preconizados pelo NRC possuem benefícios perceptíveis ao crescimento dos gatos e condições de saúde. Por este motivo, não foi utilizada nenhuma dieta com níveis nutricionais abaixo da exigência mínima descrita pelo NRC (2006), para gatos em crescimento. Após 45 dias de alimentação, foi possível verificar o efeito das dietas, no ganho de peso dos animais. O ganho de peso dos animais de N1 foi reduzido em relação aos demais tratamentos. No entanto, a análise destes dados deve ser cautelosa, pois neste tratamento, houve redução na ingestão de alimentos pelos animais. Este fato pode estar ligado à palatabilidade da dieta em relação às demais. A partir do segundo nível de PB (270 g/kg) e M+C (8,8 g/kg), o ganho de peso dos animais foi semelhante entre os tratamentos ($p > 0,05$). Este achado sugere que as recomendações nutricionais mínimas, para aminoácidos pelo NRC (2006) são suficientes para o crescimento de gatos, mediante o uso de dietas extrusadas com ingredientes convencionais. Porém, ainda são incertos os níveis para otimizar as condições de saúde.

As necessidades de nitrogênio de manutenção (NMR), para as três idades avaliadas, por esta metodologia, representam as perdas endógenas, ou seja, a quantidade que deve ser ingerida de nitrogênio, para compensar as perdas endógenas (Bonato et al., 2015).

Existem algumas técnicas utilizadas para estimar perdas endógenas, como por exemplo: o fornecimento de uma dieta livre de proteína; animais em jejum; técnica da caseína hidrolisada e também pela adição de aminoácidos cristalinos a uma dieta livre de caseína (Sakomura e Rostagno, 2007). Trabalho realizado por Hendriks et al.

(1996), utilizando gatos e comparando a ingestão de uma dieta livre de nitrogênio e uma dieta contendo caseína hidrolisada, verificou-se que as estimativas das perdas endógenas de nitrogênio diferem por estes dois métodos, sendo maiores com o uso da caseína hidrolisada.

Os primeiros estudos para determinar necessidade de nitrogênio para gatos em crescimento (Dickinson e Scott, 1956; Miller e Allison, 1958), utilizaram a caseína como o principal ingrediente e uma mistura de peixe e fígado como fonte de proteína. Foram encontrados valores entre 4,0 e 5,6 % de N (NRC, 2006). Estudos posteriores envolveram o método dose-resposta, com níveis crescentes de proteína, utilizando o crescimento como principal variável. Estudo realizado por Greaves e Scott (1960) utilizando o balanço de nitrogênio com quatro gatos adultos, determinaram que 21% de PB ou 3,36% de N, seria suficiente para manter o balanço de nitrogênio igual a zero. Estes autores utilizaram alimento úmido à base de peixe e fígado e os resultados foram muito superiores ao encontrado no presente estudo. No presente estudo, os gatos em crescimento apresentaram necessidade de PB para repor as perdas endógenas de 8,26%, 7,81% e 6,84% respectivamente aos 150, 195 e 240 dias de idade, considerando uma dieta de 16 kJ/g. Esta redução gradual pode estar relacionada ao menor turnover proteico, que ocorre nos animais, à medida que se aproximam da maturidade.

Considerando que o ND neste estudo foi estimado em 55% do ND_{maxT} , estimou-se necessidade de PB dos gatos aos 150, 195 e 240 dias, respectivamente, de 274g/kg; 287g/kg e 183g/kg. Os dados das fases 150 e 195 dias são próximos do recomendado pelo NRC (2006) para gatos em crescimento, de 240g/kg. Por outro lado, estes dados encontrados no período 240 dias de idade, foram muito abaixo dos demais. Possíveis razões para isto são a limitação da técnica do BN, a qual pode proporcionar adaptação metabólica da utilização do N, quando os animais são submetidos aos extremos de ingestão deste nutriente, mascarando os resultados reais (Tessari, 2006; Tomé e Bos, 2000). Outra possível razão para isto, reside no fato de que gatos nesta fase já apresentam necessidades nutricionais próximas de gatos adultos, os quais apresentam exigência mínima de PB de 160g/kg e recomendada de 200g/kg (NRC, 2006). O restante do N depositado nestes animais além do NMR, provavelmente foi utilizado para o crescimento.

A excreção de nitrogênio fecal e urinária em gatos adultos foi determinada em estudos de Hendriks et al., (1996); Hendriks et al., (1997) por três metodologias: dieta

livre de proteína, dieta com caseína hidrolisada enzimaticamente e regressão. As excreções de nitrogênio fecais foram de 4,1mg/g de ingestão de MS e urinária de 389mg/kg^{0,67}/d, totalizando 398mg/PV_{kg}^{0,67}/d. Os resultados do presente estudo foram 567; 559 e 457 mg/PV_{kg}^{0,67}/d, de acordo com as respectivas idades 150, 195 e 240 dias. Possivelmente as diferenças entre os estudos se deve ao fato da utilização de diferentes fases de vida.

Através da metodologia empregada, é possível calcular a necessidade do aminoácido limitante M+C. O método relaciona porcentagens com o valor do ND_{max}T (máximo teórico de deposição diária de proteína). O valor de ND_{max}T não é alcançado por fatores dietéticos e expressam o potencial de determinada raça ou linhagem (Samadi e Liebert, 2006). Para este estudo, foram utilizados animais sem raça definida, por acreditar que a maioria dos gatos no Brasil pertençam a este tipo. Porém o fator genético, devido à falta de padronização da raça pode ter interferido em alguns resultados, causando maior variação.

Calcula-se porcentagens que variam de 50 a 80% do ND_{max}T, para animais de produção seguindo parâmetros de deposição de proteína reais ou baseados em dados tabelados. Apesar de não existirem dados de deposição de proteína para animais de companhia, optou-se por considerar 55% do ND_{max}T, por ser o mais próximo dos valores reais determinados de deposição proteica. Em animais jovens, ocorre maior deposição proteica, sendo a deposição o resultado entre uma maior síntese em contrapartida catabolismo de proteína, em animais adultos a síntese e catabolismo ocorrem em iguais proporções de modo que o corpo não ganha e nem perde proteína (Colina et al., 2002).

As respostas obtidas neste estudo são em função do aminoácido limitante M+C na dieta e não da proteína que também estava em níveis crescentes ou mesmo por efeitos da técnica da diluição (Fisher e Morris, 1970) na formulação das rações (Silva et al., 2013), isso pode ser verificado através da Tabela 2, em que as respostas do tratamento contraprova situam-se entre os valores de N1 e N2. A diferença entre o N1 e o contraprova é o acréscimo de M+C, logo espera-se que haja melhores respostas no tratamento contraprova sabendo que pequenos acréscimos de aminoácido na dieta são suficientes.

O método de Göttingen também considera a eficiência de utilização do aminoácido limitante na dieta, através do fator bc⁻¹. Trabalho com aves avaliando eficiência de utilização de M+C encontrou valor de 211 (Silva et al., 2013). Existem

muitas diferenças entre a eficiência de utilização dos aminoácidos nas espécies, no entanto a eficiência de uso da M+C nas diferentes espécies é relativamente elevada, pois ela é muito oxidada nos tecidos (Heger e Frydrych, 1985), devido à elevada taxa de oxidação do esqueleto de carbono deste aminoácido (Aguilar et al., 1972).

A eficiência de utilização dos aminoácidos é dependente de muitos fatores, iniciando pela absorção e metabolismo ser complexo e altamente integrado. O metabolismo dos aminoácidos depende do pool de aminoácidos disponível, para o organismo, assim como a efetivação do papel de cada um, geralmente em nível celular (Moughan, 2008). Além disso, a eficiência de utilização dos aminoácidos para deposição proteica, está relacionada a genética e se a ingestão do aminoácido está limitando ou excedendo a exigência do animal (Colina et al., 2002). A utilização desta mesma metodologia, com frangas em crescimento, realizada por Bonato et al. (2015) e utilizando M+C, como aminoácido limitante obteve eficiências de 170 a 350. Através da técnica da diluição, para a formulação de ração, é possível obter um balanceamento dos aminoácidos, que minimiza o excesso de aminoácidos na ração e aumenta a eficiência do mesmo (Pastor et al., 2013).

O valor biológico da proteína foi calculado para cães, sendo definido por Mitchell (1924) como a fração de nitrogênio retido do alimento no corpo do animal (Allison e Anderson, 1945). Alimentos para animais de companhia possuem considerável quantidade de proteína em sua composição, porém a quantidade não é a melhor forma para avaliar se determinado alimento é de qualidade, o que é determinado pela digestibilidade e perfil adequado de aminoácidos disponíveis. Assim, uma proteína de qualidade reflete diretamente na deposição proteica dos animais. O valor biológico encontrado para cada idade avaliada foi de 394, 282 e 693. A comparação com a literatura para essa variável se mostra difícil, uma vez que, o valor biológico é apresentado para ingredientes como sendo o percentual em relação a uma fonte proteica padrão, como a albumina do ovo, conforme mostrado por (Allison e Anderson, 1945). Apesar desta metodologia disponibilizar esta informação referente ao valor biológico de uma fonte proteica, o uso desta informação na prática ainda deve ser melhor avaliado, o que seria interessante para animais de companhia.

Formulações com base em aminoácidos totais utilizam margens de segurança, para contabilizar essas diferenças na utilização de aminoácidos a partir de diferentes ingredientes (Liebert et al., 2000). Para animais de companhia, isso ocorre, pela falta de dados de aminoácidos digestíveis para os diferentes ingredientes empregados nas

formulações. Por este motivo, as dietas formuladas para este estudo apresentaram ingredientes convencionais e ainda foram extrusadas, visando aproximar o melhor possível das condições hoje apresentadas pela indústria. A necessidade de nitrogênio para manutenção (NMR) e de M+C (LAAI) calculados neste estudo, foram baseados respectivamente na equação exponencial entre NI e NEX (para NMR) e percentual de $ND_{max}T$, considerando a deposição proteica dos animais. Desta forma, são dados estimados exclusivamente pelos resultados do BN. Estas estimativas não indicam necessariamente os níveis ótimos de proteína e aminoácidos sulfurados, que os animais devem receber para otimizar parâmetros de saúde, os quais podem variar de acordo com o indicador de saúde pesquisado.

As estimativas de LAAI para M+C aos 150 (581 mg/PV_{kg}^{0,67}/d), 195 (510 mg/PV_{kg}^{0,67}/d) e aos 240 dias de idade (318 mg/PV_{kg}^{0,67}/d), a qual reduziu na última avaliação. Embora as razões para isto não estejam muito claras, os dois primeiros momentos (21 e 27 semanas de vida) de avaliação correspondem à fase de maior crescimento dos gatos, enquanto aos 240 dias (34 semanas) o crescimento já está em fase de estabilização, segundo dados mostrados por (López et al., 2000).

A comparação dos resultados de LAAI obtidos neste estudo nas idades de 150 (581 mg/PV_{kg}^{0,67}/d) e 195 dias (510 mg/PV_{kg}^{0,67}/d) mostra que os mesmos foram superiores aos recomendados pelo NRC (2006) para gatos em crescimento, de 460 mg/PV_{kg}^{0,67}/d. No estudo de Strieker et al., (2007) por análise de *break point* a curva de retenção de nitrogênio estimou a necessidade de metionina em 3,1g/kg de uma dieta com 300g PB/kg e 2,4g/kg de uma dieta com 500g PB/kg. Estas diferenças provavelmente estão relacionadas ao aproveitamento das dietas, usadas para definir as exigências dos animais, as quais neste experimento foram extrusadas com ingredientes convencionais, que apresentam menor coeficiente de digestibilidade. Outro fator que deve ser considerado é a fase de crescimento dos animais, sendo no NRC (2006) as recomendações médias para animais em crescimento das 4 semanas de vida até a idade adulta, sendo este um intervalo de 11 meses considerando a mesma recomendação.

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, a ingestão de nitrogênio para manutenção e de M+C para gatos em crescimento são respectivamente, aos 150 dias de 591 e 581 mg/PV_{kg}^{0,67}/d, aos 195 dias de 517 e 510 mg/PV_{kg}^{0,67}/d e aos 240 dias de idade de 457 e 318 mg/PV_{kg}^{0,67}/d. O método de Göttingen associado com a formulação das dietas pela técnica da diluição, apresentou-se adequado aos estudos sobre necessidades de aminoácidos para gatos em crescimento. Contudo, a definição dos

níveis ótimos de aminoácidos na dieta, para animais de companhia, depende da resposta positiva concomitante de indicadores de saúde. A associação destes resultados com a melhora de indicadores, relacionados ao metabolismo da M+C no organismo irá subsidiar melhor a definição de níveis de suplementação de aminoácidos sulfurados em alimentos para gatos.

LITERATURA CITADA

- AAFCO, A. A. F. C. O. 2011. Association of American Feed Control Officials. In: A. o. A. F. C. Officials (ed.). official publication., Atlanta, GA.
- Aguilar, T. S., A. E. Harper, e N. J. Benevenga. 1972. Efficiency of Utilization of Indispensable Amino Acids for Growth by the Rat. *The Journal of Nutrition* 102: 1199-1208.
- Allison, J. B., e J. A. Anderson. 1945. The Relation between Absorbed Nitrogen, Nitrogen Balance and Biological Value of Proteins in Adult Dogs: Two Figures. *The Journal of Nutrition* 29: 413-420.
- AOAC. 1995. Official methods of analysis of AOAC International. Official methods of analysis of AOAC International.
- Bonato, M. A. et al. 2015. Amino Acid Requirements for Pullets Based on Potential Protein Deposition and the Efficiency of Amino Acid Utilization. In: N. K. Sakomura, R. M. Gous, I. Kyriazakis e L. Hauschild (eds.) *Nutritional Modelling for Pigs and Poultry*. CAB International.
- Bradshaw, J. W. S., D. Goodwin, V. Legrand-Defréтин, e H. M. R. Nott. 1996. Food selection by the domestic cat, an obligate carnivore. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 114: 205-209.
- Colina, J., A. Lewia, P. Miller. 2002. *Dietary Amino Acid Utilization for Body Protein Deposition — Current and Future Research*.
- Dickinson, C. D., P. P. Scott. 1956. Nutrition of the cat. II. Protein requirements for growth of weanling kittens and young cats maintained on a mixed diet. *The British journal of nutrition* 10: 311-316.
- Fisher, C., T. R. Morris. 1970. The determination of the methionine requirement of laying pullets by a diet dilution technique. *British Poultry Science* 11: 67-82.
- Greaves, J. P., P. P. Scott. 1960. Nutrition of the cat. 3. Protein requirements for nitrogen equilibrium in adult cats maintained on a mixed diet. *The British journal of nutrition* 14: 361-369.
- Green, A. S. et al. 2008. Cats Are Able to Adapt Protein Oxidation to Protein Intake Provided Their Requirement for Dietary Protein Is Met. *The Journal of Nutrition* 138: 1053-1060.
- Heger, J., Z. Frydrych. 1985. Efficiency of utilization of essential amino acids in growing rats at different levels of intake. *British Journal of Nutrition* 54: 499-508.
- Hendriks, W. H., P. J. Moughan, e M. F. Tarttelin. 1996. Gut endogenous nitrogen and amino acid excretions in adult domestic cats fed a protein-free diet or an enzymatically hydrolyzed casein-based diet. *The Journal of Nutrition* 126: 955-962.

- Liebert, F., K. Benkendorff. 2007. Modeling lysine requirements of *Oreochromis niloticus* due to principles of the diet dilution technique. *Aquaculture* 267: 100-110.
- Liebert, F., M. Rimbach, M. Peisker. 2000. Model for estimation of amino acid utilization and its requirements in growing animals In: *Australian Poultry Science Symposium Sydney*. p 88-92.
- López, S. et al. 2000. A generalized Michaelis-Menten equation for the analysis of growth. *Journal of animal science* 78: 1816-1828.
- Miller, S. A., J. B. Allison. 1958. The Dietary Nitrogen Requirements of the Cat. *The Journal of Nutrition* 64: 493-501.
- Mitchell, H. H. 1924. A method of determining the biological value of protein. *Journal of Biological Chemistry* 58: 873-903.
- Moughan, P. J. 2008. Efficiency of amino acid utilization in simple stomached animals and humans – a modelling approach. In: J. France and E. Kebreab (eds.) *Mathematical modelling in animal nutrition* CAB International, London.
- NRC. 2006. *Nutrient requirements of dogs and cats*, Washington.
- Pastor, A., C. Wecke, F. Liebert. 2013. Assessing the age-dependent optimal dietary branched-chain amino acid ratio in growing chicken by application of a nonlinear modeling procedure. *Poultry Science* 92: 3184-3195.
- Rand, W. M., V. R. Young. 1999. Statistical Analysis of Nitrogen Balance Data with Reference to the Lysine Requirement in Adults. *The Journal of Nutrition* 129: 1920-1926.
- Rogers, Q. R., J. G. Morris, R. A. Freedland. 1977. Lack of hepatic enzymatic adaptation to low and high levels of dietary protein in the adult cat. *Enzyme* 22: 348-356.
- Sakomura, N. K., H. S. Rostagno. 2007. *Métodos de pesquisa em nutrição de monogástricos*. Funep, Jaboticabal.
- Samadi, F. Liebert. 2006. Estimation of Nitrogen Maintenance Requirements and Potential for Nitrogen Deposition in Fast-Growing Chickens Depending on Age and Sex. *Poultry Science* 85: 1421-1429.
- Silva, E. P. d. et al. 2013. Descrição do potencial de retenção de nitrogênio em frangas de postura por diferentes metodologias: máxima deposição e estimativas da ingestão de metionina+cistina. *Ciência Rural* 43: 2070-2077.
- Strieker, M. J., J. G. Morris, P. H. Kass, e Q. R. Rogers. 2007. Increasing dietary crude protein does not increase the methionine requirement in kittens*†‡. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 91: 465-474.
- Tessari, P. 2006. Nitrogen Balance and Protein Requirements: Definition and Measurements. In: G. Mantovani et al. (eds.) *Cachexia and Wasting: A Modern Approach*. p 73-79. Springer Milan, Milano.
- Thong, H. T., F. Liebert. 2004. Potential for protein deposition and threonine requirement of modern genotype barrows fed graded levels of protein with threonine as the limiting amino acid. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 88: 196-203.
- Tomé, D., C. Bos. 2000. Dietary Protein and Nitrogen Utilization. *The Journal of Nutrition* 130: 1868S-1873S.
- Wecke, C., F. Liebert. 2009. Lysine requirement studies in modern genotype barrows dependent on age, protein deposition and dietary lysine efficiency. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 93: 295-304.

IV- Distribuição calórica da dieta e níveis de ingestão alimentar afetam o crescimento e indicadores da qualidade de pelagem em gatos em crescimento

(Journal of Animal Science)

**J. Sato*¹, M. E. Z. Merenda*, A. T. Uemoto*, M. P. Santos*, F. I. Bankuti*,
F.Sato*, A. N. Medina*, M. A. Brunetto‡, A. C. Carciofi†, R. S. Vasconcellos***

* Universidade Estadual de Maringá-UEM, Maringá, Paraná, Brasil; † Universidade Estadual Paulista-UNESP-FCAV, Jaboticabal, São Paulo, Brasil; ‡ Universidade de São Paulo- FMVZ-USP, Pirassununga, São Paulo, Brasil; ¹Autor correspondente: joycesato1986@yahoo.com.br

RESUMO: O objetivo do estudo foi verificar as relações entre as ingestões de proteína, metionina+cistina (M+C) e energia metabolizável com parâmetros relacionados à saúde e crescimento. Foram formuladas seis dietas pela técnica da diluição, as quais tiveram níveis crescentes de proteína bruta (210 a 500g/kg) e M+C como aminoácido limitante nos seguintes níveis (6,5; 8,8; 11,3; 13,6 e 16,0 g/kg). As dietas foram oferecidas dos 150 aos 240 dias de idade para os gatos (n=6 por dieta). Os dados foram analisados por técnicas de estatística multivariada, na qual dividiu os animais em *clusters* de baixa, moderada e alta ingestão. Após, foi realizada análise fatorial exploratória, para definição de fatores que foram: indicadores de crescimento (peso médio, ganho de peso, crescimento de pelos e creatinina), indicadores de saúde (massa magra, gordura corporal, glutathiona reduzida (GSH), relação glutathiona reduzida e oxidada (GSSG) GSH:GSSG, indicadores de ingestão de nitrogênio (balanço de nitrogênio, creatinina e ureia) e indicadores de resistência (conteúdo de amida dos pelos e resistência dos pelos). Os indicadores de crescimento foram significativos ($P<0,05$) na comparação entre os *clusters* de baixa e moderada ingestão, sendo os menores resultados obtidos no *cluster* de baixa e os maiores no *cluster* de moderada ingestão. Os indicadores de ingestão de nitrogênio tiveram efeito significativo ($P<0,05$) na comparação entre os *clusters* de baixa, moderada e alta ingestão, sendo reflexo direto da ingestão de PB crescente dos *clusters*. Dietas que contenham teores de PB acima de 85 g/1000 kcal de EM, relação E:P abaixo de 12,4 kcal/g e teores de M+C acima de 2,8 g/1000 kcal parecem favorecer as condições de saúde de gatos dos 150-240 dias de idade. A ingestão energética abaixo de 153,22

kcal/PV_{kg}^{0.67}/d parece prejudicar o desempenho dos gatos nesta fase de crescimento. Ingestão de PB acima de 19,94 g/PV_{kg}^{0.67}/d e relação E:P abaixo de 8,8 kcal/g não contribuem com a resposta de crescimento, saúde e qualidade da pelagem dos gatos durante o crescimento, dos 150-240 dias.

Palavras chaves: aminoácidos sulfurados, felinos, relação energia e proteína

ABSTRACT: The objective of this study was to verify the relationships between protein, methionine + cystine (M + C) intakes and metabolizable energy with parameters related to health and growth. Six dilution diets were formulated, which had increasing levels of crude protein (210 to 500g / kg) and M + C as a limiting amino acid at the following levels (6.5, 8.8, 11.3, 13.6 And 16.0 g / kg). Diets were offered from 150 to 240 days of age for cats (n = 6 per diet). Data were analyzed using multivariate statistical techniques, in which the animals were divided into low, moderate and high ingestion clusters. Afterwards, factorial exploratory analysis was performed to define factors that were: growth indicators (mean weight, weight gain, hair growth and creatinine), health indicators (lean mass, body fat, reduced glutathione (GSH), relation reduced and oxidized glutathione (GSSG) GSH: GSSG, indicators of nitrogen intake (nitrogen balance, creatinine and urea) and resistance indicators (hair amide content and hair resistance). The growth indicators were significant (P <0.05) in the comparison between low and moderate ingestion clusters, with the lowest results being obtained in the low cluster and the highest in the cluster of moderate ingestion. The nitrogen intake indicators had a significant effect (P <0.05) on the comparison between the low, moderate and high ingestion clusters, being a direct reflection of the increasing CP intake of the clusters. Diets containing CP levels above 85 g / 1000 kcal MS, E: P ratio below 12.4 kcal / g and M + C contents above 2.8 g / 1000 kcal appear to favor the health conditions of cats Of 150-240 days of age. Energy intake below 153.22 kcal / PV kg^{0.67} / d appears to impair the performance of cats at this stage of growth. Intake of CP above 19.94 g / PV kg^{0.67} / E: P ratio below 8.8 kcal / g did not contribute to the growth, health and quality of the coat of cats during growth, from 150-240 days.

Key words: sulphur amino acids, felines, relationship energy and protein

INTRODUÇÃO

A alimentação de animais carnívoros em vida livre, como o gato, era baseada em presas. Essas presas apresentam em sua composição, grande proporção de proteína e gordura e pouco carboidrato (Schermerhorn, 2013). Logo, o metabolismo do gato é adaptado a este tipo de distribuição calórica (cerca de 50% da energia proveniente de proteína) na dieta.

A elevada ingestão de proteína pelos carnívoros é importante para suprir, além da sua exigência de aminoácidos essenciais e *pool* nitrogenado, a sua demanda fisiológica por glicose, obtida pela gliconeogênese (Eisert, 2011). Alimentos comerciais apresentam de 52 a 103 g de proteína bruta (PB) por 1000kcal, esta ampla faixa é devido à falta de conhecimento sobre as relações ideias da proteína com a energia.

O crescimento é um estágio fisiológico de grande demanda por proteína e aminoácidos, pois deve atender à demanda para a síntese de novos tecidos, além da manutenção. No entanto, é importante que os aminoácidos e proteína estejam em equilíbrio com a energia, para aumentar a sua eficiência de utilização (FAO/WHO, 2007).

A metionina é o primeiro aminoácido limitante para gatos (NRC, 2006) e na fase de crescimento apresenta recomendação 2,29 vezes superior à fase adulta, em sua relação com a PB da dieta (NRC, 2006). Esta maior exigência proporcional na fase de crescimento pode ser devido à sua importância no metabolismo como: síntese e replicação celular; doador do grupo metil; função na síntese proteica e precursor da cistina, a qual participa resposta antioxidante e síntese e crescimento de pele e pelos (Ball et al., 2006).

Neste trabalho, objetivou-se verificar os efeitos da ingestão de PB e metionina+cistina (M+C) e suas relações com a energia metabolizável (EM) da dieta sobre os indicadores qualitativos da pelagem, crescimento e parâmetros sanguíneos relacionados ao metabolismo de proteína e metionina, de gatos dos 150-240 dias de idade.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e instalações

O estudo teve duração de 90 dias (150- 240 dias de idade) e foram utilizados 36 gatos em crescimento, sem raça definida. Todos os animais foram vacinados, vermifugados e livres de ectoparasitos. Os animais foram mantidos coletivamente em uma área de 49m² (24m² de área coberta e 25m² de área de solário), com água disponível ad libitum nos momentos em que não estavam sendo alimentados. Entre 8:00 e 10:00 e entre 14:00 e 16:00, todos os gatos eram alojados em gaiolas metabólicas para a alimentação individualizada. A quantidade de alimento foi calculada individualmente, visando atender às exigências energéticas para gatos em crescimento, segundo o National Research Council – Nutrient Requirements of Dogs and Cats (NRC, 2006).

O experimento foi conduzido no Laboratório de estudos nutricionais em felinos domésticos localizado na Fazenda Experimental de Iguatemi, pertencente à Universidade Estadual de Maringá (FEI/UEM).

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética e Uso dos Animais da Universidade Estadual de Maringá (CEUA-UEM), sob o número de protocolo 2339130214/2014.

Delineamento experimental

Os gatos foram distribuídos entre seis tratamentos, em blocos casualizados, de acordo com a ninhada a qual pertenciam, o peso e a idade. Os tratamentos foram as seis dietas experimentais, as quais eram isoenergéticas. Cada dieta foi fornecida para seis gatos durante o experimento, totalizando 36 animais (N=36).

Dietas e distribuição dos tratamentos

Para a formulação das dietas foi adotada a técnica da diluição (Fisher e Morris, 1970). Esta técnica consiste na diluição sequencial de uma dieta com alto teor de proteína, mas com deficiência relativa do aminoácido teste. Neste estudo, os aminoácidos teste foram M+C. A dieta concentrada (N5 - alta proteína) continha os mesmos níveis de energia metabolizável, minerais e vitaminas da dieta isenta de proteína. A relação dos aminoácidos em N5 estava de acordo com os estabelecidos pelo NRC (2006), tomando-se como referência os níveis de lisina. Esta dieta foi diluída em diferentes proporções com uma dieta isenta de proteína, sendo estas

proporções (isenta:N5), respectivamente: 60:40; 55:45; 30:70; 15:85 e 0:100. Na Tabela 1 estão apresentadas as diluições e composição nutricional das dietas experimentais.

Tabela 1. Composição das dietas experimentais¹

Diluição							
Isenta de proteína	1,00	0,60	0,45	0,30	0,15	0,00	0,60
Alta proteína (N5)	0,00	0,40	0,55	0,70	0,85	1,00	0,40
DL-Metionina, %							0,20
Composição nutricional (Matéria seca, %)							
	Isenta ²	N1	N2	N3	N4	N5	Contra-prova ³
Matéria seca, %	90,47	90,81	90,94	91,07	91,19	91,32	90,63
Proteína bruta, %	0,63	21,02	28,97	35,06	42,93	49,71	21,91
Extrato etéreo, %	18,79	15,74	14,60	13,46	12,31	11,17	15,72
Fibra bruta, %	2,21	2,20	2,20	2,20	2,19	2,19	2,20
Matéria mineral, %	10,32	9,77	9,56	9,35	9,14	8,94	9,75
EM, kJ/g MS ⁴	16,82	16,81	16,80	16,79	16,78	16,78	16,77

¹N1= 6,5g/kg M+C; N2= 8,8g/kg M+C; N3= 11,3g/kg M+C; N4= 13,6g/kg M+C; N5= 16,0g/kg M+C

²Esta dieta foi apenas usada na técnica de formulação, mas não foi fornecida aos animais como tratamento, por ser deficiente em proteína

³Esta dieta apresenta a mesma composição da dieta N1, porém, com as correções nos níveis M+C, conseguidos pela adição de aminoácidos industriais

⁴EM: Energia metabolizável, kJ/g MS

As dietas foram processadas na unidade de extrusão da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista (FCAV-UNESP), Brasil. Após a mistura dos ingredientes das dietas isenta e N5, as mesmas foram moídas em moinho de martelos (Sistema Tigre de Mistura e Moagem, Tigre, São Paulo) equipado com peneiras com furos de 0,8 mm. Após a moagem das duas dietas, procedeu-se à diluição das mesmas na proporção descrita anteriormente para compor as 6 dietas experimentais (N1-N5) e o tratamento contra prova e então procedeu-se à mistura. Em seguida, cada dieta foi extrusada em extrusora de rosca simples (MEX 250, Manzoni, Campinas, Brasil), com capacidade de processamento de 250 kg/hora. Após extrusão, as dietas foram secas em secador horizontal de dupla esteira pelo período de 20 minutos a 105°C e, posteriormente, recobertos com óleo de frango e palatilizante, após resfriamento. A adição de água e vapor, a velocidade da rosca e a alimentação da extrusora foram ajustadas de acordo com a formulação da dieta, visando manter a densidade dos extrusados semelhantes entre os tratamentos.

Para acompanhar o crescimento dos animais e corrigir a quantidade de alimento ofertada, os gatos eram pesados a cada 15 dias em balança digital, individualmente, sempre no mesmo horário (8:00-9:00h), para correção das quantidades de ração fornecida. A quantidade de alimento fornecida foi corrigida quinzenalmente, a partir da determinação das necessidades energéticas, para gatos em crescimento e estimativa da energia metabolizável das dietas, ambas equações preconizadas pelo NRC (2006).

Análises laboratoriais

A ingestão de M+C e PB crescente neste estudo foi relacionada com indicadores de qualidade dos pelos, parâmetros bioquímicos sanguíneos e composição corporal.

Análises dos pelos

Crescimento dos pelos

O crescimento dos pelos foi determinado a cada 45 dias em todos os animais. Para isto, no início do estudo foi realizada a tricotomia, de uma área aproximada de 5 cm², no flanco direito dos animais, com o auxílio de um aparelho tosador elétrico específico para animais (modelo Golden A5, Oster, USA). Foi padronizada uma medida inicial de 2 mm dos pelos após a tosa, considerando o tamanho remanescente do pelo após a tricotomia. Aos 195 e 240 dias, foram retirados, 10 pelos íntegros com o auxílio de uma pinça, tomando-se o cuidado de se remover junto o bulbo do pelo. Os pelos danificados eram descartados. O comprimento dos pelos foi aferido, fixando-os em papel milimetrado e medidos com auxílio de um micrômetro digital (Mitutoyo modelo 500-144b, Tokio, Japan). A média de 10 medidas do comprimento dos pelos de cada animal foi empregada para a análise estatística.

Resistência mecânica

A resistência mecânica foi determinada com o auxílio de um texturômetro (TA-HD Plus, marca Stable Micro Systems, Inglaterra), de acordo com metodologia modificada (Gama, 2010). Para isto, os pelos individuais (aos 195 dias com média de 21,5 cm e aos 240 dias com média de 24,5 cm de comprimento) foram posicionados

em molduras de papel (1,35 x 2,5 cm) e as pontas fixadas nas extremidades da moldura. Após a fixação, a moldura com o pelo era posicionada e alinhada nas garras do texturômetro, sendo inicialmente fixado na garra inferior e posteriormente na garra superior. Antes de iniciar o ensaio de tração, procedia-se o corte das áreas centrais demarcadas na moldura de papel, para não ser feito a tração do papel e sim do fio. O equipamento foi calibrado para iniciar a tração a partir de uma distância e velocidade definida para o pacote chamado (*hair monofilament*).

Para aferir o diâmetro dos pelos, foi utilizada a microscopia eletrônica Raman. Os pelos foram imersos em nitrogênio líquido, para sofrer vitrificação e então foram cortados na sequência com lâmina de micrótomo, para preservar o formato dos fios e ter maior confiabilidade na mensuração do diâmetro. A partir dos dados de diâmetro médio dos fios foi calculada a área de cada pelo, de acordo com Eq.1 utilizada por Gama (2010).

$$\text{Área total do pelo} = \pi \cdot r^2 \quad (1)$$

r = raio do pelo;

O equipamento foi ajustado para uma velocidade de tração das garras de 0,5 mm/s. Mediante a ruptura dos pelos, quando tensionados conforme os parâmetros descritos acima, mediu-se a força máxima exercida em N.

Os resultados foram utilizados na Eq. 2 para cálculo da tração à ruptura.

$$\text{Tração à ruptura} = F \text{ (N)} / A \text{ (mm}^2\text{)} \quad (2)$$

F= força em Newton para ruptura do fio;

A= área em mm² do pelo calculada na Eq. 1

Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman é uma técnica minimamente invasiva, e permite, sem a utilização de reagentes, caracterizar um material de acordo com os modos de vibração moleculares presente em moléculas, desde que este seja Raman ativo (Galván et al., 2013). Desta maneira, a espectroscopia Raman fornece a impressão digital da molécula, podendo ser utilizada para estudo de materiais de composição orgânica e/ou inorgânica.

Cada modo de vibração Raman ativo exibe uma banda, chamada banda Raman, na qual seu centro é indicado pela maior intensidade de sinal Raman medido. A cistina apresenta um modo de vibração Raman ativo, o estiramento da ponte de dissulfeto ($\nu(\text{S-S})$) (Gama, 2010; Kuzuhara, 2013). Desta maneira, é possível avaliar esta banda como um marcador de cistina em pelos de animais.

Foi utilizado um espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier acoplado ao módulo de espectroscopia Raman (FT-Raman) (modelo Vertex 70 – Ram II, marca Bruker, Alemanha). O método utilizado por Gama (2010) e (Kuzuhara, 2005) foi adaptado aos pelos. As porções de pelos foram posicionadas perpendicularmente à fonte de excitação neste caso, um laser de Nd-Yag, de comprimento de onda de 1064 nm e potência nominal de 500 mW. Cada espectro de uma porção de pelos é uma média de um número de 300 varreduras, com resolução espectral de 4 cm^{-1} . O intervalo espectral de medida foi de 4000 a 400 cm^{-1} , a qual corresponde à região do infravermelho médio, do espectro de radiação eletromagnético.

As porções de pelos foram condicionadas e presas, sobre um espelho, que não contribuí para o espalhamento Raman da amostra, e a posição de cada porção de pelo medido foi maximizada com relação à lente coletora de espalhamento Raman, assegurando a melhor relação sinal - ruído para cada medida realizada. Foi realizado o cálculo da área, por método de integração, da banda do $\nu(\text{S-S})$, pois a largura da banda também contribui de forma expressiva na quantificação, sendo demonstrado pela Fig. 1 (B). As principais bandas Raman e suas atribuições estão enumeradas na Tabela 2 e os picos podem ser visualizados na Fig. 1.

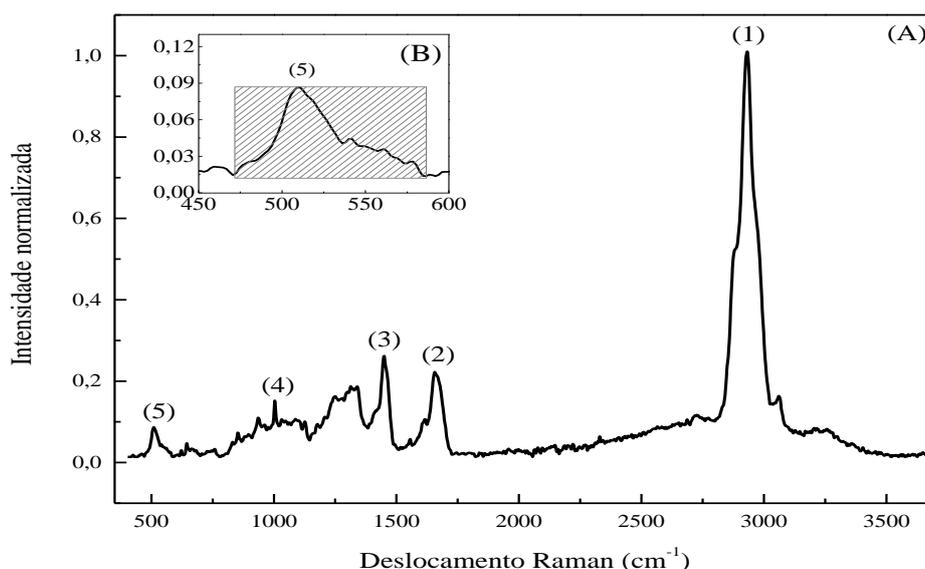


Figura 1. (A) Espectro Raman, normalizados em 2927 cm^{-1} (pico nº 1), de pelos de gatos em crescimento. (B) Banda da Raman referente ao estiramento ν (S-S) e a área calculada

Tabela 2. Atribuições das principais bandas Raman presentes em pelos

Nº da banda	Centro da banda (cm^{-1})	Atribuições
1	2925	CH ^(Chan et al., 2005)
2	1653	Amida I ^(Kuzuhara et al., 2007)
3	1450	CH ₂ ^(Caspers et al., 2003)
4	1003	Fenilalanina ^(Pielesz e Weselucha-Birczyńska, 2000)
5	510	Estiramento S-S; ν (S-S) ^(Kuzuhara, 2005)

FTIR (Espectroscopia no infravermelho via transformada de Fourier com reflexão total atenuada (FTIR-ATR))

Foram realizadas medidas de espectroscopia no infravermelho via transformada de Fourier com reflexão total atenuada (FTIR-ATR), e a metodologia aplicada para cabelos de humanos foi adaptada para pelos de gatos, com menor comprimento (Gama, 2010; Wojciechowska et al., 2002). Nestes ensaios experimentais, foram obtidos espectros de absorção no infravermelho, que também mostram os modos vibracionais de grupos funcionais presentes nas moléculas estudadas. A Fig.2 mostra um espectro de absorção no infravermelho, de uma porção de pelos, entretanto, as bandas de absorção no infravermelho não são necessariamente

as mesmas as bandas Raman, uma vez que os efeitos físicos detectados pelas técnicas não são os mesmos. Desta forma, as espectroscopias de FTIR-ATR e Raman podem ser consideradas técnicas complementares.

A espectroscopia FTIR-ATR, na região espectral analisada neste trabalho entre 4000 a 400 cm^{-1} , não apresenta o modo vibracional da ponte de dissulfeto, desta maneira, não é possível avaliar a cistina por esta técnica. De acordo com os espectros fornecidos pelas porções de pelos, pode-se analisar o conteúdo proteico por meio das bandas de amida I, II e III, com centros de bandas em 1630, 1510 e 1230 cm^{-1} (Chan et al., 2005; Kakkar et al., 2014).

Na Fig. 2, estão destacadas duas regiões, as quais foram obtidas por método de integração, a área das bandas FTIR-ATR do estiramento $\nu(\text{C-H})$ e da amida I, como bandas referenciais ao conteúdo lipídico e proteico, respectivamente. Todos os espectros de FTIR-ATR foram corrigidos por linha de base e normalizados com relação à banda do estiramento $\nu(\text{C-O})$, centrado em 1742 cm^{-1} .

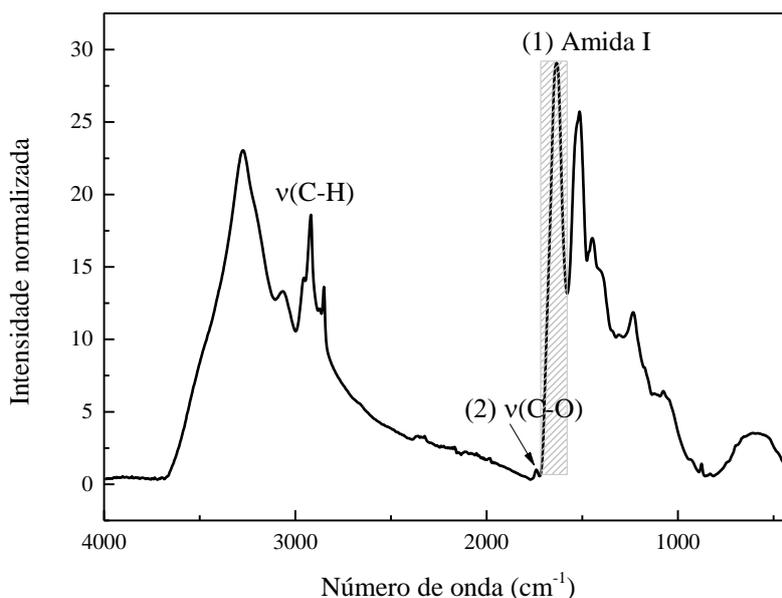


Figura 2. Espectro de FTIR-ATR, normalizado em 1740 cm^{-1} ($\nu(\text{C-O})$), de pelos de gatos. As posições das áreas calculadas, sob a banda, estão indicadas, na região rachurada

Foi utilizado um espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier (modelo Vertex 70, Bruker, Alemanha) acoplado ao acessório de reflectância total atenuada (modelo Platinum, Bruker, Alemanha). As porções de pelos foram posicionadas sobre o cristal de diamante, mantendo contato com este durante todo o

tempo de medida. Antes das medidas de cada porção de pelo, o sistema é evacuado, para minimizar os efeitos de umidade e contribuições do ar atmosférico, como o CO₂. Cada espectro é uma média de 50 varreduras, com resolução espectral de 4 cm⁻¹. O intervalo espectral de medida foi de 4000 a 400 cm⁻¹. As principais bandas FTIR estão numeradas e suas atribuições estão na Tabela 3.

Tabela 3. Atribuições das principais bandas FTIR presentes em pelos

Nº da banda	Centro da banda (cm ⁻¹)	Atribuições
1	1650	N-H _{bending} Amida I(α-helicoidal) ^(Kakkar et al., 2014)
2	1238	C-O Amida III ^(Kakkar et al., 2014)

Parâmetros sanguíneos

Estas análises foram realizadas no início e término do estudo. Para a coleta de sangue, os animais foram mantidos em jejum de 12h e submetidos à anestesia intramuscular com anestésico dissociativo, para a contenção química. Uma amostra de 5 ml de sangue foi coletada da veia jugular dos animais. Após a coleta, o material foi preparado e congelado à -20°C, até o momento das análises laboratoriais.

Status de glutatona reduzida (GSH) e relação entre glutatona reduzida e oxidada (GSH/GSSG)

Para estas análises, o sangue foi acondicionado em tubo com heparina e imediatamente congelado. A análise por espectrofotometria baseia-se na reação de GSH com DTNB (ácido ditionitrobenzóico ou reagente de Ellman), que produz o cromóforo TNB (ácido tionitrobenzóico), que tem uma absorvância máxima a 412 nm, e forma glutatona oxidada TNB (GS-TNB). A taxa de formação de TNB, é medida a 412 nm, e é proporcional à concentração de GSH na amostra. O produto dissulfeto (GS-TNB) é então reduzido por GR (glutatona redutase), na presença de NADPH, reciclando a GSH (Rahman et al., 2007). O método de reciclagem da redutase da GSSG é utilizado para a determinação da GSSG, por monitorização da NADPH espectrofotometricamente pelo método de (Griffith, 1980). A amostra é tratada com 2-

vinilpiridina, o qual reage de forma covalente com GSH (mas não GSSG). O excesso de 2-vinilpiridina é neutralizado com trietanolamina (Rahman et al., 2007).

Parâmetros bioquímicos sanguíneos

Estas análises foram realizadas a partir do soro sanguíneo dos animais. Foram determinadas as concentrações de albumina, creatinina, uréia, proteínas totais e proteína ligadora de retinol. As análises foram feitas utilizando kits de reagentes próprios para cada parâmetro (Analisa, Belo Horizonte) sendo executadas conforme recomendação dos mesmos. A albumina e as proteínas totais foram determinadas por metodologia colorimétrica (Albumina PP cat. 419) e (Proteínas Totais PP cat. 418) respectivamente, creatinina por metodologia cinética colorimétrica (Creatinina PP cat. 435) e ureia, pela metodologia enzimática colorimétrica (Ureia PP cat. 427). A análise de proteína ligadora de retinol foi realizada pela empresa Labtrade do Brasil Ltda.5.5, por ELISA.

Composição corporal

A composição corporal foi determinada apenas aos 240 dias de idade dos gatos e para isto foi utilizada a técnica de diluição de isótopos, empregando-se o óxido de deutério. Procedeu-se inicialmente à coleta de 1,5 mL de sangue dos animais, para a realização das medidas do branco. A partir deste momento foi injetado, pela via subcutânea, uma solução constituída de isótopo de deutério diluído em solução fisiológica na proporção de 1:9, respectivamente (Sigma Aldrich, São Paulo), na dose de 1mL/kg de peso. Após duas horas, com os animais anestesiados para a coleta de sangue para as demais análises, coletou-se mais 1,5 mL para a determinação da água corporal total, massa magra e gordura corporal dos gatos, pela técnica de diluição de isótopos. Para estas análises, utilizou-se o soro sanguíneo, o qual foi imediatamente congelado após a sua obtenção em microtubos de polipropileno. As análises foram realizadas no Laboratório de Espectrometria de Massa da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, seguindo a metodologia descrita por Ferrier et al (2001) e adaptada por Brunetto, 2010. Os cálculos para massa magra e gordura corporal foram feitos de acordo com a quantificação de água corpórea total.

Análises estatísticas

Para verificar a associação da ingestão de PB e M+C com os parâmetros qualitativos de pelagem, composição corporal e parâmetros bioquímicos, optou-se pelo emprego da análise multivariada com utilização da técnica de análise de fatorial e análise de *clusters*.

A metodologia de análise fatorial (AFC) consiste em descrever a variabilidade original do vetor aleatório X, em termos de um número menor (m) de variáveis aleatórias que expliquem as informações das variáveis originais (Hair et al., 2009). Sendo assim, a AFC é uma técnica utilizada quando se pretende condensar um conjunto grande de informações em um conjunto menor de variáveis (Fatores), com o mínimo de perda informações possível (Hair et al., 1998).

Para AFC, utilizou-se como método de extração os componentes principais, rotação do tipo Varimax, que tem a finalidade de maximizar a projeção da variação (ou variância) sobre um conjunto de eixos ortogonais (componentes principais); normalização de Kaiser Meyer Olkin (KMO), que de acordo com Fávero et al., (2009), o teste de KMO verifica a adequação da amostra em relação ao grau de correção parcial entre as variáveis. Valor de KMO próximo a 0 indica que a análise fatorial não é adequada para análise das variáveis, por haver correlação baixa entre essas. Quanto mais próximo de 1, mais adequada é a utilização da técnica, não sendo indicados valores inferiores a 0,5 e o Teste de esfericidade de Bartlett, verifica a existência de uma matriz identidade, ou seja, quando não há correlação entre os dados analisados ($p < 0,05$) (Hair et al., 1998; Lebart et al., 2000; Smith et al., 2002; Barroso e Artes, 2003). Para escolha do número de fatores, foi utilizado o critério de Kaiser Meyer Olkin, como proposto por Fávero et al. (2009) e Hair et al., (1998). De acordo com os autores, a escolha do número de fatores pode ser auxiliada por 4 critérios e que, cabe ao pesquisador adotar o tipo de critério. Os critérios que podem ser utilizados são: Teste de Kaiser (KMO), Critério a priori, Critério de porcentagem de variância e, critério do gráfico Scree. Os parâmetros para KMO diante de análise fatorial sugere: 1-0,9: muito boa; 0,8-0,9: boa; 0,7-0,8: média; 0,6-0,7: razoável; 0,5-0,6: má e $>0,5$: inaceitável. Os fatores gerados foram classificados de acordo com as variáveis que os definiram.

A partir dos resultados da AFC, foi empregada técnica de formação de *clusters*. Esta técnica, tem como resultado a formação de grupos de indivíduos diferentes entre si, porém semelhantes em seu perfil interno (Fávero et al., 2009).

Desta forma, foram divididos em 3 *clusters*: baixa, moderada e alta ingestão, segundo a semelhança na ingestão de nutrientes dada pelas variáveis que o formaram: peso médio, ganho de peso, crescimento de pelo, creatinina total plasmática, massa magra, gordura corporal, glutathione reduzida (GSH), relação glutathione reduzida e oxidada (GSSG) GSH:GSSG, balanço de nitrogênio, creatinina e ureia, conteúdo de amida do pelo e resistência do pelo. Para o *cluster*, classificado como baixa ingestão de nutrientes foi formado por 8 animais, o *cluster* de moderada foi formado por 11 animais e o *cluster* de alta, alocou 11 animais.

A partir do uso conjunto destas duas técnicas, os animais foram analisados segundo o valor médio dos grupos formados (Yong; Pearce 2013). Como método para verificação de igualdade entre médias, utilizou-se o Teste de Tukey com intervalo de confiança de 95%.

RESULTADOS

A análise fatorial comum com as 14 variáveis resultou no valor de KMO de 0,546 e valor do teste de teste de esfericidade de Bartlett $p=0,0001$, indicando adequação das variáveis ao método (Fávero et al., 2009).

A análise fatorial dos quatro componentes iniciais explicam 77,62% da variância, satisfazendo o critério mínimo de 50%, estabelecido para esta análise (Barroso & Artes, 2003). Além disso, os quatro componentes iniciais, dada as variáveis que os definiram, adequadas aos objetivos propostos nesta pesquisa, permitiram a exclusão dos demais permanecendo os componentes que apresentam maiores eigenvalues.

O Componente (C1) foi definido pelas variáveis: Peso médio; Ganho de peso; Creatinina total plasmática e Crescimento dos pelos. (Tabela 4). Por ter sido formado tipicamente por variáveis que indicam a forma integrada o crescimento do animal, C1 foi denominado como “indicadores de crescimento”.

Tabela 1. Carga fatorial para definição dos componentes

	Componentes			
	1	2	3	4
Balanço de nitrogênio ¹	0,18	0,16	0,82	-0,09
Gordura corporal ²	0,14	-0,72	0,12	0,42
Massa magra ³	-0,14	0,72	-0,12	-0,42
Glutationa reduzida (GSH) ⁴	0,13	0,83	0,08	0,16
Relação GSH:GSSG (glutationa oxidada) ⁵	0,08	0,84	0,05	0,12
Peso médio ⁶	0,92	-0,02	-0,03	0,23
Ganho de peso ⁷	0,89	-0,12	0,15	0,21
Creatinina	0,14	0,08	-0,86	-0,12
Ureia	0,31	-0,13	0,74	-0,13
Creatinina total plasmática ⁸	0,70	0,19	-0,60	-0,09
Proteína ligadora de retinol (RBP) ⁹	0,13	0,50	-0,38	0,45
Amida dos pelos	0,10	0,03	-0,01	0,93
Resistência dos pelos	0,06	-0,07	-0,05	0,93
Crescimento dos pelos ¹⁰	0,69	0,20	0,38	-0,15

O Componente 2 (C2) foi definido pelas variáveis: Gordura corporal; Massa magra; Glutationa reduzida (GSH) e Relação GSH:GSSG (glutationa oxidada). Dada as características destas variáveis de gruparem as medidas de composição corporal e ainda do estado oxidativo, C2 foi denominado de “indicadores de saúde” (Tabela 4).

O Componente 3 (C3), por sua vez, foi definido pelas variáveis: Balanço de nitrogênio; Creatinina e Ureia. Desta forma, C3, por agruparem variáveis que refletem diretamente a ingestão de compostos nitrogenados foi denominado de “indicadores de ingestão de compostos nitrogenados” (Tabela 4).

E o Componente 4 (C4) foi definido pelas variáveis: Amida dos pelos e Resistência dos pelos, foi denominado de “indicadores de resistência do pelo” e agrupam variáveis qualitativas importantes para pelagem (Tabela 4).

De acordo com a Tabela 4, pode-se verificar que o agrupamento das variáveis segundo a sua significância biológica pode favorecer a interpretação integrada dos resultados obtidos e ainda uma relação inversa entre a gordura corporal e GSH e GSH:GSSG, confirmando a relação entre gordura corporal e menor resposta antioxidante do organismo.

Para verificar a associação da ingestão de PB e M+C com os parâmetros bioquímicos, qualitativos de pelagem e composição corporal adotou a técnica de cluster. A análise de *clusters* por sua vez agrupou os animais, independente do tratamento ao qual pertenciam, pela ingestão de nutrientes por unidade de peso metabólico.

Desta forma, foram divididos em 3 *clusters*, segundo a semelhança na ingestão de nutrientes. Os nutrientes considerados como variáveis independentes são: ingestão de proteína, ingestão de EM e ingestão de M+C (Tabela 5). Esta análise foi possível, uma vez que os animais apresentavam-se em fase de crescimento e a ingestão de alimento e energia é muito variada, de acordo com fatores individuais. Desta forma os *clusters* foram caracterizados como sendo de baixa, moderada e alta ingestão nutricional, a análise agrupou e identificou os animais com maior similaridade (Tabela 5) (Hair et al., 2009).

Tabela 5. Média e intervalo de confiança (IC) para cada *cluster* de baixa, moderada e alta ingestão de energia metabolizável (IEM) ($\text{g/PV}_{\text{kg}}^{0,67}$), proteína bruta (IPB) ($\text{g/PV}_{\text{kg}}^{0,67}$) e aminoácidos sulfurados (IMC) ($\text{g/PV}_{\text{kg}}^{0,67}$) dos gatos aos 240 dias de idade

Parâmetros	Clusters	N ²	Valores médios	IC ¹	
				Limite inferior	Limite superior
Energia metabolizável (IEM, $\text{g/PV}_{\text{kg}}^{0,67}/\text{d}$)	Baixa	8	132,98	127,97	137,99
	Moderada	11	160,86	153,22	168,50
	Alta	11	182,12	176,66	187,59
Proteína bruta (IPB, $\text{g/PV}_{\text{kg}}^{0,67}/\text{d}$)	Baixa	8	8,92	6,99	10,85
	Moderada	11	13,79	12,29	15,30
	Alta	11	21,03	19,94	22,11
M+C (IMC, $\text{g/PV}_{\text{kg}}^{0,67}/\text{d}$)	Baixa	8	0,28	0,21	0,34
	Moderada	11	0,43	0,38	0,48
	Alta	11	0,67	0,64	0,71

¹IC: intervalo de confiança de 95% para média

²N= número de animais

Para os *clusters* baixa, moderada e alta ingestão de nutrientes, as relações entre energia e proteína bruta (E:P) ingeridas foram de 14,9; 11,7 e 8,7 kcal/g de PB, respectivamente. Para M+C, o mais correto neste caso foi expressar suas concentrações por 1000 kcal de energia metabolizável do alimento, baseando-se na

ingestão alimentar, as quais foram de 2,10; 2,67 e 3,68 g/1000 kcal, respectivamente. Vale ressaltar que a IEM do *cluster* de baixa ingestão ficou abaixo da recomendada pelo NRC (2006), assim como a IPB para este mesmo grupo de animais.

Na Figura 3, está ilustrada a contribuição dos nutrientes nas calorias ingeridas pelos animais, de acordo com o *cluster*. Pode-se verificar que a medida que aumentou-se a ingestão de PB, a ingestão de ENN foi proporcionalmente reduzida. Por outro lado, a ingestão de EE foi mantida semelhante entre os *clusters*.

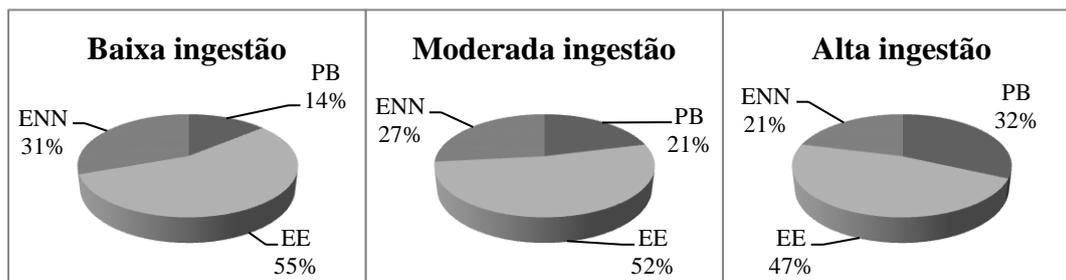


Figura 3. Distribuição das calorias provenientes de proteína (PB), lipídeos (EE) e carboidratos (ENN) nas dietas dos animais pertencentes aos *clusters* de baixa, moderada e alta ingestão

Para verificar a associação da ingestão de PB, M+C e EM com os parâmetros bioquímicos, a Tabela 6 é referente à comparação de médias entre as diferentes variáveis de saúde e crescimento avaliadas. O balanço de nitrogênio (BN), peso médio (PM), ganho de peso (GP), ureia, creatinina total plasmática e creatinina apresentaram diferenças significativas entre os *clusters* ($P < 0,05$). A alta ingestão de proteína apresentou para BN e nitrogênio retido (NR) a maior média, seguida de moderada e baixa ingestão. O PM, creatinina total e GP apresentaram os maiores valores no *cluster* de moderada ingestão ($P < 0,05$).

Tabela 6. Balanço de nitrogênio (BN), indicadores de crescimento e bioquímica sérica de gatos em crescimento de acordo com os *clusters* de baixa, média e alta ingestão de nutrientes e energia metabolizável

	Baixa	Moderada	Alta	EPM	P valor
BN, PV _{kg} ^{0,67} /d ¹	0,58 ^c	0,86 ^b	1,10 ^a	0,46	0,001
GC, % ²	17,21	16,99	16,11	1,13	0,92
MM, % ³	82,79	83,01	83,90	1,13	0,92
Peso médio, kg	2,75 ^b	3,34 ^a	2,86 ^{ab}	0,08	0,01
GP, g ⁴	580,75 ^b	1054,45 ^a	790,64 ^{ab}	65,11	0,01
NR, mg/PV _{kg} ^{0,67} /d ⁵	1027,30 ^c	1388,80 ^b	1581,82 ^a	46,90	0,001
Ureia, mg/dL ⁶	53,87 ^b	59,27 ^b	68,69 ^a	1,82	0,001
Creatinina total, mg ⁷	20,53 ^a	24,47 ^a	18,06 ^{ab}	0,92	0,001
RBP, µg/ml ⁸	104,64	107,28	100,41	3,82	0,76
GSH, µM ⁹	2,69	1,48	2,79	0,42	0,81
GSH:GSSG ¹⁰	0,23	0,22	0,25	0,01	0,77
Creatinina, mg/dL	1,219 ^a	1,18 ^a	0,999 ^b	0,38	0,03
Proteínas totais, g/dL	6,39	6,56	6,51	0,11	0,82

¹BN: balanço de nitrogênio; ²GC: gordura corporal; ³MM: massa magra; ⁴GP: ganho de peso; ⁵NR: nitrogênio retido; ⁶Ureia plasmática; ⁷Creatinina total; ⁸RBP: proteína ligadora de retinol; ⁹GSH: glutatona reduzida; ¹⁰GSH:GSSG: relação glutatona reduzida e oxidada
a-c médias dentro da linha com diferença significativa (P<0,05)

Para verificar a associação da ingestão de PB, M+C e EM com os parâmetros qualitativos de pelagem a Tabela 7, estão apresentadas as comparações dos indicadores de qualidade de pelagem de acordo com o *cluster*. Apenas a ponte dissulfeto diferiu entre eles, sendo os valores inferiores encontrados para o cluster de alta ingestão de PB, M+C e EM, e os maiores para o *cluster* de moderada ingestão.

Tabela 7. Comparação de médias das variáveis de indicadores de pelagem de acordo com as ingestões de baixa, moderada e alta PB, M+C e EM

	Baixa	Moderada	Alta	EPM	P valor
S-S ¹	401,29 ^{ab}	446,86 ^a	321,41 ^b	0,46	0,01
Amida ²	187,01	204,12	181,27	6,09	0,26
Resistência (MPa)	184,05	206,76	178,38	0,01	0,16
Crescimento (mm)	23,54	24,52	25,44	0,56	0,44

¹S-S: ponte dissulfeto realizado pela análise de espectroscopia Raman

²Amida: referente ao conteúdo de proteína realizado pela análise FTIR

a-c médias dentro da linha com diferença significativa (P <0,05)

E para verificar a associação da ingestão de PB e M+C com os parâmetros de composição corporal (Tabela 8), utilizou a interrelação entre as variáveis com os quatro componentes formados (Tabela 4).

Tabela 8. Médias padronizadas e erro padrão da média (EPM) dos *clusters* baixa, moderada e alta ingestão de PB, M+C e EM com os componentes

Fatores	<i>Clusters</i>	N	Média	Desvio padrão	EPM	IC de 95% para média	
						Limite inferior	Limite superior
Indicadores de crescimento	1	8	-0,579 ^b	0,675	0,239	-1,143	-0,014
	2	11	0,578 ^a	1,169	0,353	-0,208	1,363
	3	11	-0,157 ^{ab}	0,743	0,224	-0,656	0,342
	Total	30	0,000	1,000	0,183	-0,373	0,373
Indicadores de saúde	1	8	-0,141	0,988	0,349	-0,968	0,685
	2	11	-0,110	0,754	0,227	-0,617	0,396
	3	11	0,213	1,252	0,378	-0,628	1,054
	Total	30	0,000	1,000	0,183	-0,373	0,373
Indicadores de ingestão de N ¹	1	8	-0,745 ^c	0,698	0,247	-1,328	-0,161
	2	11	-0,367 ^b	0,822	0,248	-0,919	0,186
	3	11	0,908 ^a	0,620	0,187	0,491	1,325
	Total	30	0,000	1,000	0,183	-0,373	0,373
Indicadores de resistência do pelo	1	8	-0,050	1,040	0,368	-0,920	0,820
	2	11	0,306	1,088	0,328	-0,425	1,037
	3	11	-0,270	0,880	0,265	-0,861	0,321
	Total	30	0,000	1,000	0,183	-0,373	0,373

a-c médias dentro da linha com diferença significativa (P <0,05)

Os indicadores de crescimento diferiram significativamente entre os *clusters* de baixa e moderada ingestão, sendo os menores resultados obtidos no *cluster* de baixa e os maiores no *cluster* de moderada ingestão. Os indicadores de ingestão de nitrogênio tiveram efeito significativo na comparação entre os *clusters* de baixa, moderada e alta ingestão, sendo reflexo direto da ingestão de PB crescente dos *clusters*. Por outro lado, os indicadores de saúde (composição corporal e estado oxidativo) e de resistência dos pelos não foram significativamente influenciados pela ingestão de energia ou compostos nitrogenados, apesar de apresentarem indicadores maiores nos *clusters* de moderada e alta ingestão, porém, de forma não significativa.

Nos gráficos da Fig. 4 a seguir, os indivíduos, em seus respectivos *clusters* são posicionados de acordo com sua carga fatorial nos componentes extraídos. É possível, desta forma, verificar a associação positiva ou negativa entre os componentes.

Na Fig.4 A. o *cluster* de baixa ingestão concentrou-se no quadrante III, ou seja, apresentou resposta ruim para os fatores F1 e F2. O *cluster* de moderada ingestão concentrou-se nos quadrantes I e IV, ou seja, apresentou boa resposta em F1 e baixa resposta para F2. Na Fig. 4 B. o *cluster* de baixa ingestão concentrou-se nos quadrantes II e III, apresentando resposta ruim para F3 e F4. O *cluster* de moderada ingestão concentrou-se nos quadrantes de I e II, sendo as respostas ruim para F3 e bom para F4. O *cluster* de alta ingestão concentrou-se nos quadrantes I e IV e apresentou boa resposta para F3 e razoável para F4. Existe uma dispersão relativa dos indivíduos frente aos fatores, devido à variabilidade intrínseca, ou seja, dos indivíduos, não apresentando uma clara marcação dos grupos nos fatores.

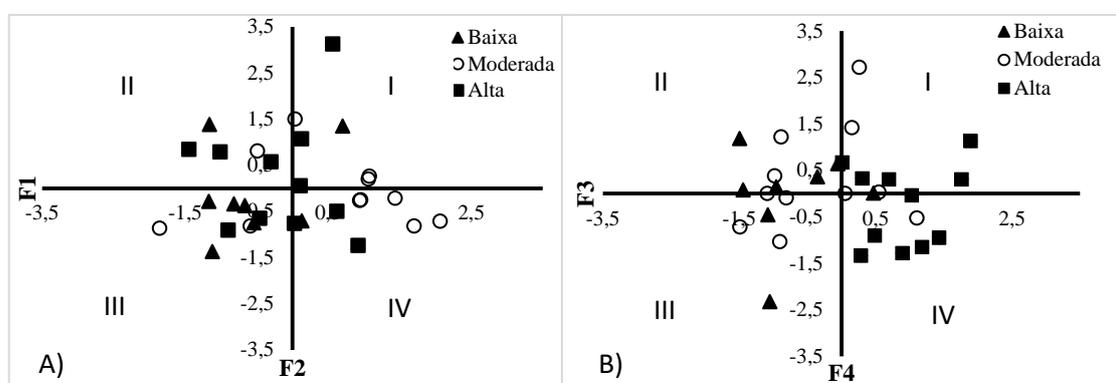


Figura 4. Representação gráfica dos componentes principais (F1 – indicadores de crescimento; F2 – indicadores de saúde; F3 – indicadores de ingestão de compostos nitrogenados; F4 – indicadores de qualidade de pelos), nos quadrantes I, II, III e IV em associação e distribuição dos *clusters*

DISCUSSÃO

Inicialmente, os gatos foram divididos em 6 tratamentos, visando identificar as concentrações de M+C e PB que favorecem melhor composição corporal, qualidade da pelagem, parâmetros bioquímicos e de crescimento nos animais. No entanto, o consumo de ração foi influenciado pelo teor proteico, uma vez que as dietas contendo menores teores de PB foram as menos consumidas, ao passo que as dietas com elevados teores de proteína apresentaram alta ingestão, fato este relacionado à preferência alimentar dos gatos. Sabe-se que os gatos têm maior preferência por dietas com alto conteúdo proteico, principalmente quando estes são compostos por ingredientes de origem animal (Zaghini e Biagi, 2005). Estes animais ainda tendem a

reduzir a ingestão alimentar quando submetidos a dietas que contenham mais de 30% das calorias provenientes dos carboidratos (Hewson-Hughes et al., 2011). Neste estudo, estes dois fatores estiveram presentes nas dietas: a principal fonte proteica das dietas foi a farinha de vísceras de frango, a qual é um ingrediente palatável e, as dietas com menor teor proteico (N1 e N2), possuíam quantidades de amido que superavam 30% do aporte calórico total, comprometendo sua palatabilidade.

Diante deste efeito na ingestão energética, uma análise comparativa entre os tratamentos desconsiderando a IEM não seria correta e optou-se por agrupar os animais estatisticamente pela análise de *cluster*. Foi considerado nessa análise, a semelhança na ingestão dietética dos animais independente do tratamento. A utilização deste procedimento nesta análise de reagrupamento foi possível, uma vez que as dietas foram formuladas pela técnica da diluição, sendo isoenergéticas e com o mesmo teor de nutrientes não calóricos (vitaminas e minerais), diferindo basicamente quanto à distribuição calórica de proteínas e carboidratos. Desta forma, optou-se por definir *clusters* de acordo com a ingestão dietética. Os *clusters* foram denominados como: baixa, moderada e alta ingestão para os nutrientes e energia metabolizável.

A ingestão calórica dos gatos pertencentes ao *cluster* de baixa ingestão foi inferior ao estimado para a idade e peso. De acordo com as recomendações do NRC (2006), estes animais deveriam consumir entre 135 e 160 kcal/PV_{kg}^{0,67} nesta fase da vida (150-240 dias de idade). No entanto, a ingestão calórica dos gatos pertencentes a este *cluster* foi de 132,98 kcal/PV_{kg}^{0,67}. A ingestão proteica também foi abaixo das recomendações, a qual foi de 8,9 g/PV_{kg}^{0,67}, sendo a recomendada mínima de 11,8 g/PV_{kg}^{0,67} (Tabela 5). A baixa ingestão de energia e compostos nitrogenados prejudicou os indicadores de crescimento (peso médio e ganho de peso) (Tabela 6). Por outro lado, a ingestão energética e de nutrientes dos gatos pertencentes aos *clusters* de moderada e alta ingestão encontraram-se acima das recomendações mínimas, de acordo com NRC (2006).

Para animais em crescimento, a relação entre a energia da dieta e todos os nutrientes é fundamental para que o crescimento seja adequado e a deposição proteica eficiente. Neste estudo, a relação energia: proteína (E:P) das dietas dos animais pertencentes aos *clusters* baixa, moderada e alta ingestão foram respectivamente de 14,9, 11,7 e 8,7 kcal/g de PB. Não é reconhecida uma faixa ideal, mas de acordo com as recomendações do NRC (2006), baseando-se na ingestão calórica recomendada e

proteica, esta relação fica próxima a 12,7 kcal/g de PB. Desta forma, apenas os clusters de moderada e alta ingestão ficaram abaixo deste valor.

Apesar dos *clusters* de moderada e alta ingestão terem apresentado respostas fisiológicas semelhantes, alguns indicadores analisados apontam que a relação E:P intermediária favorece o melhor desenvolvimento dos animais, uma vez que estes animais apresentaram os melhores resultados para PM (3,34 vs. 2,86 kg), GP (1054 vs. 750 g), CrTP (24,47 vs. 18,06 mg), S-S (446,86 vs. 321,41) e resistência dos pelos (206,76 vs. 178,38 MPa), ainda que a maior parte destes não foi significativa do ponto de vista estatístico. A ureia sérica para gatos apresenta uma faixa de normalidade entre 10-60 mg/dL (Kaneko et al., 1997). Neste estudo, os animais pertencentes ao *cluster* de alta ingestão apresentaram a concentração de ureia sérica de 68 mg/dL, indicando elevada taxa de desaminação proteica, o que do ponto de vista fisiológico apresenta um custo metabólico alto para o organismo. A maior ingestão de proteína produz alguns ajustes no organismo, como o aumento da oxidação dos aminoácidos e consequentemente a maior excreção, principalmente da ureia (Tomé e Bos, 2000).

Baseando-se nesta melhor resposta integrada dos gatos pertencentes ao *cluster* intermediário e no intervalo de confiança da ingestão de energética e proteica, é possível que teores de proteína na dieta (considerando uma dieta de 4000 kcal/kg) entre 339 à 382 g/kg na MS sejam mais adequados para gatos em crescimento no período estudado (150-240 dias de idade). Por outro lado, concentração de PB entre 230 e 331 g/kg na MS parecem ser limítrofes para o desempenho dos animais, embora não tenham induzido a nenhum sinal clínico ou alteração bioquímica compatível com subnutrição proteica. Portanto, esta última afirmação deve ser cautelosa, uma vez que os animais submetidos a estas dietas tiveram reduzida a ingestão energética, limitando o crescimento.

Apesar da natureza carnívora dos gatos, o desempenho e custo de produção de alimentos podem ser limitados pelo excesso de ingestão calórica ou desbalanço entre a energia e PB da dieta, ainda que os animais sejam altamente adaptados em metabolizar o nitrogênio em excesso. Para espécies aquáticas com elevada exigência de proteína, estas relações são mais estudadas. Reis et al., (1989) verificaram que Catfish alimentados com dietas contendo E:P de 8,3 kcal/g de PB proporcionaram melhor desempenho dos animais. Da mesma forma, Ai et al., (2004) avaliaram relações E:P entre 8 e 12 kcal/g em *Lateobrax japonicus* (Listrado japonês) e verificaram o melhor desempenho zootécnicos em 9,2 kcal/g de PB. A relação E:P mais adequada neste

estudo em gatos ficou entre 11,01 e 12,4 kcal/g de PB, nos animais do *cluster* de moderada ingestão.

Elevada relação entre energia e proteína (E:P), pode favorecer o acúmulo de gordura corporal e obesidade, o que para animais de companhia não é desejável. Por outro lado, para animais de produção uma relação E:P baixa, pode aumentar os custos de produção e a poluição ambiental, uma vez que o excesso de nitrogênio é eliminado no ambiente (Liu et al., 2015). Neste estudo, não foi verificado qualquer efeito da relação E:P dietética, sobre a composição corporal dos animais. No entanto não foi possível tomar decisões baseando-se neste parâmetro importante de saúde. Este fato pode estar relacionado ao concomitante aumento da ingestão de aminoácidos e energia, que podem ter mascarado os resultados.

Uma vez que o *cluster* de elevada ingestão não tenha apresentado melhora no desempenho de saúde dos animais e os resultados tenderam a ser inferiores, quando comparados ao *cluster* de moderada ingestão, a utilização de PB na dieta acima de 45% na MS (considerando uma dieta de 4000 kcal/kg) e sua relação com a energia abaixo 8,8 kcal/g, além de não trazer benefícios à saúde, aumenta os custos de produção de alimentos e ao mesmo tempo, a eliminação de compostos nitrogenados no meio ambiente.

As variáveis de composição corporal, bioquímicas sanguíneas, de qualidade da pelagem e de desempenho zootécnico, foram escolhidas por estarem relacionadas com a ingestão proteica e também de M+C. Uma vez que estes foram limitantes nas dietas na sua relação com a lisina e PB em relação ao preconizado pelo NRC (2006).

Os principais parâmetros associados ao metabolismo dos M+C no organismo são a massa magra, a glutatona e os parâmetros qualitativos de pelagem (em especial S-S). Desta forma, a partir do *cluster* de ingestão moderada, os níveis de M+C pareceram ser adequados para o desenvolvimento dos animais, ou seja, uma ingestão acima de $430 \text{ mg/PV}_{\text{kg}}^{0,67}/\text{d}$. As recomendações do NRC (2006) para M+C são respectivamente $460 \text{ mg/PV}_{\text{kg}}^{0,67}/\text{d}$, resultados próximos aos encontrados neste estudo.

A análise de componentes neste estudo foi importante para associar as variáveis biológicas entre si e conseguir integrar as respostas biológicas com a ingestão de nutrientes. Para o Componente 1 foram agrupados o CP, PM, GP e CrTP, os quais foram positivamente e altamente associados. A CrTP é um preditor da massa magra corporal em animais saudáveis, uma vez que a creatinina é resultante da degradação não enzimática da creatina muscular e apresenta relação direta com a

massa muscular esquelética dos animais. Desta forma, espera-se que quanto maior o GP, maior a CrTP (Schutte et al., 1981).

Para o Componente 2, foram associados a composição corporal e as diferentes formas de glutathiona, reduzida (GSH) e oxidada (GSSG). Foi possível verificar uma associação negativa entre a GC e GSH e GSH:GSSG. Esta relação é esperada, uma vez que o aumento na gordura corporal predispõe a reações de oxidação no organismo (Coppo e Ghezzi, 2011).

No componente 3, foram agrupadas as variáveis indicadoras de ingestão de nitrogênio, como ureia, creatinina e BN. Dietas com alto conteúdo proteico, como dietas de carnívoros, em que farinhas de origem animal podem vir a compor a maior porção, podem aumentar a creatina e a ingestão de creatinina, resultando em aumento da creatinina sérica (Backlund et al., 2011). Neste estudo, o principal ingrediente proteico das dietas foi a farinha de vísceras de frango, a qual pode ter contribuído para a elevada associação entre ingestão de nitrogênio e creatinina sérica.

As ingestões dos nutrientes e energia metabolizável influenciaram na resposta de balanço de nitrogênio e nitrogênio retido, sendo os animais que mais ingeriram nitrogênio, os que mais excretaram e depositaram no corpo. Uma variável que poderia corroborar com esta resposta seria a massa magra, que apesar de apresentar resultado maior para a alta ingestão de PB, M+C e EM, não diferiu estatisticamente dos demais *clusters*, conforme já explicado. Pode ocorrer uma perda de massa corporal magra, em valores absolutos (g ou kg), quando a ingestão de proteínas é abaixo do mínimo, o que ocorreu para o *cluster* 1, o qual apresentou a mesma porcentagem de massa magra, porém, como o PM foi menor, a quantidade absoluta de músculo depositado pelos animais foi menor. A massa corporal magra serve como um reservatório proteico para suportar síntese proteica endógena, principalmente quando a ingestão de energia é insuficiente, como ocorreu no *cluster* 1 (Laflamme e Hannah, 2005)

Finalmente, no Componente 4, as variáveis relacionadas a resistência da pelagem (amida e resistência à tração), as quais apresentaram muito elevada associação. Embora a associação tenha sido baixa ($R = -0,185$) entre o Componente indicador de resistência dos pelos com crescimento do mesmo, é possível assumir que indicadores de crescimento muito elevados podem favorecer a menor resistência do mesmo. Neste estudo, verificou-se redução da resistência dos pelos nos animais pertencentes ao *cluster* de alta ingestão em relação ao *cluster* de moderada ingestão,

apesar de não significativa (178,16 vs. 206,76 MPa), indicando um possível desequilíbrio na relação de E:P ou ainda de M+C.

Os indicadores de crescimento (Componente 1) e de ingestão de compostos nitrogenados (Componente 3) foram significativamente e negativamente afetados pelo *cluster* de baixa ingestão, enquanto a moderada e alta ingestões não diferiram entre si. Isto significa que a ingestão proteica abaixo de 10,85 g/PV_{kg}^{0,67}/d e sua relação com a energia (E:P) acima de 12,7 kcal/g, associada a ingestão de M+C inferior a 340 mg/PV_{kg}^{0,67}/d, não é adequada para gatos em crescimento.

De acordo com o intervalo de confiança (IC) das ingestões de nutrientes neste estudo e a sua associação com indicadores de saúde, conclui-se que dietas que contenham teores de PB acima de 85 g/1000 kcal de EM, relação E:P abaixo de 12,4 kcal/g e teores de M+C acima de 2,8 g/1000 kcal parecem favorecer as condições de saúde de gatos dos 150-240 dias de idade. A ingestão energética abaixo de 153,22 kcal/PV_{kg}^{0,67}/d parece prejudicar o desempenho dos gatos nesta fase de crescimento. Ingestão de PB acima de 19,94 g/PV_{kg}^{0,67}/d e relação E:P abaixo de 8,8 kcal/g não contribuem com a resposta de crescimento, saúde e qualidade da pelagem dos gatos durante o crescimento, dos 150-240 dias. Com estes resultados, este estudo contribui com o estabelecimento de limites de inclusão de PB e M+C em dietas para gatos em crescimento (mínimos e máximos), ainda que mais estudos sejam necessários visando preencher a lacuna de conhecimento existente para a espécie.

LITERATURA CITADA

- Ai, Q. et al. 2004. Effects of dietary protein to energy ratios on growth and body composition of juvenile Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus*. *Aquaculture* 230: 507-516.
- Backlund, B., D. L. Zoran, M. B. Nabity, B. Norby, e J. E. Bauer. 2011. Effects of dietary protein content on renal parameters in normal cats. *J Feline Med Surg* 13: 698-704.
- Ball, R. O., G. Courtney-Martin, e P. B. Pencharz. 2006. The In Vivo Sparing of Methionine by Cysteine in Sulfur Amino Acid Requirements in Animal Models and Adult Humans. *The Journal of Nutrition* 136: 1682S-1693S.
- Barroso, L.P.; Artes, R. Análise Multivariada. In: Simpósio de estatística aplicada à experimentação agrônômica, 2003, Lavras. Anais...Lavras: Universidade Federal de Lavras, Departamento de Ciências Exatas, 2003. p.152.

- Caspers, P. J., G. W. Lucassen, e G. J. Puppels. 2003. Combined In Vivo Confocal Raman Spectroscopy and Confocal Microscopy of Human Skin. *Biophysical Journal* 85: 572-580.
- Chan, K. L. A., S. G. Kazarian, A. Mavraki, e D. R. Williams. 2005. Fourier Transform Infrared Imaging of Human Hair with a High Spatial Resolution Without the Use of a Synchrotron. *Applied Spectroscopy* 59: 149-155.
- Coppo, L., e P. Ghezzi. 2011. Thiol regulation of pro-inflammatory cytokines and innate immunity: protein S-thiolation as a novel molecular mechanism. *Biochemical Society Transactions* 39: 1268-1272.
- Eisert, R. 2011. Hypercarnivory and the brain: protein requirements of cats reconsidered. *Journal of comparative physiology. B, Biochemical, systemic, and environmental physiology* 181: 1-17.
- FAO/WHO, Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization, United Nations University. 2007. Protein and amino acid requirements in human nutrition: report of a joint FAO/WHO/UNU expert consultation, Geneva: World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Fávero, L.P.; et al. Análise Fatorial. In: (Org). Análise de dados: modelagem multivariada para tomada de decisões. Rio de Janeiro-RJ; Elsevier, 2009. p. 235-269
- Fisher, C., e T. R. Morris. 1970. The determination of the methionine requirement of laying pullets by a diet dilution technique. *British Poultry Science* 11: 67-82.
- Galván, I. et al. 2013. Raman spectroscopy as a non-invasive technique for the quantification of melanins in feathers and hairs. *Pigment Cell & Melanoma Research* 26: 917-923.
- Gama, R. M. 2010. Avaliação do dano a haste capilar ocasionado por tintura oxidativa aditivada ou não de substâncias condicionadoras. Dissertação: USP, São Paulo.
- Griffith, O. W. 1980. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal Biochem* 106: 207-212.
- Hair, J.F. et al. *Multivariate data analysis*. 5.ed. New Jersey: Prentice Hall, 1998. 768p.
- Hair, J. F., W. C. Black, B. J. Babin, R. E. Anderson, and R. L. Tatham. 2009. Análise multivariada de dados - 6ed. Bookman.
- Hewson-Hughes, A. K. et al. 2011. Geometric analysis of macronutrient selection in the adult domestic cat (*Felis catus*). *The Journal of Experimental Biology* 214: 1039-1051.
- Kaiser, H. F. 1958. The varimax criterion for analytic rotation in factor analysis. *Psychometrika* 23: 187-200.
- Kakkar, P., B. Madhan, e G. Shanmugam. 2014. Extraction and characterization of keratin from bovine hoof: A potential material for biomedical applications. *SpringerPlus* 3: 596.
- Kaneko, J. J., J. W. Harvey, e M. Bruss. 1997. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Academic Press.
- Kuzuhara, A. 2005. Analysis of structural change in keratin fibers resulting from chemical treatments using Raman spectroscopy. *Biopolymers* 77: 335-344.
- Kuzuhara, A., N. Fujiwara, e T. Hori. 2007. Analysis of internal structure changes in black human hair keratin fibers with aging using Raman spectroscopy. *Biopolymers* 87: 134-140.
- Kuzuhara, A. 2013. Analysis of internal structure changes in black human hair keratin fibers resulting from bleaching treatments using Raman spectroscopy. *Journal of Molecular Structure* 1047: 186-193.

- Laflamme, D. P., e S. S. Hannah. 2005. Increased Dietary Protein Promotes Fat Loss and Reduces Loss of Lean Body Mass During Weight Loss in Cats. *Intern J Appl Res Vet Med* 3.
- Lebart, L., et al. Contiguity Analysis and Classification, In: Gaul,W.; Opitz, O.; Schader, M. (eds), *Data Analysis*, Berlin, Springer, p. 233-244, 2000.
- Liu, Y. et al. 2015. Effects of dietary protein/energy ratio on growth performance, carcass trait, meat quality, and plasma metabolites in pigs of different genotypes. *Journal of animal science and biotechnology* 6: 36.
- NRC. 2006. *Nutrient requirements of dogs and cats* Washington.
- Pielesz, A., e A. Wesełucha-Birczyńska. 2000. The identification of structural changes in the keratin of wool fibre dyed with an azo dye using the Raman and Fourier transform infrared spectroscopy methods. *Journal of Molecular Structure* 555: 325-334.
- Rahman, I., A. Kode, e S. K. Biswas. 2007. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat. Protocols* 1: 3159-3165.
- Reis, L. M., E. M. Reutebuch, e R. T. Lovell. 1989. Protein-to-energy ratios in production diets and growth, feed conversion and body composition of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture* 77: 21-27.
- Schermerhorn, T. 2013. Normal Glucose Metabolism in Carnivores Overlaps with Diabetes Pathology in Non-Carnivores. *Frontiers in Endocrinology* 4: 188.
- Schutte, J. E., J. C. Longhurst, F. A. Gaffney, B. C. Bastian, e C. G. Blomqvist. 1981. Total plasma creatinine: an accurate measure of total striated muscle mass. *Journal of Applied Physiology* 51: 762-766.
- Smith, R.R.; Moreira, V.L.; Latrille, L.L. Caracterización de sistemas productivos lecheros en la X región de Chile mediante análisis multivariable. *Agricultura Técnica*, v. 62, n. 3, p. 375-395, 2002. Disponível em: <http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S036528072002000300004&script=sci_arttext&tlng=es/>. Acesso em: 20 dez. 2016.
- Tomé, D., e C. Bos. 2000. Dietary Protein and Nitrogen Utilization. *The Journal of Nutrition* 130: 1868S-1873S.
- Wojciechowska, E., A. Włochowicz, M. Wysocki, A. Pielesz, e A. Wesełucha-Birczyńska. 2002. The application of Fourier-transform infrared (FTIR) and Raman spectroscopy (FTR) to the evaluation of structural changes in wool fibre keratin after deuterium exchange and modification by the orthosilicic acid. *Journal of Molecular Structure* 614: 355-363.
- Yong, A.G. & Pearce, S. *A Beginner's Guide to Factor Analysis: Focusing on Exploratory Factor Analysis*. *Tutorials in Quantitative Methods for Psychology*, v. 9, n. 2, p. 79-94, 2013.
- Zaghini, G., e G. Biagi. 2005. Nutritional peculiarities and diet palatability in the cat. *Veterinary research communications* 29 Suppl 2: 39-44.