

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Bioquímica e Imunologia

SORGO E DOENÇA EQUIVALENTE À PELAGRA EM PINTOS: ESTUDOS NUTRI-
CIONAIS E CONCENTRAÇÃO INDIVIDUAL DE NUCLEOTÍDEOS DA NICOTINA-
MIDA EM FÍGADOS E ERITRÓCITOS

T
24/78

Edgar Cunha Filho

*Tese apresentada ao Departamento de Bioquímica
e Imunologia do Instituto de Ciências Biológi-
cas da Universidade Federal de Minas Gerais
como um dos requisitos para obtenção do grau
de Doutor em Ciências.*

Belo Horizonte - Minas Gerais

1 9 7 8

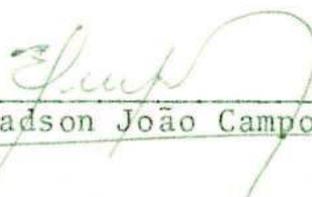
Edgar Cunha Filho

SORGO E DOENÇA EQUIVALENTE À PELAGRA EM PINTOS: ESTUDOS NUTRICIONAIS E CONCENTRAÇÃO INDIVIDUAL DE NUCLEOTÍDEOS DA NICOTINÂMIDA EM FÍGADO E ERITRÓCITOS

Tese realizada no Laboratório de Bioquímica Nutricional do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. APROVADA em 18 de abril de 1978.



Dr. Éder Silva



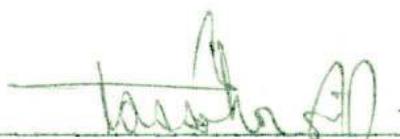
Dr. Egladson João Campos



Dr. George Washington Gomez de Moraes



Dr. Renato Dutra Dias



Dr. Tasso Moraes e Santos
(Orientador)

Esta pesquisa foi realizada com a colaboração financeira das seguintes instituições:

CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO (CNPq)

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA)

FINANCIADORA DE ESTUDOS E PROJETOS (FINEP)

DEDICATÓRIA

Aos meus netos

DANIEL, ANDRÉ e RODRIGO
(e aos que ainda possam vir)

na esperança de que bem cedo passem por
este marco a que eu cheguei bem tarde.

AGRADECIMENTOS

Somos sinceramente gratos

ao nosso Orientador, Dr. Tasso Moraes e Santos, pela orientação eficiente e segura, pela extrema boa vontade e constante disposição para discutir o assunto e ajudar a superar as dificuldades, e por cercar-nos de muito estímulo, muito calor humano e muita amizade;

aos Drs. Eliseu Roberto de Andrade Alves, Paulo de Souza, Ênio Cardillo Vieira, Ricardo Magnavaca, Francisco Geraldo França Teixeira de Castro Bahia e Renato de Oliveira Coimbra, que nos ofereceram apoio em momentos decisivos, sem o qual não teria sido possível realizar ou concluir este curso de pós-graduação;

aos Professores do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB da UFMG pela cooperação e por críticas e sugestões apresentadas durante a execução do trabalho;

à Escola de Veterinária da UFMG e, de modo especial, aos Drs. Egladson João Campos, Ilto José Nunes, Vera Alvarenga Nunes e Nelson Carneiro Baião, do Departamento de Zootecnia, pela cessão de instalações para realização do ensaio bio-

lógico e por sugestões apresentadas;

ao Dr. Robert Eugene Schaffert, do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo, em Sete Lagoas, MG, pelo fornecimento das sementes de sorgo usadas nesta pesquisa;

aos Drs. Wellington Abranches de Oliveira Barros e Benjamin Salles Duarte pela amizade, pelo apoio, pelo estímulo;

ã Dr.^a Maria Antonieta Antunes Cunha, pela revisão do texto da tese em Português, não lhe cabendo, entretanto, qualquer responsabilidade por erros acaso cometidos em modificações introduzidas após a revisão;

aos colegas do Laboratório de Bioquímica Nutricional do ICB da UFMG pela amizade, pelo estímulo, e por fazerem do nosso laboratório um ambiente agradável de trabalho;

aos Srs. Marcelo Eustáquio Silva e Cássio Mário Pereira Costa, e à Sr.^{ta} Aparecida de Fátima Soares de Oliveira, técnicos do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB da UFMG, pelo auxílio prestado em análises químicas;

ã Sr.^a Maria do Rosário Vieira Dias pelo esmero e pela presteza do trabalho de datilografia da tese;

ã minha família (mãe, esposa, filhos, netos, genro, nora, irmãos, sogra, cunhados, tios, sobrinhos e primos) pela compreensão, pelo estímulo, pelo sacrifício.

ÍNDICE

	Pág.
LISTA DE QUADROS	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1. SINTOMAS E LESÕES DA PELAGRA E DA DOENÇA EQUIVALENTE	5
2.2. ETIOLOGIA DA PELAGRA E DA DOENÇA EQUIVALENTE ...	7
2.3. METABOLISMO DOS NUCLEOTÍDEOS DA NICOTINAMIDA ...	7
2.4. DESBALANCEAMENTO E ANTAGONISMO DE AMINOÁCIDOS...	8
2.5. ASPECTOS DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO SORGO	13
2.6. LEUCINA E PELAGRA OU DOENÇA EQUIVALENTE	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1. ENSAIO BIOLÓGICO	21
3.1.01. Animais experimentais	21
3.1.02. Cultivar de sorgo utilizado	21
3.1.03. Dietas experimentais	21
3.1.04. Composição das dietas	22
3.1.05. Delineamento experimental	22
3.2. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO SORGO	24
3.2.01. Umidade	24
3.2.02. Gorduras (extrato etéreo)	24
3.2.03. Cinzas (minerais totais)	25
3.2.04. Cálcio	26
3.2.05. Fósforo	27

	Pág.
3.2.06. <i>Fibras</i>	28
3.2.07. <i>Proteína bruta</i>	30
3.2.08. <i>Aminoácidos não sulfurados, com exceção de triptofano</i>	31
3.2.09. <i>Aminoácidos sulfurados</i>	32
3.2.10. <i>Triptofano</i>	33
3.2.11. <i>Tanino</i>	34
3.2.12. <i>Niacina</i>	35
3.2.13. <i>Carboídratos</i>	39
3.2.14. <i>Energia total</i>	39
3.3. <i>SEPARAÇÃO E CONSERVAÇÃO DO PLASMA E DOS ERITRÓCITOS</i>	40
3.4. <i>CONSERVAÇÃO DOS FÍGADOS</i>	40
3.5. <i>PARÂMETROS NUTRICIONAIS</i>	41
3.5.01. <i>Ganho de peso</i>	41
3.5.02. <i>Consumo de dieta</i>	41
3.5.03. <i>Eficiência alimentar</i>	41
3.5.04. <i>Eficiência proteica</i>	41
3.5.05. <i>Retenção de nitrogênio</i>	42
3.6. <i>PARÂMETROS METABÓLICOS</i>	42
3.6.01. <i>Teor de gordura no fígado</i>	42
3.6.02. <i>Concentração de aminoácidos livres no plasma</i>	42
3.6.03. <i>Concentração de nucleotídeos da nicotinamida no fígado e nos eritrócitos</i>	43
3.7. <i>ANÁLISES ESTATÍSTICAS</i>	46
3.8. <i>REAGENTES E PESAGENS</i>	46
4. <i>RESULTADOS</i>	47
4.1. <i>CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO SORGO E DAS RAÇÕES COMERCIAIS</i>	47

4.2. COMPOSIÇÃO DAS DIETAS EXPERIMENTAIS	48
4.3. SÍNDROME DE DOENÇA EQUIVALENTE À PELAGRA	52
4.4. EFEITOS NUTRICIONAIS DAS DIETAS	54
4.5. AMINOÁCIDOS LIVRES NO PLASMA	57
4.6. GORDURA NO FÍGADO	59
4.7. NUCLEOTÍDEOS DA NICOTINAMIDA NO FÍGADO E NOS ERI- TRÓCITOS	60
5. DISCUSSÃO	65
6. CONCLUSÕES	82
7. RESUMO	85
8. SUGESTÕES PARA NOVAS PESQUISAS	87
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

LISTA DE QUADROS

	Pág.
QUADRO 1. Composição química do sorgo e das rações comerciais para pintos postura (RP) e pintos corte (RC)	48
QUADRO 2. Composição, em g, de 1 kg das dietas S (ã base de sorgo), SN (S + niacina), RPM (ã base de ração comercial para pintos postura misturada com amido), RPML (RPM + L-leucina), isoproteicas e isocalóricas, e da dieta RC (ração comercial para pintos corte) não isoproteica mas isocalórica em relação às outras	50
QUADRO 3. Composição em aminoácidos das dietas S (ã base de sorgo), SN (S + niacina), RPM (ã base de ração comercial para pintos postura misturada com amido), RPML (RPM + L-leucina) e RC (ração comercial para pintos corte), em g/kg de dieta ..	51
QUADRO 4. Relações entre aminoácidos ramificados e total de glicina + serina nas dietas S (ã base de sor <u>g</u> o), SN (S + niacina), RPM (ã base de ração comercial para pintos postura misturada com amido), RPML (RPM + L-leucina) e RC (ração comercial pa <u>r</u> a pintos corte)	53

- QUADRO 5. Efeitos nutricionais das dietas S (ã base de sorgo), SN (S + niacina), RPM (ã base de ração comercial para pintos postura misturada com amido), RPML (RPM + L-leucina) e RC (ração comercial para pintos corte) em pintos em fase inicial de desenvolvimento (média por pinto, em g)..... 55
- QUADRO 6. Aminoácidos livres, em μ moles/ml, no plasma dos pintos alimentados com as dietas S (ã base de sorgo), SN (S + niacina), RPM (ã base de ração comercial para pintos postura misturada com amido), RPML (RPM + L-leucina) e RC (ração comercial para pintos corte) ao fim do primeiro período experimental. 58
- QUADRO 7. Porcentagem de gordura no fígado seco dos pintos alimentados com as dietas S (ã base de sorgo), SN (S + niacina), RPM (ã base de ração comercial para pintos postura misturada com amido), RPML (RPM + L-leucina) e RC (ração comercial para pintos corte) ao fim do primeiro período experimental 61
- QUADRO 8. Concentração de nucleotídeos da nicotinamida e relações entre os nucleotídeos no fígado e nos eritrócitos de pintos alimentados com as dietas S (ã base de sorgo), SN (S + niacina), RPM (ã base de ração comercial para pintos postura misturada com amido), RPML (RPM + L-leucina) e RC (ração comercial para pintos corte), ao fim do primeiro período experimental 62

1. INTRODUÇÃO

A pelagra é uma doença atribuída à deficiência de derivados biologicamente ativos da niacina (1).

Historicamente, a pelagra foi observada em populações alimentadas à base de milho (1, 2), e em 1946 WOOLLEY *et alii* (3) relataram a ocorrência neste cereal de um agente causador da doença. Posteriormente, a associação entre pelagra e consumo de milho foi atribuída, entre outros fatores (infecção, deficiências múltiplas e fatores pelagrosos), à existência, no cereal, de baixo teor de triptofano, precursor da niacina, e de niacina ligada, não utilizável pelos animais (1).

Em 1960 GOPALAN & SRIKANTIA (4) relataram que a ocorrência de pelagra era rara entre os habitantes de Coonoor, na Índia, que se alimentavam à base de arroz, mas freqüente em Hyderabad, uma cidade cujos segmentos pobres da população se alimentavam à base de sorgo. Após compararem o teor de niacina e de aminoácidos do milho, do sorgo e do arroz, estes autores concluíram que as diferenças em relação àquela vitamina e ao triptofano não eram suficientes para explicar, por si só, as diferenças observadas na incidência de pelagra, e sugeriram que a abundância de leucina no milho e no sorgo em relação ao arroz poderia ser um fator importante na etiologia da doença. Entre as pesquisas realizadas para verificação dessa hipótese, algumas forneceram evidências de que o excesso de leucina in-

flui na patogênese da pelagra ou doença equivalente em animais, mas não proporcionaram uma explicação completa dos processos bioquímicos envolvidos, nem eliminaram a possibilidade da participação de outros fatores, enquanto outras apresentaram evidências contrárias à hipótese. RAGHURAMULU *et alii* (5, 6) obtiveram informações sobre o possível mecanismo de ação da leucina: o excesso desse aminoácido na dieta provocou, em eritrócitos humanos, uma alteração na concentração dos nucleotídeos individuais da nicotinamida, mas não na concentração total destes nucleotídeos.

Pelagra é o nome atribuído à doença quando ocorre no homem. Camundongos (3), macacos (4), aves (7, 8) e cães (9) são animais em que se conhece a ocorrência de doença equivalente. Em cães a doença é conhecida pela denominação de língua preta (9).

Foram encontrados na literatura estudos clínicos e patológicos relativos à doença em cães e macacos alimentados com dieta à base de milho ou sorgo. Em aves, cujo consumo de sorgo é de grande importância econômica, existem pesquisas comprovando o efeito prejudicial, sobre o crescimento, do excesso de leucina em relação à isoleucina e à valina (10, 11). Não se mencionou, entretanto, nestas pesquisas, que o desequilíbrio entre os aminoácidos ramificados teria provocado doença equivalente à pelagra, ou alteração na concentração dos nucleotídeos da nicotinamida.

Existem cultivares de sorgo ricos e pobres em tanino, nome genérico atribuído a polímeros fenólicos complexos que conferem resistência à planta contra o ataque de pássaros e de microorganismos (12). Em muitas regiões o ataque de pássaros é tão intenso que o cultivo de sorgos com baixo teor de tanino se torna economicamente inviável. Entretanto, o

tanino interfere prejudicialmente na utilização das proteínas pelos animais (12), fato não considerado nas pesquisas encontradas na literatura relacionando consumo de sorgo com incidência de pelagra ou doença equivalente.

O sorgo, *Sorghum bicolor* (L.) Moench, ocupa o quarto lugar em importância entre os cereais cultivados no mundo, sendo superado, em ordem crescente, pelo milho, arroz e trigo (13). É muito utilizado para alimentação humana nos países em desenvolvimento da Ásia e da África (14). Em países desenvolvidos é usado principalmente para alimentação de animais (14), como substituto do milho, em relação ao qual apresenta, sob o ponto de vista agrônômico, a vantagem de maior resistência à seca e ao calor (15) e, sob o ponto de vista nutricional, de maior teor de triptofano (4, 16) e ocorrência de niacina não metilada. (17).

As rações comerciais à base de milho ou sorgo normalmente não produzem doença equivalente à pelagra. Isso se deve, possivelmente, à suplementação proteica dessas rações. O melhor entendimento dos fatores envolvidos na etiologia da doença e dos mecanismos de ação deles, além da contribuição ao conhecimento científico, poderá fornecer novas perspectivas para o melhoramento genético destes cereais, ou informações que permitam a neutralização dos efeitos desfavoráveis daqueles fatores. A consequência possível, de interesse econômico, será a diminuição de teor proteico das rações, ou o aumento da eficiência das rações com os níveis proteicos atuais.

Nesta pesquisa pretende-se caracterizar quimicamente um cultivar de sorgo pobre em tanino, utilizá-lo como única fonte proteica em dieta para pintos em fase inicial de desenvolvimento, e estudar os efeitos nutricionais, os sintomas

macroscópicos de doenças que ocorrerem, e a variação da con
centração de nucleotídeos individuais da nicotinamida no fíga
do e nos eritrócitos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. SINTOMAS E LESÕES DA PELA- GRA E DA DOENÇA EQUIVALENTE

No homem, a pelagra caracteriza-se por dermatite simétrica bilateral, afetando as partes expostas do corpo (membros superiores e inferiores), pigmentação à semelhança de borboleta na face, dermatite no pescoço, glossite, estomatite angular, alterações mentais e diarréia(16, 18).

No cão, a doença equivalente produz língua preta, redução da ingestão de alimentos, perda de peso, diarréia sanguinolenta e salivação abundante. A saliva, manchada de sangue, e com odor fétido, escorre em fios pela boca. Pode ocorrer paresia dos membros posteriores. À necrópsia, pode-se observar ulceração da mucosa bucal acompanhada de hiperemia e secreção excessiva de muco, filetes espessos de muco aderidos à parede estomacal, e hemorragias puntiformes em vários segmentos do intestino delgado. O duodeno e o jejuno podem, ainda, apresentar diminuição das rugosidades e ulcerações superficiais. Microscopicamente, as secções da mucosa bucal apresentam inflamação crônica, com necrose do epitélio. Alterações degenerativas focais são também vistas no epitélio da língua e do estômago. As alterações no intestino delgado, vistas tanta

to nos segmentos anteriores quanto posteriores, constam de atrofia das vilosidades, hemorragias na lâmina própria e dilatação focal das glândulas. No intestino grosso ocorre reação inflamatória da mucosa com necrose e desaparecimento das glândulas. Essas alterações degenerativas das glândulas são bastante severas, e o epitélio em regeneração caracteriza-se por uma extrema escassez de células caliciformes e ausência de secreção. O fígado pode, às vezes, apresentar metamorfose gordurosa periportal. Na medula espinhal podem ocorrer hemorragias focais na substância cinzenta (16, 19).

Em macacos ocorre alteração da pigmentação da pele, alopecia, perda de peso, diarréia, redução da soro-albumina e hemoglobina, gastrite atrófica e alterações degenerativas na mucosa dos intestinos delgado e grosso (16).

Em aves, as margens das pálpebras se tornam granuladas e se contraem, restringindo a visão, e mais tarde um exudato viscoso faz que as pálpebras fiquem aderidas. Manchas encrostadas formam-se nos cantos da boca. Essas manchas aumentam de tamanho e podem chegar a envolver as margens da pele ao redor das narinas e embaixo da mandíbula inferior. A pele na sola dos pés e entre os dedos descasca, e, onde isso ocorre, aparecem rachaduras que se alargam e aprofundam, fazendo que os pintos sintam dificuldade em andar. O empenamento é retardado, e as poucas penas produzidas são ásperas e arrepiadas. Não ocorre queda de penugem ou de penas, comparável à queda de pelos em ratos (7). Os animais apresentam redução de crescimento, língua preta e inflamação da cavidade bucal, do esôfago e do papo (8). A doença acaba provocando a morte dos animais, e, após a morte, verifica-se, na boca, a presença de uma substância semelhante a pus, e, no estômago, a presença de um exudato branco-acinzentado, enquanto o trato in-

testinal quase não contém resíduos de alimentos não digeridos. O intestino delgado às vezes apresenta hipertrofia, e sua cor freqüentemente varia de amarelo pálido a amarelo escuro. Os rins tendem a se dilatar e apresentam-se de cor cinza-esbranquiçada ou inflamados e hemorrágicos (7).

2.2. ETIOLOGIA DA PELAGRA E DA DOENÇA EQUIVALENTE

Segundo WHITE *et alii* (20), a pelagra foi reconhecida por Gaspar Casal, médico do rei Felipe V, da Espanha, em 1735, e identificada como deficiência nutricional por GOLDBERGER. Posteriormente, GOLDBERGER & WHEELER (21) descobriram a equivalência entre a pelagra e uma doença que ocorria em cães, conhecida como língua preta. Esta descoberta tornou possível a identificação, por ELVEHJEM *et alii* (9), em 1937, do ácido nicotínico como fator cuja deficiência, era responsável pela doença. Anteriormente, WARBURG & CHRISTIAN (22), em 1935, e von EULER *et alii* (23), em 1936, respectivamente, haviam reconhecido o ácido nicotínico como componente do NAD e do NADP. Assim, a função metabólica do ácido nicotínico foi descoberta antes de se conhecer a sua importância nutricional (20).

2.3. METABOLISMO DOS NUCLEOTÍDEOS DA NICOTINAMIDA

A maioria dos tecidos provavelmente utiliza tanto o ácido nicotínico quanto a nicotinamida, para síntese dos nucleotídeos da nicotinamida (24). Mas a síntese pode ocorrer também a partir do triptofano. Em 1945, KREHL *et alii* (25) re

lataram que tanto o ácido nicotínico quanto o triptofano impediam o crescimento retardado de ratos, provocado pela inclusão de 40% de farelo de milho em uma ração de baixo teor proteico, sugerindo a transformação do triptofano em ácido nicotínico no organismo.

A determinação da via metabólica de síntese dos nucleotídeos da nicotinamida a partir do triptofano ou do ácido nicotínico, e da via de degradação desses nucleotídeos recebeu a contribuição dos seguintes pesquisadores: DIETRICH *et alii* (26, 27), DIETRICH & MUNIZ (28), GHOLSON *et alii* (29), HANDLER & FEATHERSTON (30), IJICHI *et alii* (31), KAPLAN *et alii* (32, 33), NISHIZUKA & HAYAISHI (34), PETRACK *et alii* (35), PREISS & HANDLER (36, 37), RICCI & PALLINI (38), CHAYKIN & KIRCHNER (39) e IKEDA *et alii* (40).

O triptofano é convertido em ácido nicotínico pelos pintos, e a quantidade dele necessária para formar ácido nicotínico varia entre pintos. NESHEIM (11) relatou a seleção de duas linhagens de pintos que diferiam em relação à capacidade de crescer com dieta deficiente em ácido nicotínico. A linhagem que mais requeria niacina necessitava de 0,29% de triptofano na dieta para satisfazer tanto o requerimento de triptofano quanto o de niacina, enquanto a que menos requeria niacina necessitava de 0,21%. Quando havia quantidade adequada de niacina na dieta, as duas linhagens requeriam igual teor de triptofano (0,16%).

2.4. DESBALANCEAMENTO E ANTAGONISMO DE AMINOÁCIDOS

A expressão "desbalanceamento de aminoácidos", segundo WILSON *et alii* (41), tem sido usada para descrever con-

dições dietéticas nas quais o aumento do nível de uma proteína de baixa qualidade, ou de um ou mais aminoácidos, resulta em diminuição do crescimento animal.

HARPER *et alii* (42) relataram que o crescimento de ratos alimentados *ad libitum* com uma dieta de baixo teor proteico era retardado, se se adicionava à dieta 3% de L-leucina. A adição de uma pequena quantidade de isoleucina eliminava, em parte, o retardamento do crescimento provocado pelo excesso de leucina, e a adição só de valina não produziu efeito algum (42, 43), mas a adição simultânea de isoleucina e valina eliminou quase completamente o efeito do excesso de leucina (43). Esses resultados sugeriram que o excesso de leucina na dieta agia como antagonista de isoleucina e valina, aumentando a necessidade desses dois aminoácidos. Anteriormente, BRICKSON *et alii* (44), DIEN *et alii* (45) e GLADSTONE (46) haviam demonstrado a existência de competição entre leucina, isoleucina e valina em microorganismos.

SPOLTER & HARPER (47) alimentaram ratos com dieta contendo 9% de caseína, à qual acrescentaram 3, 5 e 7% de L-leucina. O consumo de dieta diminuiu com o aumento do teor de leucina. O retardamento de crescimento provocado pela dieta contendo 5% de leucina foi quase completamente eliminado pela adição de isoleucina e valina, sendo que 0,16% de L-isoleucina mais 0,15% de L-valina foram tão eficientes quanto concentrações muito maiores. O antagonismo entre leucina e isoleucina mais valina diferiu do desbalanceamento de aminoácidos, porque o retardamento devido ao excesso de leucina não foi prevenido pela adição do aminoácido limitante (treonina), mas pela adição de aminoácidos estruturalmente semelhantes. O retardamento de crescimento devido ao excesso de leucina ocorreu também com uma dieta na qual a caseína foi substituída

por uma mistura de aminoácidos, sugerindo que o sítio de antagonismo não era a secreção de pancreozimina, ou qualquer outra fase da digestão proteica. Não se observou influência do excesso de leucina sobre a absorção total de nitrogênio, a retenção de nitrogênio, ou a velocidade de esvaziamento gástrico. A diminuição do apetite não foi, portanto, devido a um retardamento no esvaziamento gástrico. Injeções de insulina neutralizaram a depressão do apetite provocada pelo excesso de leucina em alguns ratos. Quando o consumo de alimentos desses ratos aumentou, cresceram eles mais rapidamente, indicando que o consumo elevado de leucina, por si só, não é tóxico. Parece ter havido um equilíbrio entre os efeitos estimulante da insulina e depressor do excesso de leucina. Se o nível de leucina não fosse muito alto, o estímulo do apetite pela insulina poderia resultar na ingestão de uma quantidade extra de isoleucina e valina, suficiente para superar o antagonismo da leucina. Com altos níveis de leucina, entretanto, o apetite foi tão severamente diminuído que a maioria dos ratos não comeu o suficiente para prevenir um severo choque hipoglicêmico. Os autores encontraram as seguintes evidências de que o menor consumo de alimentos não foi devido à palatabilidade da dieta:

- 1) ratos mantidos durante 4 dias com dieta sem proteína, e deixados sem comer durante 1 noite, comeram tanta dieta com 5% de L-leucina quanto o grupo controle, durante 3 horas ;
- 2) ratos treinados a comer toda a dieta diária em 2 h comeram, no primeiro dia, a mesma quantidade de dieta com 5% de L-leucina que os ratos controle, a cuja dieta havia sido adicionado isoleucina e valina, e
- 3) pequenas quantidades de isoleucina e valina eliminaram a depressão do apetite. Baseados nessas evidências os autores sugeriram que a ingestão de leucina em excesso provoca alterações metabólicas e fisiológicas que

afetam, em poucas horas, o consumo de alimentos, ocasionando uma diminuição no crescimento. Comentaram, ainda, que a regulação do consumo de alimentos pelos animais é um mecanismo homeostático importante, cuja natureza exata permanece obscura, e que muitos autores, apesar de reconhecerem a importância do mecanismo glucostático na regulação, consideram pouco provável que qualquer fator exerça papel dominante. MELLINKOFF sugeriu que o padrão de aminoácidos do sangue é um dos fatores que influenciam o apetite (48), e os resultados de um estudo preliminar indicaram que um alto nível de leucina na dieta afetou consideravelmente aquele padrão em ratos (47).

D'MELLO & LEWIS (49) demonstraram que, com 0,77 % de valina na dieta, o crescimento de pintos diminuiu quando o teor de leucina foi elevado de 1,4 para 2,4%. O crescimento pôde ser restaurado elevando-se o teor de valina para 0,89%. Do mesmo modo, se a dieta continha 0,58% de isoleucina, a elevação do teor de leucina para 2,15% diminuía o crescimento. Essa diminuição podia ser evitada, aumentando-se o teor de isoleucina na dieta para 0,68%.

HILL *et alii* (50) relataram que a adição de 15% de zeína a uma dieta contendo 9,5% de proteína de soja reduziu significativamente o ganho de peso e o consumo de alimento de pintos, tendo provocado uma acentuada diminuição (64%, em média) no teor de lisina do plasma desproteínizado, diminuições menores nos níveis de arginina, glicina, histidina e triptofano, e aumento do teor de isoleucina, leucina, treonina e valina. Os autores sugeriram que a redução do teor de lisina do plasma possa estar relacionada ao fato de que a lisina era limitante para o crescimento na dieta contendo zeína, e que o grau de diminuição de um aminoácido no plasma possa estar relacionado à sequência em que ele é limitante. Essas

sugestões foram fundamentadas na observação de que os níveis de triptofano e arginina, que pareciam ser o segundo e o terceiro aminoácidos limitantes na zeína, foram reduzidos quando a dieta contendo zeína foi suplementada com excesso de lisina, mas não quando a dieta sem zeína foi suplementada. Uma redução do nível de triptofano do plasma foi encontrada também quando 15% de gelatina, em vez de zeína, foram adicionados à dieta de baixo teor proteico, produzindo uma dieta cuja deficiência em triptofano era limitante para o crescimento. O aumento de treonina no plasma provocado pela adição de 15% de zeína foi muito alto, fato não esperado pelos autores. CHARKEY *et alii* (51, 52) sugeriram que a treonina é relativamente resistente à desaminação pelos pintos, e se acumula no plasma quando as condições favorecem sua entrada nele, mas não a sua utilização para a síntese de novos tecidos. HILL *et alii* (50) verificaram que a adição, à dieta padrão, de aminoácidos individuais que ocorriam em maior proporção na zeína produziu resultados não coincidentes com o obtido com a zeína. A adição de leucina, por exemplo, diminuiu a concentração de arginina, histidina e triptofano no plasma, mas não provocou aumento da concentração de isoleucina, leucina e valina nem diminuição da concentração de lisina. Os autores comentaram que é difícil explicar, satisfatoriamente, os resultados. Uma possibilidade seria a existência de um mecanismo metabólico operando no sentido de manter, dentro dos tecidos, uma mistura de aminoácidos o mais próximo possível das proporções ótimas para a síntese de proteínas. Se o equilíbrio for perturbado pela adição de um ou mais aminoácidos à dieta, aqueles cujas concentrações se tornarem desproporcionalmente baixas serão retirados do plasma pelos tecidos em maior velocidade. Mas, se o tecido pode retirar quantidades adicionais de um aminoácido, quan

do a necessidade aumenta, talvez não possa impedir a entrada de quantidades excessivas. Se essa hipótese for correta, a diminuição observada na concentração de lisina, triptofano e arginina no plasma representaria a tentativa dos tecidos de manter, o mais próximo possível, um equilíbrio ótimo de aminoácidos frente a um padrão modificado oferecido pelo plasma. Com relação ao ganho de peso, a adição de zeína não teve efeito quando feita desde o primeiro dia, embora se tenha verificado o efeito redutor da zeína sobre a concentração de lisina no plasma. Os dados sugeriram que as aves possam ajustar-se à dieta com zeína depois de certo período de tempo.

2.5. ASPECTOS DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO SORGO

GOPALAN & SRIKANTIA (4), analisando dados da literatura, observaram que o milho, o sorgo e o arroz não apresentavam diferenças sensíveis quanto aos teores de isoleucina e ácido nicotínico. O teor de triptofano de diferentes cultivares de sorgo variava muito, alguns apresentando, aproximadamente, teores tão altos quanto os de cultivares de arroz, e outros tão baixos quanto os de cultivares de milho. Mas o milho e o sorgo possuíam, como característica comum, um alto teor de leucina.

GOPALAN (16) relatou que a comparação entre os cultivares de sorgo consumidos pela população de Hyderabad com cultivares de milho e arroz utilizados na Índia ao tempo em que foram feitas as observações sobre a ocorrência de *pella* revelou que o teor de ácido nicotínico do sorgo era próximo do teor de ácido nicotínico do arroz. O teor de triptofano do sorgo era próximo, também, do teor de triptofano do arroz,

mas superior ao do milho, sendo 0,9, 0,4 e 0,8 g/16 g de N proteico, respectivamente, os valores para arroz, milho e sorgo. A ocorrência de pelagra na população de Hyderabad não poderia, portanto, ser atribuída ao teor de triptofano do sorgo. Por outro lado, o teor de leucina nos cultivares de sorgo variava de 11,4 a 15,5 g/16 g de N, e nos cultivares de milho, de 12,3 a 13,3 g/16 g de N. Esses teores de leucina eram elevados em relação à média de 8 g/16 g de N do arroz, determinada por BALASUBRANIAN *et alii*, conforme citação de GOPALAN & SRIKANTIA (4).

O ácido nicotínico, no milho, encontra-se sob forma metilada (trigonelina), não utilizável pelo organismo (16, 20), enquanto no sorgo encontra-se sob forma não metilada, utilizável (16, 17). O tratamento do milho com óxido de cálcio ou hidróxido de cálcio libera o ácido nicotínico (53). A relativa raridade da pelagra na América Central, onde o milho é a base alimentar, tem sido atribuída ao tratamento do milho com calcáreo (16), embora se tenha produzido pelagra experimentalmente tanto com milho tratado quanto com milho não tratado com calcáreo (54).

O primeiro aminoácido limitante nas proteínas do sorgo é a lisina (55).

O teor de tanino nos cultivares de sorgo é variável, tendo sido encontrados na literatura valores até 13,7 equivalentes de catequina por 100 g de peso seco (56). AXTELL *et alii* (55) classificaram como de baixo teor os cultivares com menos de 1 equivalente.

Os taninos formam complexos com as proteínas no tubo digestivo dos animais, diminuindo a absorção delas (12). STRUMEYER & MALIN (57) demonstraram que um extrato de grãos de sorgo em etanol continha taninos oligoméricos condensados,

e inibia a atividade da alfa-amilase, de esterases e carboxilases, enquanto TAMIR & ALUMOT (58) verificaram que as enzimas digestivas (tripsina, alfa-amilase e lipase) eram inativadas devido a uma ligação não específica do tanino com a enzima ou o substrato. A atividade podia ser restaurada em alguns casos com a adição de polivinilpirrolidona, que substituíria a proteína na ligação com o tanino. FEENY, citado por McLEOD (12) constatou, *in vitro*, que 83% da caseína eram hidrolisados pela tripsina de mamíferos, mas quando a caseína estava complexada a taninos, somente 1% era hidrolisado. Entretanto, GLICK & JOSLYN (59) constataram que a maior parte do nitrogênio nas fezes de ratos alimentados com dieta contendo tanino provinha de enzimas e outras proteínas endógenas, e não de proteínas da dieta. Esses mesmos autores (60) verificaram que a adição de 1 a 8% de ácido tânico à ração reduzia o ganho de peso de ratos. CHANG & FULLER (61) alimentaram pintos com dieta contendo 50% de sorgo, e, além de uma ligeira redução na digestibilidade das rações contendo sorgo com alto teor de tanino, verificaram que a diminuição de crescimento provocada por cultivares contendo 2% de tanino era semelhante à provocada pela adição de níveis equivalentes de ácido tânico. VOHRA *et alii* (62) observaram que o tanino provocava redução da ingestão de alimentos e reduzia a retenção de nitrogênio em pintos. CONNOR *et alii* (63) relataram que quanto maior o teor de tanino nos grãos de sorgo, menor a ingestão de alimentos e a eficiência alimentar em pintos.

SCHAFFERT *et alii* (56), em sua revisão bibliográfica, citaram que FULLER *et alii* concluíram que o crescimento de pintos era retardado quando o tanino contido nos grãos de sorgo excedia 0,8% da dieta total; STEPHENSON *et alii* não encontraram diferença no crescimento de pintos alimentados com

cultivares de sorgo contendo alto e baixo teor de tanino quando a participação do sorgo na ração não excedia 60%; HALLORAN & MAUNDER não observaram diferença na aceitação de milho, sorgo com alto ou com baixo teor de tanino por pintos, mas a conversão alimentar do sorgo com alto teor de tanino foi menor; e ROSTAGNO verificou que pintos alimentados com dieta de teor proteico abaixo do nível ótimo apresentaram menor ganho de peso e menor conversão alimentar quando a dieta era preparada com sorgo de alto teor em tanino do que quando preparada com sorgo de baixo teor, e que a disponibilidade dos aminoácidos de um híbrido com baixo teor de tanino diminuiu quando se adicionou ácido tânico à ração. Observou também que, com cultivares contendo alto teor de tanino a disponibilidade de aminoácidos era cerca de 66% menor que com cultivares de baixo teor. O ganho de peso e a eficiência alimentar das dietas com sorgo de alto e baixo teor de tanino aumentaram quando foram adicionados aminoácidos essenciais, mas a suplementação não eliminou completamente o efeito do tanino.

DAMRON *et alii* (64) não observaram diferença entre dietas à base de milho e dietas em que 50% do milho foi substituído por sorgo com alto ou baixo teor de tanino na alimentação de frangos com 5 semanas de idade.

Verificou-se que a ocorrência de tanino no sorgo está associada com um aumento do teor de prolaminas, pobres em lisina, e uma diminuição do teor de albuminas e globulinas (65).

SCHAFFERT *et alii* (66) formularam 4 dietas básicas utilizando, em cada uma, um cultivar de sorgo diferente, caracterizado pelo teor de tanino e proteína. Os 4 cultivares apresentavam, respectivamente, baixo teor de tanino e baixo teor de proteína, baixo teor de tanino e alto teor de proteí-

na, alto teor de tanino e baixo teor de proteína, e alto teor de tanino e alto teor de proteína. Em 100 g de cada dieta básica haviam 79 g de sorgo, 4 g de mistura mineral, 2 g de vitaminas e 15 g de amido de milho. Substituindo-se 5, 10 e 15 g de amido por quantidade igual de farinha de soja contendo 53,25% de proteína, foram obtidos, para cada dieta, 4 níveis de suplementação proteica, sendo que um deles correspondente à ausência de suplementação. As 16 dietas obtidas foram utilizadas, durante 13 dias, para alimentação de ratos desmamados. De modo geral, os ratos alimentados com as dietas à base de sorgo com alto teor de tanino tiveram menor ganho de peso, menor eficiência alimentar e menor eficiência proteica. O consumo de uma das dietas à base de um cultivar de sorgo com alto teor de tanino foi muito grande, e o fato foi atribuído ao elevado teor de amilopectina do endosperma ceroso. Não houve interações desfavoráveis entre os cultivares de sorgo e as suplementações proteicas em relação aos parâmetros avaliados, indicando isso que a proteína da farinha de soja pode ser utilizada em programas de avaliação biológica sem alterar o efeito dos diferentes genótipos do sorgo.

2.6. LEUCINA E PELAGRA OU DOENÇA EQUIVALENTE

Diversas pesquisas foram realizadas com a finalidade de observar o efeito do excesso de leucina sobre a concentração de metabolitos do triptofano e da niacina na urina de seres humanos e de animais. Alguns autores (4, 67, 68) observaram aumento de N¹-metilnicotinamida e ácido quinolínico, e diminuição de 6-piridona, ácido indolacético e 5-hidroxiindolacético, mas outros (69, 70) não conseguiram observar tais

diferenças. A análise conjunta dos resultados sugere que o excesso de leucina não interfere com a concentração desses metabolitos na urina.

A administração oral de L-leucina a dois pacien - tes com pelagra (10 g duas vezes ao dia, em um caso, e três vezes ao dia em outro) provocou uma deterioração temporária de suas condições mentais. Os pacientes recebiam 45 g de proteí - na diariamente, a maior parte dela fornecida pelo sorgo. Aque - la deterioração foi revertida interrompendo-se a ingestão da leucina e administrando-se ácido nicotínico (4).

BELAVADY & GOPALAN (71) induziram língua preta em cães alimentados com dieta contendo 65% de sorgo, ou com die - ta semelhante na qual o sorgo foi substituído por milho. Al - guns animais do grupo que recebia dieta com sorgo, e que apre - sentavam língua preta, foram tratados com ácido nicotínico, en - quanto alimentados com a mesma dieta, e os sintomas da doença foram completamente revertidos.

BELAVADY *et alii* (19) relataram terem encontrado evidências de que a língua preta por eles induzida em cães era especificamente atribuível ao excesso de leucina na die - ta. Cães jovens alimentados com dieta contendo 21% de ca - seína, que fornecia 1,8% de leucina, e à qual foram adiciona - dos, 1,8% de leucina, de modo que o total desse aminoácido na dieta passasse a ser de 3,6%, desenvolveram os sintomas de língua preta. Cães jovens alimentados com dieta completa (contendo 18% de caseína e 1,5% de leucina fornecida por ela), e recebendo uma suplementação oral de ácido nicotínico na pro - porção de 300 µg/kg/dia, também desenvolveram os sintomas de deficiência de ácido nicotínico quando se adicionou leucina à dieta, na proporção de 1,2%. Em ambos os casos, os animais controle, recebendo as mesmas dietas sem suplementação de leu

cina, permaneceram saudáveis durante todo o período experimental. Estudos histopatológicos mostraram que as modificações observadas nos animais alimentados com dieta à base de sorgo (71) eram idênticas às dos animais alimentados com dieta à base de caseína suplementada com leucina (19).

Outra evidência sobre a participação da leucina na produção de língua preta em cães foi obtida por GOPALAN *et alii* (72). Dietas à base de milho normal, contendo alto teor de leucina, e à base de milho opaco-2, com baixo teor de leucina, ambas com suplementação de caseína, foram utilizadas para alimentação de cães. A doença equivalente à pelagra ocorreu em todos os cães alimentados com a dieta à base de milho normal, mas em apenas um dos seis cães alimentados com a dieta à base de milho opaco-2.

KRISHNASWAMY & GOPALAN (18) verificaram que a isoleucina pode contrabalançar o efeito do excesso de leucina na dieta. Pacientes portadores de pelagra, mantidos com dieta à base de sorgo, que fornecia 2000 Kcal e 54 g de proteína por dia (46 g fornecidas pelo sorgo) tiveram suas condições de saúde restabelecidas em 15 dias com a adição de 5 g por dia de D-L-isoleucina. Estudos eletroencefalográficos indicaram que a suplementação com isoleucina reverteu e corrigiu as anormalidades induzidas pela suplementação de leucina.

MANSON *et alii* (73), entretanto, não conseguiram reproduzir os resultados obtidos por KRISHNASWAMY & GOPALAN (18), não tendo encontrado qualquer indicação de que a leucina tenha efeito anti-nicotínico. Também ALLEN *et alii* (10) não conseguiram desenvolver deficiência de niacina em pintos com excesso de leucina na dieta.

RAGHURAMULU *et alii* (5) verificaram que as concentrações de nucleotídeos da nicotinamida em eritrócitos de in-

divíduos portadores de pelagra não eram menores que as de indivíduos normais, mas que a capacidade dos eritrócitos de sintetizar esses nucleotídeos *in vitro* era significativamente menor nos portadores de pelagra. A administração oral de 10 g/dia de L-leucina durante 5 dias diminuiu a capacidade de síntese dos eritrócitos tanto nos indivíduos normais quanto nos doentes, mas isso não foi acompanhado por modificações na concentração de nucleotídeos dos eritrócitos. O ácido quinolínico produziu uma inibição significativa na síntese de nucleotídeos da nicotinamida *in vitro*. Essa inibição foi parcialmente eliminada aumentando-se a concentração de ácido nicotínico do meio.

SRIKANTIA *et alii* (6) não observaram diferença na concentração total de nucleotídeos da nicotinamida nos eritrócitos de indivíduos normais e portadores de pelagra, mas encontraram diferenças significativas em relação à concentração de nucleotídeos individuais. Os eritrócitos dos portadores de pelagra continham maior quantidade de NMN que os eritrócitos dos indivíduos normais, enquanto os níveis de NAD e NADP tendiam a diminuir nos portadores de pelagra, quando comparados aos níveis dos indivíduos normais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ENSAIO BIOLÓGICO

3.1.01. *Animais experimentais.* Foram utilizadas fêmeas da marca comercial Cobb, para corte, com 1 dia de idade, auto-sexáveis, adquiridas da firma Anaves Lt.^{da} (Belo Horizonte, Minas Gerais), vacinadas no dia do nascimento contra a doença de Marek. No 8.^o dia de vida foram vacinadas contra a doença de Newcastle.

3.1.02. *Cultivar de sorgo utilizado.* Foi utilizado o cultivar E-57a, com baixo teor de tanino. As sementes foram multiplicadas pelo Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo (CNPMS), em Sete Lagoas, Minas Gerais. Este cultivar foi caracterizado quimicamente através da determinação dos teores de umidade, gorduras (extrato etéreo), cinzas, cálcio, fósforo, fibras, proteína bruta, aminoácidos, tanino, niacina e carboidratos.

3.1.03. *Dietas experimentais.* Foram testadas 5 dietas:

S - Dieta contendo 11,6% de proteína, cuja única fonte proteica era o sorgo.

SN - Dieta S suplementada com ácido nicotínico (25 mg/kg).

- RPM - Dieta isoproteica e isocalórica em relação às dietas S e SN, formada pela mistura de ração comercial para pintos postura com amido de milho (maizena).
- RPML - Dieta RPM suplementada com 1% de L-leucina do 1.º ao 18.º dia, e com 3% do 19.º ao 29.º.
- RC - Ração comercial para pintos corte, não isoproteica (22,5% de proteína) mas isocalórica em relação às dietas S, SN, RPM e RPML.

3.1.04. *Composição das dietas.* As rações comerciais para pintos postura e corte foram fabricadas por Cargill Agrícola S.A. (Santa Luzia, Minas Gerais), e continham os seguintes ingredientes: quirera de milho (55%), farelo de trigo, farinha de glúten de milho, farelo de soja tostada, alfafa moída, farinha de carne, farinha de peixe, farinha de sangue, carbonato de cálcio, farinha de ossos, sal e pré-mistura mineral e vitamínica (composição fornecida pelo fabricante).

A composição química porcentual das rações comerciais, juntamente com a do sorgo, encontra-se no quadro 1, e a composição química de 1 kg das dietas S, SN, RPM, RPML e RC, no quadro 2. O quadro 3 apresenta o aminograma das dietas S, SN, RPM, RPML e RC. A dosagem dos aminoácidos foi feita conforme descrito nos itens 3.2.08, 3.2.09 e 3.2.10.

3.1.05. *Delineamento experimental.* Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, com 4 repetições (74, 75). Cada repetição constituiu-se de 12 pintos, em virtude da grande variabilidade individual em relação ao ganho de peso normalmente verificada entre pintos de uma mesma linhagem. Os 12 pintos de cada repetição foram tomados ao aca-

so, mas obedecendo-se ao requisito pré-estabelecido de que o peso de cada grupo de 12 pintos deveria ser aproximadamente igual no primeiro dia do experimento. Para que este requisito pudesse ser satisfeito, foram feitas trocas de pintos entre os grupos, até que a igualdade aproximada de peso fosse alcançada. A amplitude de variação de peso dos grupos foi de 467,5 a 470,5 g.

Os pintos de cada repetição foram colocados, respectivamente, em baterias metálicas de 1m x 1m, aquecidas com lâmpada de 60 W x 120 V. As dietas, e água, foram servidas *ad libitum*, em comedouros e bebedouros colocados lateralmente às baterias. O ensaio biológico durou 29 dias, dos quais foram considerados dois períodos distintos: do 8.^o ao 18.^o dia (1.^o período), e do 18.^o ao 29.^o dia (2.^o período).

Para cada um dos períodos determinou-se o ganho médio de peso e o consumo médio de dieta por pinto em cada repetição. As fezes em cada repetição, no primeiro período, foram coletadas, secadas em estufa a 100°C durante 12 h, e analisadas para determinação dos respectivos teores de nitrogênio pelo método de Kjeldahl, conforme se acha descrito no item 3.2.07, com as seguintes exceções: foram utilizadas amostras secas com 2 g de peso e balões Kjeldahl de 500 ml, fazendo-se análise em duplicado para cada repetição.

No 18.^o dia, depois das pesagens, foram retirados, ao acaso, 5 pintos de cada repetição, os quais, após colheita de sangue, foram sacrificados para retirada dos fígados. No 2.^o período do experimento, portanto, cada repetição continha 7 pintos, com exceção das repetições RC3, RPML2, RPML4 e S4, que continham 6, devido à morte de um pinto, em cada uma delas, entre o 1.^o e o 7.^o dia.

3.2. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO SORGO

3.2.01. *Umidade*. Foi utilizado o método descrito pela A.O.A.C. (76).

Colocou-se, em pesa-filtro tarado, uma amostra, pesando 5 g, de sorgo moído a 40 mesh, e deixou-se o pesa-filtro, destampado, em estufa a 105°C durante 16 h. Ao ser retirado da estufa, o pesa-filtro foi tampado e colocado em dessecador, onde permaneceu até atingir a temperatura ambiente, para então ser pesado juntamente com a amostra. A porcentagem de umidade foi calculada pela fórmula

$$\%U = \frac{(PF + AU) - (PF + AS)}{5} \times 100$$

em que %U = porcentagem de umidade; PF = peso do pesa-filtro ; AU = peso da amostra úmida; AS = peso da amostra seca.

Essa determinação foi feita em 9 amostras do sorgo tomadas ao acaso.

3.2.02. *Gorduras (extrato etéreo)*. Foi utilizado o método descrito pela A.O.A.C. (76).

A amostra de sorgo seca obtida no processo de determinação de umidade (item 3.2.01) foi colocada, com o auxílio de um pincel, em um cartucho de papel de filtro grosso, que, por sua vez, foi colocado no aparelho de Soxhlet, para extração das gorduras com éter etílico, sob refluxo, durante 8 h. As gorduras, dissolvidas em éter, foram recolhidas em um balão de fundo chato. Após a extração, destilou-se o éter contido no balão. Deixou-se que as gorduras secassem, à temperatura ambiente, e depois em estufa a 105°C durante 1 h. A porcentagem de gordura foi calculada pela fórmula

$$\%G = \frac{(PB + PG) - (PB)}{PS} \times 100$$

em que %G = porcentagem de gordura; PB = peso do balão; PG = peso das gorduras e PS = peso da amostra seca.

Essa determinação foi feita em 10 amostras de sorgo, tomadas ao acaso.

3.2.03. *Cinzas (minerais totais)*. Foi utilizado o método descrito pela A.O.A.C. (76).

Determinou-se o teor de umidade (conforme descrito no item 3.2.01) de uma amostra, pesando 2 g, de sorgo moído a 40 mesh, e transferiu-se a amostra seca, com o auxílio de um pincel, para um cadinho previamente tarado. Colocou-se o cadinho em mufla a 600°C, a princípio com a tampa aberta, até completa carbonização da amostra, e depois com a tampa fechada, até completa incineração. Se, depois de 1 h, ainda havia matéria carbonizada, tirava-se o cadinho da mufla e deixava-se esfriar; adicionava-se a ele 1 ml de H₂O₂ a 3% (10 volumes), misturava-se com bastão de vidro, lavando-o, no final, com pequena porção de H₂O₂; secava-se em estufa a 105°C, e colocava-se novamente na mufla a 600°C para completa incineração. A porcentagem de cinzas foi calculada pela fórmula

$$\%C = \frac{(Pc + PC) - (Pc)}{PS} \times 100$$

em que %C = porcentagem de cinzas; Pc = peso do cadinho; PC = peso das cinzas e PS = peso da amostra seca.

Essa determinação foi feita em 11 amostras de sorgo, tomadas ao acaso.

3.2.04. *Cálcio*. Foi utilizado o método descrito pela A.O.A.C. (76).

As amostras de cinza obtidas, conforme descrito no item 3.2.03, foram misturadas duas a duas, transferindo-se as cinzas para béqueres de 200 ml e lavando-se os cadinhos com uma mistura de 20 ml de HCl 50% com 1 ml de HNO₃ concentrado. A dosagem foi feita em 3 destas misturas. Os béqueres foram cobertos com vidro de relógio e aquecidos brandamente. Após diluição com cerca de 10 ml de água destilada, as soluções foram filtradas em papel de filtro SS 589¹ para balões volumétricos de 250 ml, completando-se o volume com água destilada. Foram tomados, de cada balão, 50 ml, e colocados em béqueres de 250 ml, os quais foram aquecidos brandamente. A cada um deles foram adicionados 25 ml de oxalato de amônio a 4,2%, em ebulição, e 3 gotas de vermelho de metila. Mantendo-se a temperatura entre 70 e 80°C, as soluções foram neutralizadas com NH₄OH 50% (v/v), adicionado gota a gota e agitando-se a solução, até a viragem do indicador (coloração ligeiramente amarela) e formação de precipitado branco. Deixou-se em repouso durante 1 h, à temperatura ambiente, filtrou-se em papel de filtro SS 589¹ e lavou-se com NH₄OH 1:50 (v/v) até que, recolhendo-se cerca de 1 ml de filtrado que escoava pelo funil, e adicionando-se 1 gota de AgNO₃ 1 N e 1 gota de HNO₃ 50% (v/v), não houvesse formação de precipitado de AgCl. Os papéis de filtro contendo os precipitados foram colocados novamente nos respectivos béqueres, aos quais foram adicionados cerca de 100 ml de água destilada e 10 ml de H₂SO₄ 50% (v/v). Cada béquer foi aquecido entre 70 e 80°C, e, após completa dissolução do precipitado, a solução nele contida foi titulada com KMnO₄ 0,1N, até que o aparecimento de uma coloração rosa claro permanecesse por alguns segundos (cerca de 10 segundos). No final da titulação, a tempe-

ratura deverá ter abaixado, no mínimo, para 55 a 60°C. O cálculo do teor de cálcio é baseado no fato de que a 1 ml de KMnO_4 0,1N utilizado na titulação correspondem 0,002004 g de cálcio. A porcentagem de cálcio foi calculada pela fórmula

$$\% \text{Ca} = \frac{0,002004V}{\text{PS}} \times 100$$

em que %Ca = porcentagem de cálcio; V = volume de KMnO_4 0,1N, em ml, gastos na titulação e PS = peso da amostra seca.

3.2.05. *Fósforo*. Foi utilizado o método descrito pela A.O.A.C. (76).

Solução padrão de fósforo, contendo 0,1 mg de P por ml: 0,4394 g de KH_2PO_4 puro e seco foram dissolvidos numa mistura de 300 ml de água destilada com 200 ml de H_2SO_4 1 N. Foram adicionadas 5 gotas de KMnO_4 2%, como preservativo, e completou-se o volume para 1 litro, em balão volumétrico.

Reagente de molibdato de amônio (AMR): 12,5 g de molibdato de amônio foram dissolvidos em cerca de 100 ml de água destilada, em um béquer. A solução foi transferida para balão volumétrico de 500 ml contendo 150 ml de H_2SO_4 10 N, completando-se o volume com água destilada. Guardou-se a solução em refrigerador.

Reagente de ácido amino-naftol-sulfônico (ANSA): a 250 mg do ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfônico foram adicionadas 2 gotas de bissulfito de sódio a 15%, fazendo-se uma pasta, à qual foram adicionados 97,5 ml de bissulfito de sódio a 15% e 2,5 ml de sulfito de sódio a 20%. Tendo havido dissolução imediata de todo o ANSA, não foi necessário adicionar alíquotas de 0,5 ml de sulfito de sódio a 20%, até completa dissolução,

conforme recomenda a técnica. Deixou-se descansar durante uma noite, filtrou-se um papel de filtro SS 589¹ e transferiu-se a solução para frasco de vidro de coloração escura.

Em 3 balões volumétricos de 50 ml foram colocados, respectivamente, 2 ml das soluções contidas nos balões de 250 ml mencionados no item 3.2.04, adicionando-se 25 ml de água destilada e 5 ml de AMR. Os balões foram agitados e a eles foram adicionados 2 ml do reagente ANSA, completando-se o volume com água destilada. A absorvância das soluções foi lida a 680 nm 20 minutos após a adição do reagente ANSA.

Como branco utilizou-se uma mistura dos reagentes, na mesma proporção, com exceção da solução contendo fósforo, que foi substituída por água destilada.

A quantificação das leituras foi feita através de curva padrão, usando-se soluções com concentração de 1, 2, 3, 4 e 5 µg de fósforo por ml, obtidas a partir da solução padrão.

3.2.06. *Fibras*. Foi utilizado o método proposto por VAN DE KAMER & GINKEL (77), a não ser que a titulometria foi substituída pela determinação gravimétrica do método de WEENDE (76).

Reagente de Scharrer-Kurschner: 25 g de ácido tricloroacético foram dissolvidos em 500 ml de ácido acético a 70% (v/v). Adicionaram-se 62 ml de HNO₃ concentrado (65%, d = 1,41) e completou-se o volume para 1 litro com ácido acético a 70% (v/v).

Colocou-se, em balão de 100 ml de fundo redondo e junta esmerilhada, 1 g de sorgo móido a 40 mesh, cujo teor de umidade havia sido determinado, conforme descrito no item 3.2.01. Adicionaram-se 25 ml do reagente de Scharrer-Kurschner e adaptou-se o balão a um condensador de refluxo. A mistura foi

aquecida até a ebulição, com refluxo, durante 30 minutos, e, a seguir, resfriada sob água corrente e filtrada em papel de filtro SS 589¹ seco e tarado. Depois de bem seco, o resíduo foi lavado com ácido acético a 70% (v/v), enchendo-se o funil que continha o papel de filtro com a solução contendo o ácido. O resíduo foi lavado, a seguir, com água destilada quente (temperatura próxima do ponto de ebulição), procurando-se levar o resíduo para o fundo do cone formado pelo papel de filtro, até que o pH do filtrado, escoando-se pelo funil, fosse igual ao da água de lavagem. Atingido esse ponto, lavou-se o resíduo 3 vezes com acetona e, depois, 3 vezes com éter. O papel de filtro, contendo fibras e minerais, foi dobrado e colocado em cadinho previamente seco e tarado. O conjunto foi posto em estufa a 105°C durante 3 h e depois em dessecador, tendo sido pesado quando atingiu a temperatura ambiente. O cadinho, contendo o papel de filtro, fibras e minerais, foi colocado em mufla a 600°C para determinação de cinzas (minerais), conforme descrito em 3.2.03. A porcentagem de fibras na matéria seca foi calculada pela fórmula

$$\%F = \frac{T - (C + P + M)}{PS} \times 100$$

em que %F = porcentagem de fibras; C = peso do cadinho; P = peso do papel de filtro; M = peso dos minerais (cinzas); PS = peso da amostra seca e T = C + P + M + peso das fibras.

Não se usou material desengordurado nessa dosagem, porque, sendo baixo o teor de gorduras no sorgo (3,61%, em média, na matéria seca), considerou-se que as lavagens com acetona e éter eram suficientes para eliminá-las.

Essa determinação foi feita em 11 amostras do sorgo, tomadas ao acaso.

3.2.07. *Proteína bruta*. Foi utilizado o método semimicro Kjeldahl (76).

Em balão Kjeldahl de 100 ml foram colocados 200 mg de sorgo moído a 40 mesh, envoltos no papel impermeável usado para a pesagem. O teor de umidade do sorgo havia sido determinado previamente, conforme descrito no item 3.2.01. Adicionaram-se 2,5 g, aproximadamente, de uma mistura, na proporção de 1:10, de sulfato de cobre e sulfato de sódio, uma pequena porção de selênio, 3 pérolas de vidro e 5 ml de H_2SO_4 concentrado. Deixou-se digerir, sob aquecimento, e com sucção dos vapores desprendidos, até que o líquido no interior do balão se tornasse límpido. Após resfriamento, as paredes internas do balão foram lavadas com água destilada, arrastando-se para o fundo todas as projeções de material. Nova digestão foi feita, até que o líquido, no balão, estivesse outra vez completamente límpido. Após resfriamento, o líquido foi transferido para balão volumétrico de 100 ml, completando-se o volume com água destilada.

A extremidade do tubo do condensador de um aparelho Kjeldahl foi introduzida em um erlenmeyer contendo 5 ml de H_3BO_3 4%, 3 gotas do indicador Ma-Zuazaga e 15 ml de água destilada, de modo que a extremidade ficasse mergulhada no líquido. Foram introduzidos no aparelho, através do alimentador, 5 ml da solução resultante da digestão e 10 ml de NaOH 50%. Após a colocação de cada um desses componentes, o alimentador foi lavado 2 vezes com água destilada, que também foi escoada para o interior do aparelho. Conservando-se o alimentador cheio com água, deixou-se destilar até que o volume da solução no erlenmeyer se tivesse tornado o dobro, aproximadamente, do volume inicial. Abaixou-se o erlenmeyer, de modo que a extremidade do condensador não mais ficasse mergulhada no líquido, la-

vou-se a extremidade do tubo com água destilada, e deixou-se destilar por mais 2 minutos. Desligou-se o aquecimento, retirou-se o erlenmeyer, e a solução em seu interior foi titulada com HCl 0,1N fatorado.

Branco: foi obtido fazendo-se uma destilação igual à descrita, substituindo-se os 5 ml da solução resultante da digestão por 5 ml de água destilada.

O teor de nitrogênio, em porcentagem, foi calculado pela fórmula

$$\%N = \frac{2,8 (H - h) Fc}{PS}$$

em que %N = porcentagem de nitrogênio; H = volume de HCl 0,1N, em ml, gasto na titulação; h = volume de HCl 0,1N, em ml, gasto na titulação do branco; Fc = fator de correção do HCl 0,1N e PS = peso da amostra seca.

Para se calcular o teor de proteína, em porcentagem, multiplicou-se a porcentagem de nitrogênio pelo fator 6,25.

Essa determinação foi feita em 9 amostras do sorgo, tomadas ao acaso.

3.2.08. *Aminoácidos não sulfurados, com exceção de triptofano.* Foi utilizado o método de SPACKMAN *et alii* (78).

Em tubo de ensaio Pyrex de 18 x 180 mm, foram colocados 10 mg de sorgo moído a 200 mesh, desengordurado conforme descrito no item 3.2.02, e cujo teor de umidade havia sido determinado, conforme descrito no item 3.2.01. O tubo foi estrangulado na parte mediana, através de aquecimento, e colocado em banho de gelo e sal. Adicionaram-se 10 ml de HCl 6N, borbulhou-se nitrogênio durante cerca de 3 minutos, fez-se vácuo e

selou-se o tubo na parte estrangulada, através de aquecimento. O tubo foi retirado do banho de gelo e sal e colocado em estufa a 105°C durante 20 h. Após a hidrólise ácida, o líquido foi transferido para o balão de um evaporador rotatório, onde foi evaporado completamente, sob pressão reduzida e à temperatura de 40°C. O resíduo sólido que ficou no interior do balão foi dissolvido em 4 ml de tampão citrato pH = 2,2. Duas alíquotas de 0,5 ml, uma para a coluna de aminoácidos ácidos e neutros, e outra para a coluna de aminoácidos básicos, foram usadas para a análise em analisador Beckman modelo 120C.

Essa determinação foi feita em 3 amostras do sorgo, tomadas ao acaso.

3.2.09. *Aminoácidos sulfurados*. Foi utilizado o método de SPACKMAN *et alii* (78), com oxidação prévia do material (79).

Em tubo de ensaio Pyrex de 18 x 180 mm foram colocados 10 mg de sorgo moído a 200 mesh, desengordurado conforme descrito no item 3.2.02, e cujo teor de umidade havia sido determinado, conforme descrito no item 3.2.01. O tubo foi estrangulado na parte mediana, através de aquecimento, e colocado em banho de gelo e sal. Adicionaram-se 0,2 ml de ácido fórmico e 2 ml de ácido perfórmico recentemente preparado (misturando-se 1 ml de H₂O₂ a 30% com 9 ml de ácido fórmico a 88% e deixando-se em repouso durante 1 hora à temperatura ambiente). Após a oxidação, durante 2 h, com o tubo mergulhado no banho de gelo e sal, no interior de um refrigerador, foram adicionados 0,3 ml de HBr 48%, a frio, e evaporou-se o líquido em evaporador rotatório, sob pressão reduzida e à temperatura de 40°C. Processou-se, então, à hidrólise ácida e à análise da maneira descrita no item anterior.

Essa determinação foi feita em 3 amostras do sorgo, tomadas ao acaso.

3.2.10. *Triptofano*. Foi utilizado o método descrito por MILLER (80).

Em erlenmeyer de 250 ml, resistente, foram colocados 2 g de sorgo moído a 40 mesh, cujo teor de umidade havia sido determinado, conforme descrito no item 3.2.01. Misturaram-se 15,4 g de $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ pulverizado (peneira de 22 mesh). Adicionaram-se 9 ml de água destilada, distribuindo-a uniformemente sobre a mistura, sem agitação, para que o material não aderisse às paredes laterais do frasco. Tampou-se o erlenmeyer com bucha de algodão envolta em gase, protegida com papel aluminizado. Para firmeza, cobriu-se a bucha com papel grosso, amarrando-o ao gargalo com barbante. Autoclavou-se a 15 lb/pol² durante 7 h e deixou-se resfriar durante toda a noite. Neutralizou-se com HCl 6N em presença de fenolftaleína, até que a suspensão se tornasse incolor, tomando-se o seguinte cuidado em relação ao ponto de viragem: só se considerou terminada a neutralização quando, adicionando-se 3 gotas de fenolftaleína à suspensão incolor, a cor rósea não reaparecia. Adicionaram-se, então, 40 ml de solução de Na_2SO_4 (175 g de Na_2SO_4 anidro em volume de água necessário para completar 1 litro), misturou-se, e transferiu-se a suspensão para tubo de centrífuga (International Equipment Company, model PR-2). Centrifugou-se a 3000 rpm (1800 G) durante 10 minutos, usando-se o rotor n.º 845. Transferiu-se o sobrenadante para balão volumétrico de 200 ml, ressuspendeu-se o resíduo em água destilada, centrifugou-se nas mesmas condições, e transferiu-se o sobrenadante para o balão volumétrico, completando-se o volume com água destilada. Em tubo de ensaio contendo 2 ml dessa solução foram adicionados

5 ml de DMAB (p-dimetilaminobenzaldeído) a 5% em HCl concentrado. Agitou-se o tubo, tampou-se, e deixou-se em repouso durante 20 minutos. Adicionaram-se 0,2 ml de NaNO_2 0,2%, agitou-se e centrifugou-se a 3000 rpm (1800 G) durante 10 minutos. A absorvância do sobrenadante foi lida em 590 nm em espectrofotômetro Beckman, modelo 25. Para o branco, procedeu-se da mesma maneira, substituindo-se os 5 ml de DMAB por 5 ml de HCl concentrado, sem necessidade de obedecer ao intervalo de 20 minutos.

A quantificação das leituras foi feita através de curva padrão, usando-se soluções de L-triptofano em água destilada com as concentrações de 15, 20, 25, e 30 $\mu\text{g/ml}$, obtidas a partir de uma solução estoque contendo 0,1 mg/ml.

Essa determinação foi feita em 10 amostras do sorgo, tomadas ao acaso, sendo 9 moídas a 40 mesh e 1 a 200 mesh.

3.2.11. *Tanino*. Foi utilizado o método proposto por BURNS (81).

Reagente de vanilina. HCl: Misturaram-se volumes iguais de HCl 8% (v/v) em metanol e vanilina a 4% em metanol. A mistura foi feita imediatamente antes da utilização, tendo-se o cuidado de verificar que não havia nela qualquer vestígio de cor.

Colocou-se, em erlenmeyer de 125 ml, 1 g de sorgo moído a 40 mesh, cujo teor de umidade havia sido determinado conforme descrito em 3.2.01. Imediatamente após a adição de 50 ml de metanol, o frasco foi tampado com rolha de borracha, agitado e deixado em repouso durante 24 h, à temperatura ambiente, mexendo-se ocasionalmente. Pipetou-se 1 ml do sobrenadante para tubo de ensaio e adicionaram-se, imediatamente, 5 ml do reagente de vanilina. HCl. A absorvância da solução foi li-

da em 525 nm, após 20 minutos, em espectrofotômetro Coleman modelo 6D. A quantificação das leituras, em equivalentes de catequina, foi feita através de curva padrão, usando-se soluções de catequina em metanol com as concentrações de 40, 80, 120, 160, 200, 240, 280, 320 e 360 $\mu\text{g/ml}$, obtidas a partir de uma solução estoque contendo 2 mg/ml.

Essa determinação foi feita em 11 amostras do sorgo, tomadas ao acaso.

3.2.12. *Niacina*. Foi utilizado o método de FRIEDEMANN & FRAZIER (82).

Reagente de CNBr tamponado: em balão volumétrico de 50 ml, foram colocados 20 g (6,75 ml, aproximadamente) de bromo, a frio. Adicionou-se água destilada fria e transferiu-se a solução para balão volumétrico de 250 ml, contendo cerca de 100 ml de água destilada, fria também. Colocou-se o balão em banho de gelo e adicionou-se, vagarosamente, solução de NaCN a 10%, recentemente preparada, agitando-se constantemente, até que a solução se tornasse quase descolorida. As paredes do frasco foram então lavadas com água destilada, após o que continuou-se a adicionar a solução de NaCN a 10%, mas gota a gota, até que a solução se tornasse descolorida. Um excesso de 3 gotas de NaCN a 10% foi adicionado, completando-se o volume com água destilada. Essa solução pode ser guardada em refrigerador pelo período de um ano, sem que sofra alterações. Cerca da metade dessa solução foi transferida para outro balão volumétrico de 250 ml, contendo 12,5 g de KH_2PO_4 , completando-se o volume com a outra metade depois que o sal estava completamente dissolvido. Essa solução se conserva estável por 2 meses se guardada em refrigerador e protegida contra luz forte.

Solução de ZnSO_4 : 800 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ foram dissol

vidos em água destilada quente. Depois da dissolução e do resfriamento do líquido completou-se o volume para 1 litro.

Recristalização do metol (p-metilamino-fenolfulfato): A 500 ml de H_2SO_4 0,1N em ebulição foram adicionados 100g de metol previamente misturados com 0,67 g de $NaHSO_3$. A solução foi aquecida até o início da ebulição. Como a solução não apresentava coloração forte, não houve necessidade de se adicionar Norite. A solução foi filtrada em Büchner com 16 cm de diâmetro, que havia sido aquecido previamente com água em ebulição. O filtrado foi transferido para um bēquer de 1 litro contendo 0,33 g de $NaHSO_3$. Adicionaram-se 333,3 ml de álcool a 95°GL, mexendo-se constantemente com um bastão de vidro, e resfriou-se a solução em banho de gelo. Completou-se a cristalização, deixando-se a solução em repouso em câmara fria durante uma noite. Filtrou-se em Büchner, e os cristais retidos pelo papel de filtro foram lavados com álcool a 95°GL, pulverizando com um atonizador. O metol recristalizado foi seco a vácuo, em dessecador contendo cloreto de cálcio anidro.

Em tubo de ensaio de 18 x 180 mm foram colocados 2 g de sorgo moído a 40 mesh, cujo teor de umidade havia sido determinado conforme descrito em 3.2.01. Adicionaram-se 15 ml de H_2SO_4 2N e colocou-se o tubo em banho-maria de água em ebulição. O tubo foi agitado freqüentemente durante os primeiros minutos para prevenir agregação do material. Depois de 10 a 15 minutos, não havendo mais perigo de agregação, foram adicionados mais 10 ml de H_2SO_4 2N, lavando-se as paredes do tubo. Após 90 minutos no banho-maria, o tubo foi resfriado em banho de água fria. Adicionaram-se 5 ml de clorofórmio, agitou-se em vórtex durante 3 minutos, e transferiu-se a suspensão para tubo de centrífuga graduado com capacidade de 50 ml. Adicionou-se água destilada até a marca de 45 ml, mexeu-se bem com um

bastão de vidro, e completou-se o volume para 50 ml, lavando-se o bastão. Centrifugou-se durante 20 minutos a 2000 rpm (900 G) em centrífuga International (International Equipment Company, model PR-2), usando-se o rotor n.º 269. Transferiu-se o sobrenadante para balão volumétrico de 50 ml e completou-se o volume com água destilada. Transferiram-se 25 ml dessa solução para tubo de centrífuga graduado, com capacidade de 50 ml, e adicionaram-se 2 ml da solução de $ZnSO_4$, 2 gotas de ácido caprílico e 2 gotas de fenolftaleína (solução a 1% em álcool etílico a 70%). Vagarosamente, adicionou-se NaOH 4N, mexendo-se constantemente com bastão de vidro, até o aparecimento de um precipitado de $Zn(OH)_2$. Durante o processo, a suspensão era resfriada, se se aquecia. Após o aparecimento do precipitado, passou-se a adicionar NaOH 1N, mexendo-se constantemente com o bastão de vidro, até que uma cor rosa permanente fosse obtida. Adicionou-se então H_2SO_4 5N, gota a gota, até que a cor desaparecesse permanentemente. Completou-se o volume para 50 ml com água destilada e centrifugou-se a 2000 rpm (900 G) durante 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para balão volumétrico de 50 ml, completando-se o volume com água destilada. Essa solução pode ser guardada em refrigerador durante 2 semanas sem deteriorar.

Branco: foi preparado da mesma forma, omitindo-se a amostra do sorgo.

A 4 tubos de ensaio, designados pelas letras A, B, C e D, adicionaram-se 5 ml da solução obtida. A outros 4 tubos, designados pelas letras Ab, Bb, Cb e Db, adicionaram-se 5 ml da solução obtida para o branco. Os tubos foram tampados com rolha de borracha e incubados durante 10 minutos em banho de água a $50 \pm 2^\circ C$. Aos tubos A, C, Ab e Cb foram adicionados 2 ml da solução de CNBr tamponado, e aos tubos B, D, Bb e Db,

2 ml de KH_2PO_4 a 5%. Após cada adição o tubo era agitado em vórtex e colocado imediatamente no banho. A fim de assegurar precisão na contagem do tempo, os reagentes foram adicionados aos tubos a intervalos regulares (15 segundos). Após 10 minutos exatos de incubação, os tubos foram colocados em banho de água a 25°C . Depois de 10 minutos de resfriamento, os tubos A, B, Ab e Bb receberam 3 ml da solução de metol a 8% em HCl 0,5N, e os tubos C, D, Cb e Db, 3 ml de HCl 0,5N. Como anteriormente, foi observado o intervalo de 15 segundos entre as adições, bem como o cuidado de agitar o tubo em vórtex, após a adição. Durante todo o processo, os tubos foram protegidos contra a incidência de luz forte. As leituras fotométricas foram feitas em espectrofotômetro Beckman, modelo 25, em 400 nm, 60 minutos após a adição do ácido aos tubos C, D, Db e Bb.

A absorvância das soluções dos tubos A, B, C e D foi lida depois de o aparelho ter sido zerado, respectivamente, com as soluções dos tubos Ab, Bb, Cb e Db. A leitura corrigida (L) foi obtida pela fórmula

$$L = A - (B + C - D)$$

As soluções dos tubos B, C e D introduziram correções para substâncias que produzem cor ao reagirem com a amina, substâncias que produzem cor ao reagirem com o CNBr e substâncias coloridas, respectivamente.

A quantificação das leituras foi feita através de curva padrão. De uma solução estoque de ácido nicotínico em água, contendo 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$, tomaram-se 10 ml, os quais foram diluídos para 100 ml, obtendo-se uma solução em que a concentração de ácido nicotínico era 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Foram utilizados 2 ml dessa solução (contendo 200 μg de ácido nicotínico), de modo

que, após a primeira centrifugação, ao se preencher o balão volumétrico de 50 ml, a concentração do ácido nicotínico na solução contida nesse balão era de 4 µg/ml. Foram tomados 25 ml dessa solução (contendo 100 µg de ácido nicotínico), de modo que, após a segunda centrifugação, ao se preencher o balão volumétrico de 50 ml, a concentração do ácido nicotínico na solução era de 2 µg/ml. Foram colocados em tubos de ensaio, e, em duplicado, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 e 2,5 ml dessa solução, e adicionados 4,5, 4,0, 3,5, 3,0 e 2,5 ml de água destilada, respectivamente. Cada tubo continha, portanto, 5 ml de solução, e as concentrações de ácido nicotínico nesses tubos eram, respectivamente, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1,0 µg/ml. Esses 5 ml foram utilizados para a dosagem de niacina.

Nas condições descritas, a fórmula utilizada para transformar a leitura espectrofotométrica em µg de niacina por g de sorgo seco foi

$$N = \frac{100 Lg}{PS}$$

em que N = teor de niacina; Lg = valor da leitura no gráfico e PS = peso da amostra seca.

Essa determinação foi feita em 5 amostras do sorgo, tomadas ao acaso.

3.2.13. *Carboidratos*. Foram determinados por diferença (83).

3.2.14. *Energia total*. A energia total, em kcal, contida em 1 kg de dieta, foi calculada somando-se os produtos obtidos da multiplicação, por 4, dos teores, em g, de proteínas e carboidratos, e por 9, do teor de gorduras (20, 84).

3.3. SEPARAÇÃO E CONSERVAÇÃO DO PLASMA E DOS ERITRÓCITOS

O sangue, colhido em heparina, através de punção cardíaca, foi imediatamente centrifugado a 3000 rpm (850 G) durante 10 minutos, para separação do plasma, em centrífuga Piccolo, tipo 00702. Os plasmas dos 5 pintos de cada repetição foram misturados e conservados a -20°C , para posterior dosagem de aminoácidos livres. O precipitado de células obtido após a separação do plasma foi lavado 3 vezes com solução salina tamponada, pH 7,3, obtida dissolvendo-se 8,12 g de Na_2HPO_4 anidro, 1,35 g de KH_2PO_4 e 8,00 g de NaCl em quantidade de água destilada necessária para completar 1 litro (85). Após cada lavagem e centrifugação, o sobrenadante e a camada fina de leucócitos depositada sobre a camada de eritrócitos foram retirados por sucção. Os eritrócitos foram conservados a -20°C durante cerca de 12 h, e liofilizados, para prevenir a ação de enzimas que pudessem atuar sobre os nucleotídeos da nicotinamida quando os eritrócitos se romperem. Partes iguais (100 mg) dos eritrócitos liofilizados dos 5 pintos de cada repetição foram misturadas. Essas misturas foram conservadas a -20°C , para posterior dosagem dos nucleotídeos da nicotinamida.

3.4. CONSERVAÇÃO DOS FÍGADOS

Os fígados dos 5 pintos de cada repetição foram conservados a -20°C durante cerca de 12 h, e liofilizados, pelo mesmo motivo mencionado no item anterior. Os fígados liofilizados de cada repetição foram pulverizados juntos em cápsula de porcelana, em vez de almofariz, para que não se perdesse parte das substâncias gordurosas por aderência às pare-

des do recipiente. O material foi conservado a -20°C , para posterior dosagem dos nucleotídeos da nicotinamida.

3.5. PARÂMETROS NUTRICIONAIS

3.5.01. *Ganho de peso.* O ganho médio de peso por pinto (GP) em cada repetição, tanto no 1.^o quanto no 2.^o período experimental, foi obtido dividindo-se a diferença entre o peso final (PF) e o peso inicial (PI) dos pintos pelo número de pintos da repetição (N):

$$\text{GP} = \frac{\text{PF} - \text{PI}}{\text{N}}$$

3.5.02. *Consumo de dieta.* O consumo médio de dieta por pinto (CD) em cada repetição, tanto no 1.^o quanto no 2.^o período experimental, foi obtido dividindo-se o peso da dieta ingerida (DI) pelo número de pintos da repetição (N):

$$\text{CD} = \frac{\text{DI}}{\text{N}}$$

3.5.03. *Eficiência alimentar.* A eficiência alimentar (EA) em cada repetição, tanto no 1.^o quanto no 2.^o período experimental, foi calculada dividindo-se o ganho médio de peso (GP) pelo consumo médio de dieta (CD):

$$\text{EA} = \frac{\text{GP}}{\text{CD}}$$

3.5.04. *Eficiência proteica.* A eficiência proteica (EP) em cada repetição, tanto no 1.^o quanto no 2.^o período experimental, foi calculada dividindo-se o ganho médio de peso

(GP) pelo peso médio de proteína ingerida por pinto (PI):

$$EP = \frac{GP}{PI}$$

3.5.05. *Retenção de nitrogênio.* A retenção de nitrogênio (RN) em cada repetição, no 1.^o período experimental, foi calculada pela diferença entre o peso de nitrogênio ingerido (NI) e o peso de nitrogênio excretado através das fezes e da urina (NE):

$$RN = NI - NE$$

3.6. PARÂMETROS METABÓLICOS

3.6.01. *Teor de gordura no fígado.* As gorduras nos fígados liofilizados e pulverizados de cada repetição foram dosadas pelo método descrito no item 3.2.02, utilizando-se 5 g do material.

3.6.02. *Concentração de aminoácidos livres no plasma.* A desproteinização do plasma para a análise dos aminoácidos livres foi feita de acordo com GERRITSEN *et alii* (86). Foram misturadas partes iguais (4 ml) de plasma e tampão citrato de sódio pH 1,5 (obtido dissolvendo-se 19,6 g de $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$ em 900 ml de água destilada, adicionando-se HCl concentrado até que a solução apresentasse pH 1,5 e completando-se o volume para 1 litro com água destilada). As misturas correspondentes a cada repetição foram centrifugadas a 18000 rpm (30000 G) durante 1 h em centrífuga Sorvall, modelo RC2-B, tomando-se, para a análise, o terço superior do líquido contido nos tubos

após a centrifugação, e tendo-se o cuidado de não permitir agitação do líquido no interior do tubo antes que a alíquota para análise fosse retirada.

A 1,5 ml da mistura coletada para análise foram adicionados 0,5 ml do tampão acima mencionado, a fim de se obter um pH próximo de 2. Dessa mistura foram utilizadas duas alíquotas de 0,5 ml, uma para a coluna de aminoácidos ácidos e neutros e outra para a coluna de aminoácidos básicos de um analisador Beckman modelo 120C. O método de análise utilizado foi o de SPACKMANN *et alii* (78), sem a hidrólise ácida, e com o analisador ajustado para análise de líquidos fisiológicos.

3.6.03. Concentração de nucleotídeos da nicotina — mida no fígado e nos eritrócitos. O método utilizado para separação e dosagem dos nucleotídeos NADP (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato), NAD (nicotinamida adenina dinucleotídeo) e NMN (nicotinamida mononucleotídeo) foi desenvolvido com base nos trabalhos de HUFF (87), HUFF & PERLZWEIG (88), LEVITAS *et alii* (89), KODICEK & REDDI (90) e SRIKANTIA *et alii* (6).

Para cada repetição procedeu-se da seguinte maneira: em tubo de ensaio resistente, de dimensões apropriadas, foram colocados 0,5 g da mistura de fígados pulverizados (item 3.4) e 2 ml de ácido tricloroacético (TCA) a 10%, para precipitação das proteínas. A suspensão foi homogeneizada em homogeneizador Stir-R, modelo S63C (Tri-R Instruments, New York, USA) e centrifugada a 3000 rpm (850 G) durante 10 minutos, em centrífuga Piccolo, tipo 00702. O resíduo foi lavado com 1 ml de água destilada, e após centrifugação, nas mesmas condições, o sobrenadante foi juntado ao obtido anteriormente. Com o auxílio de um potenciômetro, o sobrenadante foi neutralizado com KOH 2N, sendo o acerto final para pH 7 feito com KOH 0,1N ou 0,01N.

Após filtração em papel de filtro SS 589², evaporou-se todo o líquido em evaporador rotatório, sob pressão reduzida, e à temperatura de 40°C. O resíduo que permaneceu no balão do evaporador, após a evaporação, foi dissolvido em 0,4 ml de água destilada. A solução foi centrifugada a 3000 rpm (850 G) durante 10 minutos, e o sobrenadante obtido foi conservado a - 20°C, para posterior separação e dosagem dos nucleotídeos.

Os nucleotídeos da nicotinamida foram separados através de cromatografia em papel, tipo ascendente, aplicando-se 3 µl do sobrenadante em papel Whatman n.º 1, e irrigando-se durante cerca de 16 h com um sistema solvente constituído de 6 partes de álcool a 96° GL e 4 partes de acetato de amônio 1M, pH 5. Os 3 µl foram aplicados em 3 pontos próximos sobre a linha de base (cerca de 1 µl em cada ponto), pois, se aplicados num mesmo ponto, a separação não era boa. Após a corrida, o papel foi secado à temperatura ambiente, e colocado durante 90 minutos em um recipiente fechado (usou-se um dessecador) contendo partes iguais de acetona e hidróxido de amônio, de modo que apenas os vapores dessas substâncias entrassem em contacto com o papel. Os nucleotídeos, em presença de NH₄OH, combinaram-se com a acetona, formando compostos fluorescentes. Após secagem do papel à temperatura ambiente, os nucleotídeos foram localizados pela exposição à luz ultravioleta, e identificados comparando-se os seus R_F com os de soluções padrões destes nucleotídeos.

Para separação dos nucleotídeos nos eritrócitos introduziram-se as seguintes modificações: foram utilizados 0,2 g de eritrócitos, e após a evaporação no evaporador rotatório o resíduo foi dissolvido em 0,2 ml de água destilada. Do sobrenadante obtido no final, contendo os nucleotídeos, foram utilizados 10 µl na cromatografia, aplicados em 3 pontos próxi

mos sobre a linha de base (cerca de 3,3 μ l em cada ponto).

Para a dosagem, as áreas do papel, contendo os nucleotídeos, foram recortadas e colocadas aderidas, por contacto, à parte interna de tubos graduados. Os nucleotídeos foram então eluídos fazendo-se pingar sobre o papel, vagarosamente, com o auxílio de uma bureta, 3 ml de HCl 0,01N. A solução foi transferida para balão volumétrico de 5 ml, completando-se o volume com a solução de HCl 0,01N. Os nucleotídeos foram dosados através de fluorescência, em um espectrofotofluorômetro Aminco-Bowman (American Instrument Company, Silver Spring, Maryland, USA). O comprimento de onda de excitação foi 3650 Å, e o de emissão 4400 Å. Como branco utilizou-se a solução obtida submetendo-se ao mesmo processo de eluição um pedaço do papel utilizado na cromatografia, de área equivalente aos pedaços contendo os nucleotídeos, e retirado de uma parte em que só havia ocorrido o solvente.

A quantificação das leituras foi feita através de curva padrão. Para o NADP, a solução padrão foi feita com nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato obtida a partir de β -NAD; para o NAD, com β -nicotinamida adenina dinucleotídeo; e para o NMN, com nicotinamida mononucleotídeo, todos eles adquiridos de Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA). Para cada um desses nucleotídeos foi feita uma solução estoque contendo 0,1 mg do nucleotídeo por ml, e para obtenção das curvas padrão foram utilizadas as seguintes concentrações: NADP, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 e 0,6 μ g/ml; NAD, 0,4, 0,8, 1,2 e 1,6 μ g/ml; NMN, 0,02, 0,04, 0,06, 0,08, 0,10 e 0,12 μ g/ml.

3.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (74, 75). A comparação entre médias dos parâmetros nutricionais (ganho de peso, consumo de dieta, eficiência alimentar, eficiência proteica e retenção de nitrogênio) foi feita através do teste de Tukey (75, 91), e as médias relativas aos parâmetros aminoácidos livres no plasma, teor de gordura no fígado e concentração de nucleotídeos da nicotinamida no fígado e nos eritrócitos, pelo teste de Duncan (75, 91). Para alguns aminoácidos não foi possível obter os dados em todas as repetições. Aplicou-se, então, a fórmula indicada por PIMENTEL GOMES (75) para cálculo da diferença mínima significativa entre médias no caso de parcelas perdidas.

3.8. REAGENTES E PESAGENS

Nas análises químicas, os reagentes utilizados foram da melhor qualidade encontrada no comércio (puros para análise), e as pesagens foram feitas com aproximação de 0,00001.

4. RESULTADOS

4.1. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO SORGO E DAS RAÇÕES COMERCIAIS

A composição química do sorgo está apresentada no quadro 1. Esse quadro apresenta, também, a composição química da ração comercial para pintos postura (RP), ingrediente básico das dietas RPM e RPML (quadro 2), e da ração comercial para pintos corte (RC), que constitui, ela própria, a dieta RC (quadro 2).

Os dados, no quadro 1, revelam que o teor proteico do sorgo é bem menor que o das rações comerciais (cerca de 62% do teor proteico da ração comercial para pintos postura e 55% do teor proteico da ração comercial para pintos corte).

Para pintos até 6 semanas de idade a relação entre kcal de energia metabolizável em 1 kg de ração e porcentagem de proteína deve ser 140/1, aproximadamente (92). Em 1 kg de sorgo, o valor da relação entre kcal de energia total e porcentagem de proteína era 274/1 aproximadamente, enquanto nas rações comerciais para pintos postura e pintos corte era 162/1 e 146/1, respectivamente. O sorgo apresentava, portanto, um desbalanceamento calórico-proteico natural.

QUADRO 1. Composição química do sorgo e das rações comerciais para pintos postura (RP) e pintos corte (RC).

Componentes	Sorgo (%)	RP ^a (%)	RC ^a (%)
Umidade	14,40 ± 0,97	11,00 ^g	11,00 ^g
Proteínas	12,38 ± 0,22	20,00 ^{bh}	22,50 ^{bh}
Carboidratos	65,38 ± 1,21 ^c	54,16 ^c	51,66 ^c
Extrato etéreo	3,09 ± 0,36	3,00 ^h	3,50 ^h
Cálcio	0,05 ± 0,00	1,00 ^g	1,00 ^g
Fósforo	0,25 ± 0,01	0,50 ^h	0,55 ^h
Minerais	0,86 ± 0,17	5,50 ^d	5,45 ^d
Fibras	3,45 ± 0,37	4,50 ^g	4,00 ^g
Tanino	0,14 ± 0,01	-	-
Metionina	-	0,04	0,04
Ingredientes diversos	-	0,14 ^e	0,14 ^e
Vitaminas	-	0,156 ^f	0,156 ^f
Niacina	0,0011 ± 0,00008	0,0039	0,0039

^aDados fornecidos pelo fabricante.

^bValores confirmados no Laboratório de Bioquímica Nutricional do Departamento de Bioquímica e Imunologia da UFMG, através de dosagem pelo método de Kjeldahl (1).

^cCalculado por diferença.

^dTeor de matéria mineral fornecida pelo fabricante (7%, no máximo) menos os teores de cálcio e fósforo. No valor estão incluídas as seguintes suplementações, em mg/kg de ração: Mn, 56; Fe, 43; Cu, 5; Zn, 36; I, 0,3 e Co, 0,1.

^emg/kg de ração: Étoxiquim, 125; Amprol plus (ou similares), 500; Terramicina (ou similares), 48; Ácido arsanílico, 90 e Furazolidona, 55.

^fmg/kg de ração: Vit. A, 24 (12000 UI); Vit. D₃, 0,0275 (1100 UI); Vit. K₃, 2; Vit E, 15; Riboflavina, 5; Vit. B₁₂, 0,012; Ácido fólico, 1,4; Piridoxina, 5; Colina, 814 e Pantetonato de cálcio, 16.

^gTeor máximo.

^hTeor mínimo.

4.2. COMPOSIÇÃO DAS DIETAS EXPERIMENTAIS

A composição das dietas experimentais se acha apresentada no quadro 2. Elas foram formuladas com base na composição química do sorgo e das rações comerciais para pintos postura, RP, e pintos corte, RC (quadro 1).

A dieta SN difere da dieta S apenas por ser suplementada com 0,025 g de ácido nicotínico por kg de dieta.

A dieta RPML difere da dieta RPM apenas por ser suplementada, no primeiro período experimental (8.^o ao 18.^o dia de vida dos pintos), com 10 g de L-leucina por kg de dieta, e com 30 g no segundo período (18.^o ao 29.^o dia de vida dos pintos). Essas dietas eram isoproteicas e isocalóricas em relação às dietas S e SN (quadro 2). Isso foi obtido misturando-se à ração comercial para pintos postura (RP) quantidade conveniente de amido de milho. A suplementação das dietas RPM e RPML com vitaminas e sais minerais também foi feita de modo a se obter, com relação a esses ingredientes, composição semelhante à das dietas S e SN.

A dieta RC era constituída pela própria ração RC. Não era isoproteica, mas era isocalórica em relação às outras dietas testadas nesta pesquisa (quadro 2), e foi incluída apenas como controle.

A composição em aminoácidos das dietas S, SN, RPM, RPML e RC está apresentada no quadro 3. Em relação às dietas RPM e RPML as dietas S e SN continham menor concentração de histidina, arginina, ácido aspártico + asparagina, treonina, serina, glicina e triptofano, e maior concentração de lisina, ácido glutâmico + glutamina, prolina, alanina, valina, tirosina, ácido cisteico (cistina + cisteína) e metionina. A diferença quanto à concentração de glicina era muito grande (nas dietas

QUADRO 2. Composição, em g, de 1 kg das dietas S (ã base de sor go), SN (S + niacina), RPM (ã base de ração comerci- al para pintos postura misturada com amido), RPML (RPM + L-leucina), isoproteicas¹ e isocalóricas², e da dieta RC (ração comercial para pintos corte), não isoproteica¹ mas isocalórica² em relação às outras.

Componentes	S	SN	RPM	RPML	RC
Sorgo ³	937,00	937,00	-	-	-
RP ³	-	-	580,00	580,00	-
RC ³	-	-	-	-	1 000,00
Amido de milho	-	-	399,84	399,84	-
Óleo de soja	8,00	8,00	-	-	-
Mistura mineral ⁴	0,63	0,63	0,26	0,26	-
Fosfato bicálcico ⁵	30,37	30,37	12,76	12,76	-
Carbonato de cálcio	10,00	10,00	4,20	4,20	-
Cloreto de sódio	5,00	5,00	2,10	2,10	-
DL-Metionina	2,00	2,00	-	-	-
L-Lisina.HCl	5,00	5,00	-	-	-
L-Leucina ⁶	-	-	-	10,00	-
Mistura vitamínica ⁷	1,00	1,00	0,42	0,42	-
Colina.HCl	1,00	1,00	0,42	0,42	-
Niacina ⁸	-	0,025	0,003	0,003	-

¹ Teor de proteína nas dietas S, SN, RPM e RPML = 11,6%, e na dieta RC = 22,5%.

² Energia total das dietas (kcal/kg): S e SN, 3247,0 (relação kcal/% proteína = 279,9); RPM e RPML, 3492,0 (relação kcal/% proteína = 301,0) e RC, 3279,4 (relação kcal/% proteína = 145,7).

³ Ver composição no quadro 1.

⁴ mg/kg de dieta: MnSO₄.H₂O, 172,1 (Mn = 56); FeSO₄.7H₂O, 213,5 (Fe = 43); CuSO₄.5H₂O, 19,6 (Cu = 5); ZnSO₄.7H₂O, 158,2 (Zn = 36); KIO₃, 1,9 (I = 0,3); CoCl₂.6H₂O, 0,4 (Co = 0,1); MgSO₄.7H₂O, 52 (Mg = 5,1); Na₂MoO₄.2H₂O, 8 (Mo = 3,2) e Na₂SeO₃.5H₂O, 0,3 (Se = 0,09).

⁵ Cálcio = 25% e fósforo = 18%.

⁶ No segundo período experimental (18.^o ao 29.^o dia de vida dos pintos) foram adicionados 30 g em vez de 10 g.

⁷ mg/kg de dieta: Vit. A, 24 (12000 UI); Vit. D₃, 0,03 (1200 UI); Vit. K₂, 2; Vit. E, 15; Riboflavina, 5; Vit. B₁₂, 0,012; Ácido fólico, 1,4; Piridoxina.HCl, 5; D-Pantetonato de cálcio, 16; Tiamina.HCl, 10; Biotina, 0,3 e Inositol, 921,258.

⁸ Na dieta SN a suplementação foi feita com ácido nicotínico.

QUADRO 3. Composição em aminoácidos das dietas S (ã base de sorgo), SN (S + niacina), RPM (ã base de ração comercial para pintos postura misturada com amido), RPML (RPM + L-leucina) e RC (ração comercial para pintos corte), em g/kg de dieta.

Aminoácidos	S e SN ^a	RPM ^b	RPML ^b	RC
Lis	6,90 ± 0,15 ^c	5,53 ± 0,06	5,53 ± 0,06	12,53
His	2,42 ± 0,16	2,97 ± 0,18	2,97 ± 0,18	6,14
Arg	4,20 ± 0,37	6,49 ± 0,02	6,49 ± 0,02	13,70
Asp + Asn	7,72 ± 0,25	10,84 ± 0,35	10,84 ± 0,35	22,84
Tre	3,53 ± 0,08	4,52 ± 0,04	4,52 ± 0,04	8,66
Ser	5,20 ± 0,21	6,24 ± 0,02	6,24 ± 0,02	11,77
Glu + Gln	25,95 ± 1,94	21,72 ± 0,06	21,72 ± 0,06	40,34
Pro	9,24 ± 0,38	7,83 ± 0,36	7,83 ± 0,36	13,82
Gli	2,67 ± 0,12	7,40 ± 0,04	7,40 ± 0,04	11,63
Ala	10,90 ± 0,74	6,62 ± 0,05	6,62 ± 0,05	11,59
Val	5,18 ± 0,20	4,86 ± 0,08	4,86 ± 0,08	9,07
Iso	3,89 ± 0,14	3,93 ± 0,02	3,93 ± 0,02	7,88
Leu	16,42 ± 0,49	10,21 ± 0,04	20,21 ± 0,04 ^d	19,37
Tir	5,20 ± 0,15	4,22 ± 0,06	4,22 ± 0,06	8,66
Fen	6,53 ± 0,25	6,00 ± 0,18	6,00 ± 0,18	11,88
Cis	2,19 ± 0,81	1,69 ± 0,06	1,69 ± 0,06	3,96
Met	3,44 ± 0,43 ^e	1,50 ± 0,13	1,50 ± 0,13	3,92
Trp	1,42 ± 0,14	3,43 ± 0,05	3,43 ± 0,05	7,24
Total	123,00	116,00 ^c	126,00 ^d	225,00

^aMédia de 3 amostras tomadas ao acaso, com exceção de triptofano, para o qual foram tomadas 10 amostras.

^bMédia de 2 amostras tomadas ao acaso.

^cIncluindo-se a suplementação de 5 g (ver quadro 2).

^dIncluindo-se a suplementação de 10 g (ver quadro 2). No 2.º período experimental, em que a suplementação foi de 30 g, a quantidade de leucina se elevou para 40,21 g, e o total de aminoácidos da dieta para 146,00g

^eIncluindo-se a suplementação de 2 g (ver quadro 2).

S e SN o teor de glicina era 36% do teor deste aminoácido nas dietas RPM e RPML). Quanto à leucina, a concentração nas dietas S e SN era maior que na dieta RPM e menor que na dieta RPML. Na dieta RC todos os aminoácidos tinham concentração maior que nas outras dietas. Na determinação do teor de triptofano a amostra moída a 200 mesh deu valor semelhante ao das amostras moídas a 40 mes.

O quadro 4 apresenta as relações entre aminoácidos ramificados consideradas importantes, bem como o total de glicina + serina das dietas. A razão Iso/Leu na dieta RPM era maior que nas dietas S e SN, mas a adição de 1% de L-leucina a esta dieta, durante o primeiro período experimental (dieta RPML), fez que a razão se tornasse menor. No segundo período experimental, em que a adição de L-leucina foi elevada para 3%, a razão se tornou menor ainda. O mesmo ocorreu em relação às razões (Iso + Val)/Leu e Val/Leu. Na dieta RC, os valores dessas razões foram sempre superiores aos das demais dietas.

O total de glicina + serina nas dietas S e SN era cerca de 57% do total desses aminoácidos nas dietas RPM e RPML (quadro 4). Na dieta RC, o total de glicina + serina era muito superior ao das demais dietas.

4.3. SÍNDROME DE DOENÇA EQUIVALENTE À PELAGRA

Os pintos alimentados com as dietas S e SN, além de menor desenvolvimento, apresentaram sintomas de doença equivalente à pelagra. Esses sintomas foram observados nas penas e penugens, na língua, nos pés e no fígado.

As penas, em 100% dos pintos alimentados com as dietas S e SN, apresentaram má formação, que pôde ser observada à partir da segunda semana de vida, e que se acentuou com

QUADRO 4. Relações entre aminoácidos ramificados e total de glicina + serina nas dietas S (ã base de sorgo), SN (S + niacina), RPM (ã base de ração comercial para pintos postura misturada com amido), RPML (RPM + L-leucina¹) e RC (ração comercial para pintos corte).

	S	SN	RPM	RPML		RC
				1.º pe- río	2.º pe- río	
$\frac{\text{Iso}}{\text{Leu}}$	0,24	0,24	0,38	0,19	0,10	0,41
$\frac{\text{Iso} + \text{Val}}{\text{Leu}}$	0,55	0,55	0,86	0,43	0,22	0,87
$\frac{\text{Val}}{\text{Leu}}$	0,32	0,32	0,48	0,24	0,12	0,47
Gli + Ser (g/kg)	7,87	7,87	13,64	13,64	13,64	23,40

¹A suplementação com L-leucina, no primeiro período experimental (8.º ao 18.º dia de vida dos pintos) foi de 1%, e no segundo período (18.º ao 29.º dia de vida dos pintos), de 3%.

o transcorrer do tempo. Essa má formação caracterizou-se pelo arrepiamento das penas das asas, que perderam o brilho e o aspecto sedoso. Ao longo da região dorsal e na região abdominal posterior, a densidade de penugens era menor que a normal, e em alguns pintos era possível entrever a pele.

Os sintomas, na língua, eram constituídos por manchas escuras, que se localizavam bem na ponta do órgão. Essas manchas foram observadas em 98% dos pintos alimentados com a dieta S, e em 96% dos alimentados com a dieta SN, e puderam ser observadas a partir do 5.^o dia de vida. A intensidade máxima das manchas foi atingida entre o 16.^o e 18.^o dia de vida.

Nos pés, os sintomas observados foram inchaço da junta entre a tíbia e o tarso, associada com rachaduras na planta dos pés. Esses sintomas foram observados inequivocamente em 40% dos pintos alimentados com a dieta S e em 35% dos alimentados com a dieta SN. Alguns desses pintos apresentavam dificuldade em andar.

Os fígados dos pintos alimentados com as dietas S e SN apresentaram cor amarelada, variando em intensidade.

Os pintos alimentados com as dietas RPM, RPML e RC não apresentaram nenhum desses sintomas, com uma única exceção: no segundo período experimental, tendo sido elevada para 3% a suplementação de L-leucina à dieta RPML, os pintos alimentados com essa dieta apresentaram arrepiamento das penas.

4.4. EFEITOS NUTRICIONAIS DAS DIETAS

O quadro 5 mostra os resultados obtidos para os parâmetros ganho médio de peso por pinto, consumo médio de dieta por pinto, eficiência alimentar, eficiência proteica e re -

QUADRO 5. Efeitos nutricionais das dietas S (ã base de sorgo), SN(S + niacina), RPM (ã base de ração comercial para pintos postura misturada em amido), RPML (RPM + L-leucina¹) e RC(ração co-mercial para pintos corte) em pintos em fase inicial de desenvolvimento (mãdia por pinto, em g).²

Dietas	Peso inicial ³	Ganho de peso	Consumo de dieta em 10 dias	Eficiência alimentar	Eficiência proteica	Retenãõ de nitrogênio
Primeiro perãodo experimental ¹						
S	62,9 ± 2,4	54,2 ± 5,3 ^a	156,9 ± 11,8 ^a	0,345 ± 0,010 ^a	2,97 ± 0,08 ^a	1,24 ± 0,13 ^a
SN	65,0 ± 1,3	52,4 ± 2,0 ^a	153,1 ± 5,5 ^a	0,342 ± 0,005 ^a	2,95 ± 0,04 ^a	1,18 ± 0,05 ^a
RPM	73,3 ± 1,6	92,1 ± 5,5 ^b	219,6 ± 11,3 ^b	0,420 ± 0,008 ^b	3,62 ± 0,06 ^b	3,17 ± 0,24 ^b
RPML	72,2 ± 1,0	83,2 ± 3,2 ^b	202,4 ± 10,5 ^b	0,410 ± 0,008 ^b	3,54 ± 0,06 ^b	1,89 ± 0,40 ^c
RC	96,1 ± 2,9	211,8 ± 4,7 ^c	349,2 ± 3,9 ^c	0,605 ± 0,010 ^c	2,70 ± 0,03 ^c	10,69 ± 0,16 ^d
Segundo perãodo experimental ¹						
S	120,5 ± 9,9	77,9 ± 14,0 ^a	256,9 ± 31,1 ^a	0,300 ± 0,024 ^a	2,60 ± 0,24 ^a	
SN	110,8 ± 5,1	78,7 ± 9,0 ^a	257,3 ± 19,2 ^a	0,305 ± 0,021 ^a	2,63 ± 0,17 ^a	
RPM	159,5 ± 8,0	145,3 ± 12,3 ^b	394,2 ± 5,4 ^b	0,370 ± 0,036 ^b	3,18 ± 0,31 ^b	
RPML	148,8 ± 5,4	104,0 ± 6,6 ^a	293,6 ± 18,7 ^a	0,352 ± 0,010 ^b	3,05 ± 0,06 ^b	
RC	306,3 ± 10,5	324,8 ± 18,4 ^c	660,7 ± 34,3 ^c	0,490 ± 0,008 ^c	2,18 ± 0,05 ^a	

¹A suplementaçãõ com L-leucina foi de 1% no primeiro perãodo (8.^o ao 18.^o dia de vida dos pintos) e de 3% no segundo perãodo experimental (18.^o ao 29.^o dia de vida dos pintos).

²Para cada parãmetro, e dentro do mesmo perãodo experimental, as mãdias assinaladas com letras iguais nãõ se diferenciaram significativamente pelo teste de Tukey ao nãvel de 1% de probabilidade, com exceãõ dos parãmetros eficiãncia alimentar e eficiãncia proteica no segundo perãodo, cujas diferenãas significativas ocorreram ao nãvel de 5% de probabilidade.

³Peso mãdio por pinto aos 8 dias de idade (inãcio do primeiro perãodo experimental) e aos 18 dias de idade (inãcio do segundo perãodo experimental). Com 1 dia de idade o peso mãdio, por pinto, era 39,07 ± 0,08 g.

tenção de nitrogênio no primeiro e no segundo período experimental.

No primeiro período experimental os pintos alimentados com a dieta controle RC apresentaram valores significativamente maiores para esses parâmetros, com exceção do parâmetro eficiência proteica. Entretanto, o teor proteico desta dieta era quase o dobro do das outras dietas.

Os pintos alimentados com as dietas S e SN apresentaram valores significativamente menores para todos aqueles parâmetros, apesar de essas dietas terem sido isoproteicas e isocalóricas em relação às dietas RPM e RPML. A adição de ácido nicotínico à dieta S, na proporção de 25 mg/kg, elevando para 59 o número de equivalentes de niacina por kg (dieta SN) não melhorou a qualidade nutricional da dieta S.

O desbalanceamento de aminoácidos provocado pela adição de 1% de L-leucina à dieta RPM só provocou efeito significativo no parâmetro retenção de nitrogênio, que foi menor nos pintos alimentados com a dieta RPML.

No segundo período experimental, os pintos alimentados com a dieta controle RC novamente apresentaram valores significativamente maiores para os parâmetros considerados, com exceção de eficiência proteica. Os pintos alimentados com as dietas S e SN continuaram a apresentar valores significativamente menores para todos os parâmetros considerados. À semelhança do primeiro período, a adição de niacina à dieta S não melhorou a qualidade nutricional dessa dieta. Entretanto, a adição de 3% de L-leucina à dieta RPM piorou a sua qualidade nutricional de tal forma que o ganho médio de peso e o consumo médio de dieta dos pintos alimentados com a dieta RPML não foram estatisticamente diferentes do ganho médio de peso e do consumo médio de dieta dos pintos alimentados com as dietas S

e SN. Ainda em consequência da maior quantidade de L-leucina suplementada, a dieta RPM, nesse segundo período experimental, foi significativamente superior à dieta RPML com relação aos parâmetros ganho médio de peso e consumo médio de dieta. Com relação aos outros dois parâmetros, os pintos alimentados com a dieta RPM apresentaram valores maiores, mas não significativos, de acordo com o teste utilizado.

4.5. AMINOÁCIDOS LIVRES NO PLASMA

O quadro 6 mostra a concentração de aminoácidos livres no plasma dos pintos alimentados com as dietas S, SN, RPM, RPML e RC no fim do primeiro período experimental.

O processo utilizado para separação dos aminoácidos não foi capaz de separar lisina e ornitina, cujas concentrações foram registradas em um único pico. O mesmo fato ocorreu com alanina e ácido cisteico, e com asparagina e glutamina.

Os pintos alimentados com as dietas S e SN só apresentaram diferença significativa quanto às concentrações de lisina + ornitina e de ácido aspártico no plasma. A concentração de lisina + ornitina foi maior nos pintos da dieta S, e de ácido aspártico nos da dieta SN.

Entre os pintos alimentados com as dietas RPM e RPML, só houve diferença significativa quanto às concentrações de alanina e isoleucina, que foram maiores nos pintos da dieta RPM. Portanto, a adição de 1% de L-leucina contribuiu para a diminuição da concentração de alanina e isoleucina livres no plasma.

Comparando-se a concentração de aminoácidos livres

QUADRO 6. Aminoácidos livres, em $\mu\text{moles/ml}$, no plasma dos pintos alimentados com as dietas S (à base de sorgo), SN (S + niacina), RPM (à base de ração comercial para pintos postura misturada com amido), RPML (RPM + L-leucina¹) e RC (ração comercial para pintos corte) ao fim do primeiro período experimental.^{2, 3.}

Aminoácido	S	SN	RPM	RPML	RC
Lis + Orn	0,357 ± 0,079 ^b	0,140 ± 0,030 ^c	0,085 ± 0,048 ^c	0,070 ± 0,019 ^c	0,568 ± 0,184 ^a
His	0,081 ± 0,013 ^a	0,091 ± 0,020 ^a	0,091 ± 0,037 ^a	0,097 ± 0,022 ^a	0,080 ± 0,024 ^a
Arg	0,025 ± 0,004 ^c	0,025 ± 0,004 ^c	0,245 ± 0,024 ^b	0,243 ± 0,009 ^b	0,401 ± 0,056 ^a
Asp	0,036 ± 0,007 ^{bc}	0,062 ± 0,013 ^a	0,034 ± 0,007 ^{bc}	0,027 ± 0,013 ^c	0,055 ± 0,021 ^{ab}
Tre	0,314 ± 0,045 ^{bc}	0,335 ± 0,053 ^b	0,231 ± 0,061 ^{cd}	0,176 ± 0,039 ^d	0,455 ± 0,102 ^a
Ser	0,621 ± 0,046 ^a	0,565 ± 0,039 ^a	0,580 ± 0,122 ^a	0,508 ± 0,076 ^a	0,337 ± 0,192 ^b
Glu	0,099 ± 0,011 ^{ab}	0,125 ± 0,020 ^a	0,115 ± 0,028 ^{ab}	0,086 ± 0,027 ^b	0,097 ± 0,015 ^{ab}
Pro	0,287 ± 0,041 ^a	0,269 ± 0,043 ^a	0,257 ± 0,056 ^{ab}	0,192 ± 0,058 ^b	0,276 ± 0,041 ^a
Gli	0,364 ± 0,048 ^b	0,401 ± 0,053 ^b	0,619 ± 0,099 ^a	0,529 ± 0,091 ^a	0,363 ± 0,074 ^b
Ala	0,523 ± 0,058 ^a	0,570 ± 0,056 ^a	0,345 ± 0,083 ^b	0,245 ± 0,063 ^c	0,260 ± 0,046 ^{bc}
Met	0,061 ± 0,008 ^a	0,064 ± 0,008 ^a	0,020 ± 0,002 ^c	0,020 ± 0,006 ^c	0,042 ± 0,024 ^b
Iso	0,052 ± 0,004 ^b	0,055 ± 0,006 ^b	0,041 ± 0,008 ^b	0,021 ± 0,008 ^c	0,076 ± 0,027 ^a
Leu	0,161 ± 0,013 ^{ab}	0,181 ± 0,018 ^a	0,100 ± 0,015 ^c	0,106 ± 0,026 ^c	0,136 ± 0,026 ^b
Tir	0,197 ± 0,036 ^a	0,199 ± 0,031 ^a	0,080 ± 0,014 ^b	0,071 ± 0,015 ^b	0,101 ± 0,012 ^b
Fen	0,087 ± 0,008 ^{ab}	0,101 ± 0,014 ^a	0,080 ± 0,021 ^{ab}	0,071 ± 0,011 ^b	0,076 ± 0,017 ^b
Asn + Gln	1,358 ± 0,213 ^a	1,468 ± 0,171 ^a	0,534 ± 0,143 ^b	0,704 ± 0,121 ^b	0,615 ± 0,028 ^b
Iso/Leu ⁴	0,325 ± 0,023 ^c	0,304 ± 0,009 ^c	0,406 ± 0,028 ^b	0,202 ± 0,059 ^d	0,549 ± 0,088 ^a
Gli + Ser	0,985 ± 0,088 ^a	0,966 ± 0,089 ^a	1,158 ± 0,160 ^a	1,037 ± 0,156 ^a	0,721 ± 0,284 ^a

¹A suplementação com L-leucina foi de 1%. ² 18.^o dia de vida dos pintos. ³ Numa mesma linha, as médias assinaladas com pelo menos uma letra em comum não se diferenciaram significativamente pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade. ⁴ A razão não tem unidade.

no plasma dos pintos alimentados com as dietas S e SN, que apresentaram doença equivalente à pelagra, e dos pintos alimentados com as dietas RPM e RPML, que não apresentaram a doença, verificou-se diferença significativa entre as concentrações dos seguintes aminoácidos (para facilidade, a concentração do aminoácido em pintos de uma dieta será representada pela sigla da dieta):

Lis + Orn: S > SN, RPM e RPML.

Arg: RPM e RPML > S e SN.

Asp: SN > S, RPM e RPML

Tre: SN > RPM e RPML. S > RPML.

Glu: SN > RPML.

Pro: S e SN > RPML.

Gli: RPM e RPML > S e SN.

Ala: S e SN > RPM > RPML.

Met: S e SN > RPM e RPML.

Iso: S, SN e RPM > RPML.

Leu: S e SN > RPM e RPML.

Tir: S e SN > RPM e RPML.

Fen: SN > RPML.

Asn + Gln: S e SN > RPM e RPML.

Iso/Leu : RPM > S e SN > RPML.

As dietas não produziram diferença significativa quanto à concentração de glicina + serina no plasma dos pintos, apesar das diferenças existentes nas dietas quanto ao total desses dois aminoácidos.

4.6. GORDURA NO FÍGADO

A concentração de gordura no fígado dos pintos alimentados com as dietas S, SN, RPM, RPML e RC, ao fim do pri-

meiro período experimental, encontra-se no quadro 7.

As maiores concentrações de gordura foram encontradas nos pintos alimentados com as dietas RPM e RPML. Entre eles não houve diferença significativa, mas em relação aos pintos alimentados com as dietas S, SN e RC as diferenças foram significativas.

Entre os pintos alimentados com as dietas S e SN não houve diferença significativa, mas as concentrações, nesses pintos, foram significativamente maiores que a concentração nos pintos da dieta RC.

4.7. NUCLEOTÍDEOS DA NICOTINAMIDA NO FÍGADO E NOS ERITRÓCITOS

O quadro 8 mostra a concentração de nucleotídeos da nicotinamida no fígado e nos eritrócitos liofilizados dos pintos alimentados com as dietas S, SN, RCM, RCML e RC ao fim do primeiro período experimental, bem como algumas relações entre os nucleotídeos consideradas de interesse.

A análise do teor de umidade nos fígados liofilizados não revelou diferença significativa entre eles.

Os pintos alimentados com a dieta RC apresentaram concentração significativamente maior de NADP no fígado do que os alimentados com as outras dietas, e os pintos alimentados com as dietas RPM e RPML, mostraram concentrações significativamente maiores que os alimentados com as dietas à base de sorgo (S e SN). A adição de niacina à dieta S não provocou alteração significativa na concentração de NADP no fígado. A adição de L-leucina à dieta RPM também não alterou significativamente a concentração desse nucleotídeo.

Os pintos alimentados com as dietas S, RPM, RPML e

QUADRO 7. Porcentagem de gordura no fígado seco dos pintos alimentados com as dietas S (ã base de sorgo), SN (S + niacina), RPM (ã base de ração comercial para pintos postura misturada com amido), RPML (RPM + L-leucina¹) e RC (ração comercial para pintos corte) ao fim do primeiro período experimental.^{2,3}

Dietas	% de gordura
S	22,12 ± 5,17 ^b
SN	24,34 ± 2,86 ^b
RPM	32,11 ± 1,61 ^a
RPML	35,75 ± 4,64 ^a
RC	16,57 ± 0,60 ^c

¹A suplementação com L-leucina foi de 1%.

²18.º dia de vida dos pintos.

³As médias assinaladas com letras iguais não se diferenciaram significativamente pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

QUADRO 8. Concentração de nucleotídeos da nicotinamida e relações entre os nucleotídeos no fígado e nos eritrócitos de pintos alimentados com as dietas S (ã base de sorgo), SN (S + niacina), RPM (ã base de ração comercial para pintos postura misturada com amido), RPML (RPM + L-leucina¹) e RC (ração comercial para pintos corte) ao fim do primeiro período experimental.^{2,3}

Nucleotídeos	S	SN	RPM	RPML	RC
No fígado liofilizado					
NADP (mg/g)	0,218 ± 0,006 ^c	0,250 ± 0,022 ^c	0,323 ± 0,026 ^b	0,315 ± 0,024 ^b	0,455 ± 0,030 ^a
NAD (mg/g)	0,792 ± 0,052 ^b	1,089 ± 0,174 ^a	0,651 ± 0,055 ^b	0,706 ± 0,152 ^b	0,737 ± 0,022 ^b
NMN (mg/g)	0,014 ± 0,005 ^c	0,030 ± 0,004 ^b	0,047 ± 0,004 ^a	0,031 ± 0,004 ^b	0,047 ± 0,009 ^a
Total (mg/g)	1,024 ± 0,060 ^b	1,369 ± 0,183 ^a	1,021 ± 0,068 ^b	1,053 ± 0,178 ^b	1,239 ± 0,033 ^a
NMN/(NADP + NAD)	0,014 ± 0,005 ^e	0,023 ± 0,003 ^d	0,048 ± 0,004 ^a	0,031 ± 0,002 ^c	0,039 ± 0,007 ^b
NADP/(NAD + NMN)	0,271 ± 0,014 ^c	0,227 ± 0,037 ^c	0,464 ± 0,044 ^b	0,437 ± 0,066 ^b	0,581 ± 0,049 ^a
Nos eritrócitos liofilizados					
NADP (µg/g)	62,08 ± 4,64 ^{ab}	66,92 ± 3,40 ^a	59,85 ± 6,68 ^{ab}	55,61 ± 5,38 ^b	66,72 ± 2,75 ^a
NAD (µg/g)	231,26 ± 37,36 ^a	258,40 ± 81,88 ^a	233,85 ± 38,76 ^a	223,51 ± 48,55 ^a	306,20 ± 38,76 ^a
Total (µg/g)	293,34 ± 40,74 ^{ab}	325,32 ± 84,83 ^{ab}	293,70 ± 39,28 ^{ab}	279,12 ± 50,96 ^b	372,92 ± 41,33 ^a
NADP/NAD	0,27 ± 0,04 ^a	0,26 ± 0,09 ^a	0,26 ± 0,05 ^a	0,25 ± 0,05 ^a	0,22 ± 0,02 ^a

¹L-leucina adicionada = 1%.

²18.º dia de vida dos pintos.

³Em cada linha, as médias assinaladas com letras iguais não se diferenciaram significativamente pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

RC não apresentaram diferença significativa quanto à concentração de NAD no fígado, mas, nos pintos alimentados com a dieta SN, essa concentração foi significativamente maior que nos alimentados com as outras dietas. A adição de niacina à dieta S contribuiu, portanto, para a elevação da concentração desse nucleotídeo no fígado.

Quanto ao NMN, os pintos alimentados com as dietas RC e RPM apresentaram concentrações significativamente superiores aos alimentados com as outras dietas. A adição de niacina à dieta S elevou significativamente a concentração deste nucleotídeo no fígado (a concentração, nos pintos da dieta SN, foi significativamente maior que nos da dieta S), enquanto a adição L-leucina à dieta RPM causou diminuição significativa (a concentração, nos pintos da dieta RPML, foi significativamente menor que nos da dieta RPM).

Os pintos alimentados com as dietas SN e RC não se diferenciaram significativamente quanto à concentração total de nucleotídeos no fígado, mas foram significativamente superiores aos alimentados com as dietas S, RPM e RPML. A elevação das concentrações de NAD e NMN no fígado dos pintos alimentados com a dieta SN, provocada pela suplementação de niacina, fez que o total de nucleotídeos dessa dieta se igualasse ao da dieta controle RC.

A elevação da concentração dos nucleotídeos no fígado dos pintos alimentados com a dieta SN em relação à dieta S (devida, portanto, à suplementação de niacina) foi a seguinte: NADP, 14,7% (elevação não significativa); NAD, 37,5% e NMN, 114,3%. Em virtude da elevação da concentração de NMN em proporção muito maior que a de NADP e NAD, a razão $NMN/(NADP + NAD)$ para os pintos alimentados com a dieta SN se tornou significativamente maior que para os alimentados com a dieta S.

O valor da razão $\text{NMN}/(\text{NADP} + \text{NAD})$ no fígado dos pintos alimentados com a dieta RPML foi significativamente menor que a dos pintos alimentados com a dieta RPM, devido à diminuição da concentração de NMN provocada pela adição de L-leucina à dieta RPM.

O valor da razão $\text{NADP}/(\text{NAD} + \text{NMN})$ foi menor nos pintos alimentados com a dieta SN do que nos alimentados com a dieta S, mas a diferença não chegou a ser significativa. As dietas RPM e PRML também não se diferenciaram significativamente quanto a essa razão. Devido principalmente à concentração elevada de NADP no fígado dos pintos alimentados com a dieta RC, o valor da razão $\text{NADP}/(\text{NAD} + \text{NMN})$ nesses pintos foi significativamente superior à dos pintos alimentados com as outras dietas.

Nos eritrócitos, as concentrações de NADP dos pintos alimentados com as dietas SN e RC foram significativamente maiores que a dos pintos alimentados com a dieta RPML. Entretanto, as dietas RPM e RPML não se diferenciaram significativamente quanto a esse parâmetro, de modo que não houve evidências de que a adição de L-leucina tenha contribuído para diminuir a concentração de NADP no fígado. A dieta RC foi também significativamente superior à dieta RPML quanto ao total de nucleotídeos nos eritrócitos. Não houve, nos eritrócitos, outras diferenças significativas.

5. DISCUSSÃO

O teor de tanino no cultivar de sorgo utilizado nessa pesquisa era muito baixo (0,14%), e nas dietas S e SN, à base do sorgo, 0,13%. O tanino reduz a absorção das proteínas pelos animais (12), e segundo FULLER *et alii*, citados por SCHAFFERT *et alii* (56), o crescimento de pintos é retardado quando o tanino contido nos grãos de sorgo excede 0,8% da dieta. Tomando-se esse dado como base, a concentração de tanino nas dietas S e SN era 1/6 da concentração mínima necessária para que o seu efeito sobre a absorção das proteínas se manifestasse. Portanto, os resultados obtidos nessa pesquisa não podem ter sido influenciados pelo tanino existente no sorgo.

O teor proteico (quadro 1) e a composição em aminoácidos (quadro 2) dos grãos do sorgo utilizado nessa pesquisa se enquadram dentro dos limites considerados normais para esse cereal, de acordo com os dados da coleção mundial de sorgo (93).

O cálculo dos escores químicos dos aminoácidos, conforme proposto por MITCHELL & BLOCK (94), tomando-se como padrão a proteína do ovo integral, ou a da dieta controle RC, revelou que a lisina, no sorgo, era o primeiro aminoácido limitante, fato que está de acordo com as citações da literatura (55). A suplementação das dietas à base de sorgo (S e SN) com L-lisina.HCl, na proporção de 5 g/kg, fez que a concentração de lisina, nessas dietas, se tornasse 1,24 vezes a das dietas

RPM e RPML, mas ainda muito menor que a da dieta controle RC.

O escore químico revelou também que o triptofano, no sorgo, era o segundo aminoácido limitante quando a proteína da dieta controle RC foi usada como padrão, mas, em relação à proteína do ovo integral (95), o seu escore era relativamente alto, e ele deixava de figurar entre os mais limitantes. A concentração de triptofano no cultivar de sorgo utilizado nessa pesquisa era comparável à descrita por GOPALAN & SRIKANTIA (4) para os cultivares de sorgo usados pelas populações por eles estudadas na Índia. Considerando-se 1) que a niacina do sorgo normalmente se acha sob forma não metilada, e portanto, utilizável pelos animais (17); 2) que 60 mg de triptofano equivalem a 1 mg de niacina (20); 3) que as dietas foram suplementadas com piridoxina, vitamina de importância especial na via metabólica que sintetiza niacina a partir de triptofano; 4) que a dieta SN foi obtida pela adição de ácido nicotínico à dieta S, na proporção de 25 mg/kg, dose suficiente para atender às necessidades dos pintos em fase inicial de desenvolvimento (92), calculou-se que a dieta SN continha 59,2 equivalentes de niacina por quilo (10,3 mg de niacina do próprio sorgo + 23,7 mg de niacina correspondentes a 1/60 do triptofano contido no sorgo + 25 mg de ácido nicotínico adicionado). As dietas RPM e RPML continham nível mais elevado de equivalentes de niacina (82,6 equivalentes, sendo 57 mg correspondentes a 1/60 do triptofano e 25,6 mg de niacina adicionados, sem se considerar a niacina existente nos ingredientes da ração básica). Entretanto, os 59,2 equivalentes de niacina da dieta SN, e mesmo os 34,7 equivalentes da dieta S estavam muito acima das necessidades dos pintos em relação a essa vitamina (92).

O escore químico para metionina, em relação à proteína do ovo integral, indicou ser ela o segundo aminoácido

limitante no sorgo, mas, em relação à proteína da dieta controle RC, esse escore era relativamente alto, e de acordo com ele a metionina, no sorgo, não se incluía entre os aminoácidos mais limitantes. A adição de DL-metionina às dietas S e SN, na proporção de 2 g/kg, fez que a concentração desse aminoácido nessas duas dietas se tornasse quase 2,3 vezes a das dietas RPM e RPML. Considerando-se, entretanto, que a forma D (metade da metionina adicionada) não é utilizada pelos pintos, a quantidade de metionina utilizável nas dietas S e SN foi de 1,6 vezes a das dietas RPM e RPML.

Foi escolhido o teor proteico de 11,6% para as dietas S e SN, à base de sorgo, porque, considerando-se a porcentagem de proteína existente no sorgo (12,38%), e a necessidade de serem adicionados outros ingredientes (vitaminas, sais minerais, aminoácidos e óleo), aquele seria o maior teor proteico possível.

Considerando-se 1) que as dietas RPM e RPML eram isoproteicas e isocalóricas em relação às dietas S e SN; 2) que os teores de vitaminas e sais minerais nas quatro dietas eram aproximadamente iguais; 3) o que já foi discutido anteriormente, conclui-se que os maiores valores conseguidos pelos pintos alimentados com as dietas RPM e RPML em relação aos alimentados com as dietas S e SN, quando avaliados através dos parâmetros nutricionais ganho médio de peso, consumo médio de dieta, eficiência alimentar, eficiência proteica e retenção de nitrogênio, não podem ser atribuídos a diferenças no teor proteico-calórico das dietas, nem à ação de taninos sobre a absorção das proteínas no tubo digestivo dos pintos, nem a diferenças nas concentrações de vitaminas e sais minerais, nem a deficiências de lisina, metionina e equivalentes de niacina. A ocorrência de doença equivalente à pelagra nos pintos alimentados com as die-

tas S e SN não pode, de modo semelhante, ser atribuída a qualquer um desses fatores.

ALBUQUERQUE (96) determinou a curva de crescimento para fêmeas da linhagem utilizada nesta pesquisa, e, através dela, foi possível verificar que os pintos alimentados com a dieta controle RC tiveram crescimento normal. Esses pintos obtiveram valores significativamente maiores que os alimentados com as outras dietas em todos os parâmetros nutricionais considerados (quadro 5), com exceção de eficiência proteica. Isso indica que o total de nitrogênio da dieta RC era muito superior às necessidades dos pintos. É possível que o teor proteico utilizado atualmente em rações para pintos corte (22,5%) seja necessário para manter em nível adequado alguns aminoácidos que entram em pequena proporção nas proteínas dos componentes da dieta, ou para manter dentro de certos limites a relação entre as concentrações de determinados aminoácidos. Quando se puder determinar com certa precisão os níveis convenientes de todos os aminoácidos em uma dieta, talvez seja possível aumentar-se a eficiência ou diminuir-se o teor proteico delas, utilizando-se fontes proteicas melhoradas e suplementações adequadas.

O desbalanceamento de aminoácidos provocado pela adição de 1% de L-leucina à dieta RPM, do 1.^o ao 18.^o dia de vida dos pintos, não foi suficiente para prejudicar a qualidade nutricional dessa dieta, uma vez que os pintos alimentados com a dieta RPML não diferiram significativamente dos alimentados com a dieta RPM durante esse primeiro período experimental. No segundo período experimental (18.^o ao 29.^o dia de vida dos pintos), o desbalanceamento de aminoácidos provocado pela adição de 3% de L-leucina à dieta RPM foi muito mais drástico, e

os pintos alimentados com a dieta RPML apresentaram ganho médio de peso e consumo médio de dieta significativamente menores que os alimentados com a dieta RPM, e estatisticamente não diferentes dos alimentados com as dietas S e SN.

No primeiro período experimental os valores das razões Iso/Leu, (Iso + Val)/Leu e Val/Leu na dieta RPML eram menores que os valores das razões respectivas nas dietas S e SN (quadro 4). Como as concentrações de isoleucina (3,89 g/kg) e valina (5,18 g/kg) nas dietas S e SN não diferiam significativamente das concentrações respectivas desses aminoácidos nas dietas RPM e RPML (3,93 e 4,86 mg/kg), deduz-se que as variações no valor daquelas razões foram devidas à variação da concentração de leucina nas dietas. De fato, a dieta RPML continha 20,21 g de leucina por kg, quase o dobro do teor contido na dieta RPM (10,21 g/kg), enquanto as dietas S e SN continham 16,42 g/kg. Se uma diferença de 10 g/kg na concentração de leucina da dieta RPML para a dieta RPM (única diferença existente entre as duas dietas) não produziu diferença significativa entre a qualidade nutricional dessas duas dietas, a pior qualidade nutricional das dietas S e SN em relação à dieta RPM não pode ser atribuída à diferença de 6,21 g/kg na concentração de leucina existente entre as dietas S e SN e a dieta RPM. Semelhantemente, a ocorrência de doença equivalente à pelagra nos pintos alimentados com as dietas S e SN não pode ser atribuída à concentração de leucina nessas dietas, uma vez que os pintos alimentados com a dieta RPML, com maior concentração desse aminoácido, não apresentaram qualquer manifestação externa específica da doença, mesmo quando a concentração de leucina foi elevada para 40,21 g/kg, no segundo período experimental. Essa dedução foi confirmada a nível bioquímico, pois as concentrações de NADP e NAD no fígado e nos eritrócitos dos pintos ali-

mentados com a dieta RPML não diferiram significativamente das respectivas concentrações nos pintos alimentados com a dieta RPM.

Esses resultados, em pintos, não confirmam a hipótese de GOPALAN & SRIKANTIA (4), formulada para seres humanos, relacionando excesso de leucina na dieta com incidência de pelagra, nem com os resultados obtidos por BELAVADY *et alii* (19) e BELAVADY & GOPALAN (71), que produziram, em cães, doença equivalente à pelagra (língua preta) através da administração de leucina em excesso. Concordam, entretanto, com os resultados obtidos por ALLEN *et alii* (10), que não conseguiram desenvolver deficiência de ácido nicotínico em pintos com suplementações de leucina, e com os de MANSON & CARPENTER (73), que não conseguiram reproduzir os resultados de BELAVADY *et alii* (19) em cães.

Quanto ao efeito do excesso de leucina sobre a concentração total de nucleotídeos da nicotinamida nos eritrócitos, os resultados dessa pesquisa, indicando não haver efeito algum, concordam com os resultados de RAGHURAMULU *et alii* (5) e de SRIKANTIA *et alii* (6), em seres humanos. Mas, com relação aos nucleotídeos individuais houve discordância: SRIKANTIA *et alii* (6) verificaram aumento de NMN e diminuição de NADP + NAD, e a presente pesquisa não revelou alteração significativa na concentração desses nucleotídeos.

A comparação entre as dietas RPM e RPML mostrou que o excesso de leucina não alterou, também, a concentração individual dos nucleotídeos no fígado, com exceção de NMN. Entretanto, nesta pesquisa, o excesso de leucina diminuiu a concentração de NMN no fígado, enquanto na de SRIKANTIA *et alii* (6) o excesso de leucina aumentou a concentração desse nucleotídeo nos eritrócitos.

As dietas S e SN continham teor de leucina sensivelmente maior do que a dieta RPM. Esse fato e a menor retenção de nitrogênio das dietas S e SN podem justificar a concentração significativamente maior de leucina no plasma dos pintos alimentados com as dietas S e SN quando comparados com os alimentados com a dieta RPM.

A dieta RC continha teor de leucina sensivelmente maior do que as dietas S e SN, mas a concentração de leucina no plasma dos pintos alimentados com a dieta RC era significativamente menor que a dos pintos alimentados com as dietas S e SN. Uma justificativa para essa diferença significativa deve ser a maior utilização de nitrogênio pelos pintos da dieta RC: a porcentagem de nitrogênio retido em relação à quantidade ingerida foi de 42,6%, 41,5%, 77,9%, 50,4% e 85,0% com as dietas S, SN, PPM, RPML e RC respectivamente. A utilização dos aminoácidos da dieta RC foi, portanto, muito maior do que a das dietas S e SN.

A dieta RPML continha teor de leucina sensivelmente maior que as dietas S, SN e RPM, e aproximadamente igual à dieta RC, devido à suplementação com 1% de L-leucina. Entretanto, os pintos alimentados com a dieta RPML comportaram-se de maneira semelhante aos alimentados com a dieta RPM, tanto em relação aos parâmetros nutricionais quanto em relação à concentração de leucina no plasma. Uma hipótese para explicar este fato é a de que a absorção da leucina adicionada à dieta RPML tenha sido pequena. A retenção de nitrogênio significativamente menor dos pintos alimentados com a dieta RPML em relação aos alimentados com a dieta RPM é uma evidência em favor dessa hipótese. Caso ela seja confirmada, é possível que a leucina existente em excesso no sorgo, absorvida pelos pintos, exerça realmente algum papel na etiologia da pelagra.

Nas dietas S e SN as concentrações dos aminoácidos lisina, prolina, alanina, valina, tirosina, cistina + cisteína (ácido cisteico) e metionina foram maiores que nas dietas RPM e RPML (quadro 3). Examinando-se a concentração desses aminoácidos no plasma dos pintos (quadro 6), verifica-se que, coincidentemente, elas foram significativamente maiores no plasma dos pintos alimentados com as dietas S e SN do que no plasma dos pintos alimentados com as dietas RPM e RPML, ou então não diferentes estatisticamente, mas nunca menores significativamente. Essa observação só não é válida para os aminoácidos valina e cistina + cisteína (ácido cisteico), que não puderam ser determinados no plasma através do processo cromatográfico utilizado. Lisina + ornitina nos pintos da dieta S e alanina, tirosina e metionina nos pintos das dietas S e SN tinham concentrações no plasma significativamente superiores às dos pintos das dietas RPM e RPML. Esse fato se justifica, porque as concentrações desses aminoácidos nas dietas S e SN eram muito maiores que nas dietas RPM e RPML. É possível, portanto, que o excesso de algum desses aminoácidos tenha contribuído para a pior qualidade nutricional das dietas S e SN em relação às dietas RPM e RPML durante o primeiro período experimental, bem como a ocorrência de pelagra nos pintos alimentados com as dietas S e SN.

O relacionamento das concentrações de ácido aspártico e glutâmico nas dietas e nos plasmas dos pintos não foi possível porque nas dietas as concentrações de ácido aspártico e asparagina se acham somados, bem como as de ácido glutâmico e glutamina.

BEDI *et alii* (97) verificaram que o nível de ácido glutâmico no plasma de indivíduos portadores de pelagra era maior que em indivíduos normais. Por outro lado, entre os por-

tadores de pelagra, os que apresentavam manifestações neurológicas possuíam níveis mais elevados desse aminoácido do que aqueles nos quais tais manifestações não foram observadas. Os autores não sugeriram qualquer explicação para o fenômeno, mas comentaram que o ácido glutâmico e seus metabolitos imediatos são de grande importância para o cérebro. Na deficiência de NADP e NAD nas células do cérebro e da medula espinhal a oxidação do ácido glutâmico a alfa-cetoglutarato e amônia livre será diminuída, enquanto a conversão dele em ácido gama-aminobutírico continuará. O ácido gama-aminobutírico é um inibidor neuronal e pode estar envolvido nas manifestações de pelagra.

Os resultados da presente pesquisa, em pintos, não concordaram com os de BEDI *et alii* (97), uma vez que as concentrações de ácido glutâmico no plasma dos pintos portadores de doença equivalente à pelagra (dietas S e SN) não se diferenciaram significativamente das concentrações respectivas no plasma dos pintos alimentados com as dietas RPM e RC. Entretanto, o plasma dos pintos alimentados com as dietas S e SN apresentaram concentrações elevadas de asparagina + glutamina, significativamente superiores às das demais dietas. Nas condições em que foi feita a hidrólise ácida para análise de aminoácidos nas dietas, a asparagina se transformou em ácido aspártico e a glutamina em ácido glutâmico, de modo que o aminograma das dietas forneceu a soma de ácido aspártico + asparagina e de ácido glutâmico + glutamina. No tubo digestivo dos animais, entretanto, a asparagina e a glutamina não são afetadas pela hidrólise, razão pela qual, na determinação de aminoácidos livres no plasma, as concentrações de asparaginã e glutamina foram registradas separadas de ácido aspártico e ácido glutâmico, mas em um único pico. Como as concentrações de ácido glutâmico + glutamina nas dietas foram muito maiores que as de ácido aspártico +

asparagina, parece lógico admitir-se que no pico correspondente a asparagina + glutamina a maior contribuição seja de glutamina. Como ácido glutâmico e glutamina são facilmente interconvertíveis, é possível que a elevada concentração de glutamina no plasma dos pintos portadores de doença equivalente à pelagra tenha a mesma origem da elevada concentração de ácido glutâmico no plasma de indivíduos portadores de pelagra.

Nas dietas S e SN, a concentração de treonina era menor que nas dietas RPM e RPML. No plasma, entretanto, os pintos alimentados com a dieta S apresentaram concentração significativamente superior aos alimentados com a dieta RPML, e os alimentados com a dieta SN apresentaram concentração significativamente superior aos alimentados com as dietas RPM e RPML, sugerindo isso uma menor utilização de treonina pelos pintos alimentados com as dietas S e SN.

O excesso de treonina na dieta aumenta a necessidade de triptofano, em pintos. Segundo D'MELLO & LEWIS (49), quando o nível de treonina na dieta varia de 0,8 a 2,3%, um aumento de 0,5% no nível de treonina aumenta de 0,01% a necessidade de triptofano. Esse fato, entretanto, parece não se aplicar a essa pesquisa, pois o nível de treonina nas dietas S e SN era muito menor (0,35%). Portanto, é pouco provável que a concentração de treonina nas dietas S e SN tenha influenciado desfavoravelmente na qualidade nutricional dessas dietas ou na ocorrência de doença equivalente à pelagra nos pintos com elas alimentados. A influência desfavorável seria do fator que está provocando uma menor utilização desse aminoácido.

As concentrações de arginina e glicina nas dietas S e SN eram muito menores que nas dietas RPM e RPML, e, coincidentemente, as concentrações desses aminoácidos no plasma dos pintos alimentados com as dietas S e SN foram significati-

vamente menores que as concentrações respectivas no plasma dos pintos alimentados com as dietas RPM e RPML.

D'MELLO & LEWIS (49) observaram uma relação linear entre as necessidades de arginina e lisina em pintos, enquanto ALLEN *et alii* (98) demonstraram que a eficiência da utilização de arginina se tornava 59% do valor do controle quando o nível de lisina na dieta se elevava para 1,84%. NESHEIM (11) analisou dados de diversas pesquisas e concluiu que, quando a razão lisina/arginina na dieta era maior que 1,2 a 1,3 o crescimento de aves quase sempre era menor. No caso das dietas S e SN, a razão lisina/arginina era 1,64 (muito maior, portanto, que os limites estabelecidos por NESHEIM), enquanto nas dietas RPM e RPML era 0,85, e na dieta RC, 0,91.

O mecanismo de interação entre arginina e lisina está relacionado com a influência da lisina sobre o nível da enzima arginase nos rins dos pintos. Essa enzima decompõe a arginina em uréia e ornitina (11). A ornitina pode ser metabolizada posteriormente, enquanto a uréia é excretada na urina. Quando há excesso de lisina na dieta, a atividade da enzima arginase nos rins aumenta, aumentando, conseqüentemente, a decomposição de arginina e a excreção de uréia na urina (99).

Existem linhagens de pintos que requerem alto nível de arginina na dieta e linhagens que requerem baixo nível. Numa comparação entre uma linhagem que requeria alto nível e outra que requeria baixo nível de arginina na dieta, verificou-se que a de alto nível apresentava níveis elevados de lisina circulando no plasma. Essa diferença na concentração de lisina no plasma era, provavelmente, responsável pela diferença entre as duas linhagens quanto à atividade da arginase. A capacidade de uma linhagem tolerar excesso de lisina parece ser devida à diferença de atividade da enzima lisina-alfa-cetoglu-

tarato redutase no fígado. A linhagem que requeria alto nível de arginina possuía menor concentração dessa enzima do que a que requeria baixo nível. A enzima lisina-alfa-cetoglutarato redutase é necessária no início da via de degradação da lisina não utilizada para síntese de proteína (11).

Outros aminoácidos, quando em excesso na dieta, podem causar aumento de atividade da enzima arginase: histidina, isoleucina, ornitina, tirosina e fenilalanina (11). Não parece ser o caso, entretanto, da presente pesquisa, uma vez que as dietas S, SN, RPM e RPML não apresentam diferenças sensíveis quanto à concentração desses aminoácidos, e, segundo NESHEIM (11), com exceção de fenilalanina, são necessários níveis muito elevados desses aminoácidos, quando comparados aos de lisina, para provocar redução no crescimento dos pintos e elevar a atividade da enzima arginase.

Outra interação possível seria entre arginina e metionina: com níveis marginais de metionina, o excesso de arginina diminui o crescimento de pintos (11). Essa interação, entretanto, parece não estar influenciando os resultados dessa pesquisa.

NGO & COON (100) concluíram que, para maior ganho de peso, as dietas para pintos de 1 a 9 dias de idade deveriam conter 2,15% de glicina + serina, e dos 10 aos 21 dias de idade esse teor poderia ser diminuído para 1,15%. Na presente pesquisa, as dietas à base de sorgo (S e SN) continham 0,78% de glicina + serina, as dietas RPM e RPML continham 1,36% e a dieta controle RC, 2,34% (quadro 4). A deficiência de glicina + serina nas dietas S e SN era, portanto, muito mais acentuada do que nas dietas RPM e RPML, e só a dieta RC continha nível adequado desses dois aminoácidos.

Apesar das diferenças de concentração de glicina

+ serina nas dietas, no plasma dos pintos não houve diferença significativa no total desses dois aminoácidos, sugerindo isso ter havido maior absorção ou menor utilização deles nos pintos alimentados com as dietas S e SN quando comparados com os alimentados com as dietas RPM, RPML e RC, e maior absorção ou menor utilização nos pintos alimentados com as dietas RPM e RPML quando comparados aos alimentados com a dieta RC.

BEDI *et alii* (97) verificaram que o nível de serina no plasma de indivíduos portadores de pelagra era significativamente maior que no plasma de indivíduos normais, mas não ofereceu explicação para o fato. O nível de glicina, entretanto, se manteve dentro dos limites normais.

A glicina é um dos precursores da creatina, do ácido úrico e de purinas. É possível, portanto, que o nível requerido pelos pintos, de 2,15% de glicina + serina na dieta, durante os primeiros 9 dias de vida, esteja relacionado com a necessidade de glicina para a síntese e manutenção de níveis normais daqueles compostos. Demonstrou-se que os níveis de creatina no músculo peitoral e de ácido úrico no soro de pintos alimentados com uma dieta completa em aminoácidos aumentou inicialmente e atingiu valor máximo aos 14 dias de idade. No fígado, as concentrações de DNA, RNA e proteína também aumentaram com a idade. Quando a glicina foi removida da dieta, os níveis de todos esses compostos foram reduzidos significativamente (100).

A glicina, além disso, é um dos constituintes da glutatona, que participa do mecanismo de transporte de aminoácidos para o interior das células, e é um dos aminoácidos absorvidos seletivamente pelo cérebro (20).

Nas pesquisas em que BELAVADY & GOPALAN (71) e BELAVADY *et alii* (19) produziram língua preta em cães, adminis

trando leucina em excesso através da dieta, a fonte proteica da dieta era caseína, que possui teor relativamente baixo de glicina + serina. Em análise realizada no Departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais em caseína marca Tacrigy, o total de glicina + serina foi de 6,36 g por 100 g de proteína. Numa dieta com 21% de proteína, como eles usaram, o total de glicina + serina na dieta seria 1,33%, e numa com 18% de proteína, 1,14%.

Quanto à serina, exerce papel importante no metabolismo de lípidos, pois faz parte do centro ativo de enzima envolvida no mecanismo de síntese. É também utilizada para síntese de esfingolípides, que entram na composição do cérebro, e de fosfatidilserina, um dos componentes lipídicos da membrana dos eritrócitos (6%), da mielina (4,8%) e da massa branca e cinzenta do cérebro, contribuindo com 7,9% e 8,7%, respectivamente, do total de lípidos (20).

Os pintos alimentados com a dieta controle RC apresentaram teor de gordura no fígado significativamente menor que os alimentados com as outras dietas, como se previa. Por outro lado, os pintos alimentados com as dietas RPM e RPML continham teor de gordura no fígado significativamente maior que os alimentados com as dietas S e SN, indicando isso que as manchas amareladas observadas apenas nos fígados dos pintos mantidos com as dietas S e SN possivelmente foram provocadas pela localização de gorduras em determinadas regiões do órgão. Os dados sugerem que o menor teor de gordura no fígado dos pintos alimentados com as dietas S e SN em relação às dietas RPM e RPML seja consequência da menor concentração de NADP e da menor utilização de serina nesses fígados, uma vez que ambos são necessários à síntese de lípidos. A adição de 1% de L-leucina à dieta RPM não alterou significativamente o teor de gor-

dura no fígado dos pintos.

As concentrações de nucleotídeos da nicotinamida nos eritrócitos dos pintos ao fim do primeiro período experimental (18.^o dia de vida dos pintos) não foram alterados significativamente pelas dietas testadas. No fígado, entretanto, ocorreram alterações significativas, provocadas pela natureza das dietas. Esse fato constitui evidência a favor da hipótese formulada por AXELROD *et alii* (101) de que, em certos órgãos (cêrebro, córtex dos rins e células vermelhas do sangue), o nível normal de NAD é absolutamente essencial (uma diminuição é incompatível com a vida), enquanto em outros, como o fígado e os músculos, a variação do nível não tem aquela importância vital.

Está devidamente comprovado, através de dados da literatura, que a pelagra, ou doença equivalente, é provocada pela deficiência de derivados biologicamente ativos da niacina (9, 22, 23).

Nos pintos alimentados com a dieta S houve ocorrência de doença equivalente à pelagra, e o nível de NMN no fígado desses pintos foi significativamente menor que no fígado dos pintos alimentados com as outras dietas. A ocorrência da doença, nesses pintos, entretanto, não pode ser atribuída à deficiência de NMN, pois os pintos alimentados com a dieta SN também apresentaram a doença, apesar de terem níveis de NMN comparáveis aos dos pintos alimentados com a dieta RPML, que não apresentaram a doença. Além disso, o NMN é apenas um intermediário na via metabólica de síntese do NAD e do NADP, não tendo sido encontrada na literatura qualquer indicação de que seja utilizado para outras atividades metabólicas.

A ocorrência de doença equivalente à pelagra também não pode ser atribuída à deficiência de NAD, pois o nível des-

se nucleotídeo no fígado dos pintos alimentados com a dieta SN foi significativamente maior que o dos pintos alimentados com as outras dietas, enquanto o nível no fígado dos pintos alimentados com a dieta S era comparável ao das dietas RPM e RPML.

Finalmente, os dados sugerem que a ocorrência de doença equivalente à pelagra nos pintos alimentados com as dietas S e SN seja devida à deficiência de NADP, uma vez que as concentrações desse nucleotídeo no fígado dos pintos alimentados com essas dietas foram significativamente menores que as dos pintos alimentados com as dietas RPM, RPML e RC, nos quais a doença não ocorreu.

A adição de ácido nicotínico à dieta S elevou em 14,7% a concentração de NADP, em 37,5% a concentração de NAD e em 114,3% a concentração de NMN no fígado dos pintos alimentados com a dieta SN, quando comparados com os alimentados com a dieta S. A elevação na concentração de NADP não foi suficiente para torná-la significativamente maior que a da dieta S, enquanto a elevação na concentração de NAD fez que ela se tornasse significativamente maior que a dos pintos alimentados com as demais dietas. Esse fato sugere a existência, no sorgo, de um agente inibidor da fosforilação do NAD, provocando uma diminuição da síntese de NADP.

A enzima que catalisa a fosforilação do NAD é NAD kinase (ATP: NAD 2'-fosfotransferase). Essa enzima, extraída do fígado de pombo, catalisa também a fosforilação do análogo do NAD em que a nicotinamida é substituída por 3-acetilpiridina (102). Entretanto, WOOLLEY (103) provocou sinais típicos de deficiência de ácido nicotínico em camundongos, administrando, oralmente, 2 ou mais g de 3-acetilpiridina por dia, em uma única dose diária. Os sinais da doença foram prevenidos quando a

dieta continha quantidades suficientes de ácido nicotínico ou nicotinamida. Posteriormente WOOLLEY (104) demonstrou que também o triptofano prevenia as manifestações da doença equivalente à pelagra provocadas por 3-acetilpiridina e sugeriu que seria interessante, para estudo da etiologia da pelagra, pesquisar a presença de análogos estruturais do ácido nicotínico no milho. Esse mesmo autor (3) conseguiu provocar sintomas de doença equivalente à pelagra em camundongos, adicionando à dieta um extrato de grãos de milho, na proporção de 1 mg/100 g. Considerando que o milho é uma rica fonte de ácido 3-indolacético (a maior parte em forma de um precursor, que é convertido em ácido enzimaticamente ou em meio ligeiramente alcalino), KODICEK *et alii* (105) testaram os efeitos desse ácido na alimentação de ratos, e comprovaram que ele provocou severa depressão no crescimento, que pôde ser revertido com ácido nicotínico ou triptofano. Portanto, a ocorrência de análogos do ácido nicotínico no sorgo, e sua participação na etiologia da pelagra, merece ser investigada.

6. CONCLUSÕES

1. Dieta com 11,6% de proteína, tendo sorgo como única fonte proteica, provocou doença equivalente à pelagra em pintos em fase inicial de desenvolvimento.
2. A adição de ácido nicotínico à dieta à base de sorgo, na proporção 25 mg/kg, não preveniu a ocorrência da doença.
3. O fator ou os fatores responsáveis pela ocorrência da doença equivalente à pelagra estavam contidos no sorgo, uma vez que os pintos alimentados com as dietas controle, isoproteicas e isocalóricas em relação à dieta à base de sorgo, não apresentaram sintomas da doença.
4. Foram encontradas evidências de que a ocorrência de doença equivalente à pelagra nos pintos alimentados com a dieta à base de sorgo, suplementada ou não com ácido nicotínico, não pode ser atribuída à concentração de tanino, ao teor proteico, ao desequilíbrio calórico-proteico, nem à deficiência de equivalentes de niacina da dieta.
5. A qualidade nutricional da dieta à base de sorgo, suplementada ou não com ácido nicotínico, foi significativamente inferior à das dietas controle.

6. Os resultados sugerem que a inferioridade nutricional da dieta à base de sorgo, suplementada ou não com ácido nicotínico, deve ser atribuída ao fator ou aos fatores responsáveis pela ocorrência da doença equivalente à pelagra, possivelmente em associação com desbalanceamentos de aminoácidos das proteínas do sorgo.
7. Houve evidências de que a leucina adicionada à dieta controle até o 18.^o dia de vida dos pintos foi pouco absorvida. Em virtude disso, não ficou afastada inequivocamente a possibilidade de que o excesso de leucina do sorgo estivesse influenciando na etiologia da doença equivalente à pelagra.
8. O estudo comparativo da proporção de cada aminoácido nas dietas e nos plasmas dos pintos revelou que estavam muito elevadas as concentrações de glicina + serina e glutamina + asparina no plasma dos pintos alimentados com a dieta à base de sorgo, suplementada ou não com ácido nicotínico.
9. As dietas testadas não alteraram significativamente a concentração total nem a concentração individual dos nucleotídeos da nicotinamida nos eritrócitos dos pintos aos 18 dias de vida, mas no fígado elas provocaram alterações significativas tanto na concentração total quanto na concentração individual dos nucleotídeos, sugerindo isso ser o fígado um órgão mais apropriado que os eritrócitos para o estudo dessas alterações.
10. Os resultados sugerem, em princípio, que a doença equivalente à pelagra foi produzida por deficiência de NADP, e que essa deficiência ocorreu em virtude de diminuição sig-

nificativa da fosforilação do NAD.

11. Merece ser investigada, na etiologia da pelagra ou doença equivalente, a participação dos aminoácidos glicina + serina, ácido glutâmico e glutamina, bem como de análogos da niacina naturalmente existentes no sorgo e no milho.

7. RESUMO

Pintos em fase inicial de desenvolvimento foram alimentados com dieta contendo 11,6% de proteína, suplementada ou não com ácido nicotínico, e cuja única fonte proteica era um cultivar de sorgo com alto teor de leucina, e apresentaram doença equivalente à pelagra. Os pintos alimentados com a dieta controle apresentaram maior ganho de peso, maior eficiência alimentar, maior eficiência proteica e maior retenção de nitrogênio que os alimentados com as dietas à base de sorgo, a não ser quando a concentração de leucina na dieta controle foi elevada para 245% da concentração desse aminoácido na dieta à base de sorgo.

Foram estudados os efeitos das dietas sobre o acúmulo de gorduras no fígado, a concentração de aminoácidos livres no plasma e sobre a concentração total e individual de nucleotídeos da nicotinamida no fígado e nos eritrócitos dos pintos. Os resultados sugerem que a ocorrência de doença equivalente à pelagra não pode ser atribuída à concentração de tanino, nem ao teor proteico, nem ao desequilíbrio calórico-proteico, nem à deficiência de equivalentes de niacina da dieta à base de sorgo, mas sim à deficiência de NADP nos pintos, provocada possivelmente pela inibição da fosforilação do NAD por fator não determinado. Foram formuladas hipóteses sobre a participação de glicina, serina, ácido glutâmico, glutamina e

análogos da niacina na etiologia da pelagra ou doença equivalente, mas a possibilidade de participação da leucina não ficou inequivocamente afastada.

8. SUGESTÕES PARA NOVAS PESQUISAS

8.1. Determinar a proporção em que a leucina adicionada à dieta controle está sendo absorvida pelos pintos.

8.2. Pesquisar a possibilidade dos aminoácidos glicina + serina e ácido glutâmico + glutamina estarem participando na etiologia da doença equivalente à pelagra.

8.3. Investigar a possibilidade de análogos da niacina estarem participando na etiologia da doença equivalente à pelagra.

8.4. Pesquisar o efeito da suplementação da dieta à base de sorgo com extrato proteico do próprio sorgo sobre a ocorrência de doença equivalente à pelagra.

8.5. Montar um método para extração de proteínas de cereais, a fim de que a sugestão apresentada no item 4 seja exequível.

8.6. Suplementar dietas sabidamente indutoras de doença equivalente à pelagra com triptofano ou niacina isotopicamente marcados e estudar a variação de concentração dos nucleotídeos da nicotinamida no fígado.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANÔNIMO. Effect of high intake of leucine on urinary tryptophan and niacin metabolites in humans. *Nutr. Rev.* 34: 105-107, 1976.
2. KREHL, W.A., TEPLY, L.J. & ELVEHJEM, C.A. Corn as an etiological factor in the production of a nicotinic acid deficiency in the rat. *Science* 101: 283, 1945.
3. WOOLLEY, D.W., HOLLOWAY, A. & BROWN, R.A. The occurrence of a "pellagragenic" agent in corn. *J. Biol. Chem.* 163: 773-774, 1946.
4. GOPALAN, C. & SRIKANTIA, S.G. Leucine and pellagra. *Lancet* 1: 954-957, 1960.
5. RAGHURAMULU, N., SRIKANTIA, S.G., NARASINGA RAO, B.S. & GOPALAN, C. Nicotinamide nucleotides in the erythrocytes of patients suffering from pellagra. *Biochem. J.* 96: 837-839, 1965.
6. SRIKANTIA, S.G., NARASINGA RAO, B.S., RAGHURAMULU, N. & GOPALAN, C. Pattern of nicotinamide nucleotides in the erythrocytes of pellagrins. *Am. J. Clin. Nutr.* 21: 1306-1309, 1968.

7. NORRIS, L.C. & RINGROSE, A.T. The occurrence of a pellagrous-like syndrome in chicks. *Science* 71: 643, 1930.
8. REIS, J. & NÓBREGA, P. *Tratado de doenças das aves*. 2.^a ed., São Paulo, Edições Melhoramentos, 1956. V. 4. 428 p.
9. ELVEHJEM, C.A., MADDEN, R.J., STRONG, F.M. & WOOLLEY, D.W. The isolation and identification of the anti-black tongue factor. *J. Biol. Chem.* 123: 137-149, 1938.
10. ALLEN, N.K., BAKER, D.H. & GRABER, G. Interrelationships among leucine, tryptophan and niacin in the chick. *Poultry Sci.* 50: 1544-1545, 1971.
11. NESHEIM, M.C. Some aspects of amino acid interrelationship in growing chickens. In: Proceedings 1974 Maryland Nutrition Conference Feed Manufacturers, p. 34-40.
12. McLEOD, M.N. Plant tannins - their role in forage quality. *Nutr. Abstr. Rev.* 44: 803-815, 1974.
13. REIS, N.V.B. & DUQUE, F.F. Possibilidades ecológicas para a cultura do sorgo na região de Brasília. In: Anais do 1.^o Simpósio Interamericano de Sorgo, Brasília, 1972 . p. 33.49.
14. ROSTAGNO, H.S. Comentários sobre o uso do sorgo na ração para aves. *Rev. Soc. Bras. Zootec.* 5: 119-140, 1976.
15. SYKES, A.H. Sorgo de grão na nutrição de aves. In: Informações técnicas Roche-Sorgo na alimentação animal, p. 36-51.

16. GOPALAN, C. Possible role for dietary leucine in the pathogenesis of pellagra. *Lancet* 2: 197-199, 1969.
17. BELAVADY, B. & GOPALAN, C. Availability of nicotinic acid in jowar (*Sorghum vulgare*). *Ind. J. Biochem.* 3: 44-47, 1966.
18. KRISHNASWAMY, K. & GOPALAN, C. Effect of isoleucine on skin and electroencephalogram in pellagra. *Lancet* 2: 1167-1169, 1971.
19. BELAVADY, B., MADHAVAN, T.V. & GOPALAN, C. Production of nicotinic acid deficiency (black-tongue) in pups fed diets supplemented with leucine. *Gastroenterology* 53: 749-753, 1967.
20. WHITE, A., HANDLER, P. & SMITH, E.L. *Principles of Biochemistry*, 5.^a ed. Tokio, McGraw-Hill Kogakusha, 1973. 1296 p.
21. GOLDBERGER, J. & WHEELER, G.A. Experimental black-tongue of dogs and its relation to pellagra. *Publ. Health Rep.* 43: 172-217, 1928.
22. WARBURG, O. & CHRISTIAN, W. Co-Fermentproblem. *Biochem. Z.* 275: 464, 1935.
23. EULER, H. von, ALBERS, H. & SCHLENK, F. Co-zymase. *Biochem. Z.* 286: 140-141, 1936.

24. DIETRICH, L.S., MUNIZ, O. & POWANDA, M. NAD synthesis in animal tissues. *J. Vitaminol.* 14: 123-129, 1968.
25. KREHL, W.A., TEPLY, L.J., SARMA, P.S. & ELVEHJEM, C.A. Growth-retarding effect of corn in nicotinic acid-low rations and its counteraction by tryptophan. *Science* 101: 489-490, 1945.
26. DIETRICH, L.S., MARTINEZ, L. & FRANKLIN, L. Role of the liver in systemic pyridine nucleotide metabolism. *Naturwissenschaften* 55: 231-232, 1968.
27. DIETRICH, L.S., MARTINEZ, L., MUNIZ, O. & FARINAS, B. Effect of hypophysectomy and adrenalectomy on enzymes concerned with nicotinamide adenine dinucleotide synthesis. *Endocrinology* 81: 779-782, 1967.
28. DIETRICH, L.S. & MUNIZ, O. Aberrant form of NMN pyrophosphorylase in human tissues. *Federation Proc.* 29: 344, 1970.
29. GHOLSON, R.K., UEDA, I., OGASAWARA, N. & HENDERSON, L.M. The enzymatic conversion of quinolinate to nicotinic acid mononucleotide in mamalian liver. *J. Biol. Chem.* 239: 1208-1214, 1964.
30. HANDLER, P. & FEATHERSTON, W.P. The biochemical defect in nicotinic acid deficiency. II. On the nature of the anemia. *J. Biol. Chem.* 151: 395-404, 1943.

31. IJICHI, H., ICHIYAMA, A. & HAYAISHI, O. Studies on the biosynthesis of nicotinamide adenine dinucleotide. III. Comparative *in vivo* studies on nicotinic acid, nicotinamide, and quinolinic acid as precursors of nicotinamide adenine dinucleotide. *J. Biol. Chem.* 241: 3701-3707, 1966.
32. KAPLAN, N.O., GOLDIN, A., HUMPHREYS, S.R., CIOTTI, M.M. , STOLZENBACH, F.E. Pyridine nucleotide synthesis in the mouse. *J. Biol. Chem.* 219: 287-298, 1956.
33. KAPLAN, N.O., GOLDIN, A., HUMPHREYS, S.R. & STOLZENBACH, F.E. Pyridine precursors of mouse liver diphosphopyridine nucleotide. *J. Biol. Chem.* 226: 365-371, 1957.
34. NISHIZUKA, Y. & HAYAISHI, O. Studies on the biosynthesis of nicotinamide adenine dinucleotide. I. Enzymic synthesis of niacin ribonucleotides from 3-hydroxyanthranilic acid in mamalian tissues. *J. Biol. Chem.* 238: 3369-3377, 1963.
35. PETRACK, B., GREENGARD, P., CRASTON, A. & SHEPPY, F. Nicotinamide deamidase from mamalian liver. *J. Biol. Chem.* 240: 1725-1730. 1965.
36. PREISS, J. & HANDLER, P. Biosynthesis of diphosphopyridine nucleotide. I. Identification of intermediates. *J. Biol. Chem.* 233: 488-492, 1958.
37. PREISS, J. & HANDLER, P. Biosynthesis of diphosphopyridine nucleotide. II. Enzymatic aspects. *J. Biol. Chem.* 233: 493-500, 1958.

38. RICCI, C. & PALLINI, V. Occurrence of free nicotinic acid in the liver of nicotinamide-injected rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 17: 34-38, 1964.
39. CHAYKIN, S. & KIRCHNER, J. Rabbit liver nicotinamide deamidase. *Federation Proc.* 24: 480, 1965.
40. IKEDA, M., TSUJI, H., NAKAMURA, S., ICHIYAMA, A., NISHIZUKA, Y. & HAYAISHI, O. Studies on the biosynthesis of nicotinamide adenine dinucleotide. II. A role of picolinic carboxylase in the biosynthesis of nicotinamide adenine dinucleotide from tryptophan in mammals. *J. Biol. Chem.* 240: 1395-1401, 1965.
41. WILSON, R.G., WORTHAM, J.S., BENTON, D.A. & HENDERSON, L. M. Effect of threonine-induced amino acid imbalance on the distribution of isotope from DL-tryptophan-5-C¹⁴. *J. Nutr.* 77: 142-148, 1962.
42. HARPER, A.E., BENTON, D.A. & ELVEHJEM, G.A. L-leucine, an isoleucine antagonist in the rat. *Arch. Biochem. Biophys.* 57: 1-12, 1955.
43. BENTON, D.A., HARPER, A.E., SPIVEY, H.E. & ELVEHJEM, C.A. Leucine, isoleucine and valine relationships in the rat. *Arch. Biochem. Biophys.* 60: 147-155, 1956.
44. BRICKSON, W.L., HENDERSON, L.M., SOLHJELL, I. & ELVEHJEM, C.A. Antagonism of amino acids in the growth of lactic acid bacteria. *J. Biol. Chem.* 176: 517-528, 1948.

45. DIEN, L.T.H., RAVEL, J.M. & SHIVE, W. Some inhibitory interrelationships among leucine, isoleucine and valine. *Arch. Biochem. Biophys.* 49: 283-292, 1954.
46. GLADSTONE, G.P. Interrelationships between amino acids in the nutrition of *B. anthracis*. *Brit. J. Exp. Path.* 20: 189-200, 1939.
47. SPOLTER, P.D. & HARPER, A.E. Leucine-isoleucine antagonism in the rat. *Am. J. Physiol.* 200: 513-518, 1961.
48. MELLINKOFF, S. Digestive system. *Ann. Rev. Physiol.* 19: 175-204, 1957.
49. D'MELLO, J.P.F. & LEWIS, D. Amino acid interactions in chick nutrition. 3. Interdependence in amino acid requirements. *Brit. Poultry Sci.* 11: 367-385, 1970.
50. HILL, D.C.; McINDOO, E.M. & OLSEN, E.M. Influence of dietary zein on the concentration of amino acids in the plasma of chicks. *J. Nutr.* 74: 16-22, 1961.
51. CHARKEY, L.W., MANNING, W.K., KANO, A.K., GASSNER, F.X., HOPWOOD, M.L. & MADSEN, I.L. A further study of vitamin B₁₂ in relation to amino acid metabolism in the chick. *Poultry Sci.* 32: 630-642, 1953.
52. CHARKEY, L.W., KANO, A.K. & ANDERSON, J.A. Effects of fasting on free amino acid levels in chick blood as modified by vitamin B₁₂. *J. Biol. Chem.* 210: 627-632, 1954.

53. KODICEK, E., BRAUDE, R., KON, S.K. & MITCHELL, K.G. The availability to pigs of nicotinic acid in "tortilla" baked from maize treated with lime-water. *Brit. J. Nutr.* 13: 363-384, 1959.
54. GOLDSMITH, G.A., GIBBENS, J., UNGLAUB, W.G. & MILLER, O.N. Studies of niacin requirement in man. III. Comparative effects of diets containing lime-treated and untreated corn in the production of experimental pellagra. *Am. J. Clin. Nutr.* 4: 151-160, 1956.
55. AXTELL, J.D., PICKETT, R.C., OSWALT, D.L., JAMBUNATHAN, R. & SRINIVASAN, G. Components of nutritional quality in grain sorghum. In: AXTELL, J.D. & OSWALT, D. L., ed. Research progress report on inheritance and improvement of protein quality and content in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. Washington, D.C., Agency for International Development, 1972. p. 1-20 (Report, 9)
56. SCHAFFERT, R.E., OSWALT, D.L. & LECHTENBERG, V.L. Influence of supplemental nitrogen on the relationship between tannin content and *in vitro* dry matter and nitrogen disappearance in *Sorghum bicolor* (L.) Moench grain. In: AXTELL, J.D. & OSWALT, D.L., ed. Research progress report on inheritance and improvement of protein quality and content in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. Washington, D.C., Agency for International Development, 1972. p. 75-85 (Report, 9).
57. STRUMEYER, D.H. & MALIN, M.J. Condensed tannins in grain sorghum: Isolation, fractionation and characterization. *J. Agric. Food Chem.* 23: 909-914, 1975.

58. TAMIR, M. & ALUMOT, E. Inhibition of digestive enzymes by condensed tannins from green and ripe carobs. *J. Sci. Food Agric.* 20: 199-202, 1969.
59. GLICK, Z. & JOSLYN, M.A. Effect of tannic acid and related compounds on the absorption and utilization of protein in rats. *J. Nutr.* 100: 516-520, 1970.
60. GLICK, Z. & JOSLYN, M.A. Food intake depression and other metabolic effects of tannic acid in the rat. *J. Nutr.* 100: 509-515, 1970
61. CHANG, S.I. & FULLER, H.L. Effect of tannin content of grain sorghum on their feeding value for growing chicks. *Poultry Sci.* 43: 30-36, 1964.
62. VOHRA, P., KRATZER, F.H. & JOSLYN, M.A. The growth depressing and toxic effects of tannin to chicks. *Poultry Sci.* 45: 135-141, 1966
63. CONNOR, J.K., HURWOOD, I.S., BURTON, H.W. & FUELLING, D.E. Some nutritional aspects of feeding sorghum grain of high tannin content to growing chickens. *Austr. J. Exp. Agric. Anim. Husb.* 9: 497-502, 1969.
64. DAMRON, B.L., PRINE, G.M. & HARMS, R.H. Evaluation of various bird-resistant and non-resistant varieties of grain sorghum for use in broiler diets. *Poultry Sci.* 47: 1648-1650, 1968.

65. JAMBUNATHAN, R. & MERTZ, E.T. Relationship between tannin levels, rat growth, and distribution of proteins in sorghum. *J. Agric. Food Chem.* 21: 692-696, 1973.
66. SCHAFFERT, R.E., OSWALT, D.L. & AXTELL, J.D. Effect of supplemental protein on the nutritive value of high and low tannin *Sorghum bicolor* (L.) Moench grain for the growing rat. In: AXTELL, J.D. & OSWALT, D.L., ed. Research progress report on inheritance and improvement of protein quality and content in *Sorghum bicolor* (L.), Moench. Washington, D.C., Agency for International Development, 1972. p. 97-111 (Report, 9).
67. BELAVADY, B., SRIKANTIA, S.G. & GOPALAN, C. The effect of the oral administration of leucine on the metabolism of tryptophan. *Biochem. J.* 87: 652-655, 1963.
68. RAGHURAMULU, N., NARASINGA RAO, B.S. & GOPALAN, C. Amino acid imbalance and tryptophan metabolism. I. Effect of excess leucine on the urinary excretion of tryptophan-niacin metabolites in rats. *J. Nutr.* 86: 100-106, 1965.
69. NAKAGAWA, I., OHGURI, S., SASAKI, A., KAJIMOTO, M., SASAKI, M. & TAKAHASHI, T. Effects of excess intake of leucine and valine deficiency on tryptophan and niacin metabolites in humans. *J. Nutr.* 105: 1241-1252, 1975.
70. TRUSWELL, A.S., GOLDSMITH, G.A. & PEARSON, W.N. Leucine and pellagra. *Lancet* 1: 778-779, 1963.

71. BELAVADY, B. & GOPALAN, C. Production of black tongue in dogs by feeding diets containing jowar (*Sorghum vulgare*). *Lancet* 2: 1220-1221, 1965.
72. GOPALAN, C., BELAVADY, B. & KRISHNAMURTHI, D. The role of leucine in the pathogenesis of canine black-tongue and pellagra. *Lancet* 2: 956-957, 1969.
73. MANSON, J.A. & CARPENTER, K.J. Nicotinic acid deficiency in dogs with and without supplementary leucine in their diets. *Abstr. Commun.*, p. 103A-104A, 1974.
74. COCHRAN, W.G. & COX, G.M. *Experimental Designs*, 2.^a ed. New York, John Wiley & Sons, 1957. 611 p.
75. PIMENTEL GOMES, F. *Curso de Estatística Experimental*. 6.^a ed. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", s.d., 430 p.
76. A.O.A.C. (ASSOCIATION of the OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS). *Official methods of analysis*. Horwitz, W. ed., 12.^a ed. Washington, D.C., 1975. 1094 p.
77. VAN DE KAMER, J.H. & VAN GINKEL, L. Rapid determination of crude fiber in cereals. *Cereal Chem.* 29: 239-251, 1952.
78. SPACKMANN, O.H., STEIN, W.H. & MOORE, S. Automatic recording apparatus for the use in the chromatography of amino acids. *Anal. Chem.* 30: 1190-1206, 1958.

79. HIRS, C.H.W. Performic acid oxidation. *Meth. Enzymol.* 11: 197-198, 1967.
80. MILLER, E.L. Determination of the tryptophan content of feedingstuffs with particular reference to cereals. *J. Sci. Food Agric.* 18: 381-386, 1967.
81. BURNS, R.E. Method of estimation of tannin in grain sorghum. *Agron. J.* 63: 511-512, 1971
82. FRIEDEMANN, T.E. & FRAZIER, E.I. The determination of nicotinic acid. *Arch. Biochem.* 26: 361-374, 1950.
83. MITCHELL, H.H. *Comparative Nutrition of Man and Domestic Animals*. New York, Academic Press, 1964. V-2, 840 p.
84. SCOTT, M.L., NESHEIM, M.C. & YOUNG, R.J. *Nutrition of the chicken*. New York, M.L. Scotth & Associates, 1976. 555 p.
85. LIMA, A.O. & SILVA, W.D. *Imunologia, Imunopatologia, Alergia, Métodos*. Rio de Janeiro, Editora Guanabara KOOGAN, 1970. 673 p.
86. GERRITSEN, T., REHBERG, M.L. & WAISMAN, H.A. On the determination of free amino acids in serum. *Anal. Biochem.* 11: 460-466, 1965.
87. HUFF, J.W. The fluorescent condensation product of N¹-methylnicotinamide and acetone. I. Synthesis and properties. *J. Biol. Chem.* 167: 151-156, 1947.

88. HUFF, J.W. & PERLZWEIG, W.A. The fluorescent condensation product of N¹-methylnicotinamide and acetone. II. A sensitive method for the determination of N¹-methylnicotinamide in urine. *J. Biol. Chem.* 167: 157-167, 1947.
89. LEVITAS, N., ROBINSON, J., ROSEN, F., HUFF, J.W. & PERLZWEIG, W.A. The fluorescent condensation product of N¹-methylnicotinamide and acetone. III. A rapid fluorometric method for the determination of the total pyridine nucleotides in the blood cells. *J. Biol. Chem.* 167: 169-175, 1947.
90. KODICEK, E. & REDDI, K.K. Paper chromatography of nicotinic acid derivatives. *Nature* 4272: 475-477, 1951.
91. DIXON, W.J. & MASSEY Jr., F.J. *Introduction to statistical analysis*, 3.^a ed., New York, McGraw-Hill, 1969. 638 p.
92. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Committee on Animal Nutrition, Washington, D.C. *Nutrient requirement of poultry*, 6.^a ed. Washington, National Academy of Sciences, 1971. 54 p.
93. SRINIVASAN, G., AXTELL, J.D. & OSWALT, D.L. Protein and amino acid composition of world collection grain sorghums. *In*: Research project on inheritance and improvement of protein quality and content in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. Washington, D.C., United States Agency for International Development, 1972. 70 p.

94. MITCHELL, H.H. & BLOCK, R.J. Some relationships between the amino acid contents of proteins and their nutritive values for the rat. *J. Biol. Chem.* 163: 599-620, 1946.
95. OSER, B.L. ed. *Hawk's Physiological Chemistry*. 14.^a ed. New York, McGraw-Hill, 1965. 1472 p.
96. ALBUQUERQUE, R.G. Frangos de corte criados com separação de sexo. Efeitos da densidade de nutrientes, densidade de população e linhagem em bateria. Escola de Veterinária da UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil, 1977. (Tese, Mestrado).
97. BEDI, T., BOMB, B.S., BEDI, H.K. & CHAUDHARY, A.R. Serum amino acids in cases of pellagra. *J. Assoc. Physiol. Ind.* 24: 683-686, 1976.
98. ALLEN, N.K., BAKER, D.H., SCOTT, H.M. & NORTON, H.W. Quantitative effect of excess lysine on the ability of arginine to promote chick weight gain. *J. Nutr.* 102: 171-180, 1972.
99. AUSTIC, R.E. & NESHEIM, M.C. Role of kidney arginase in variations of the arginine requirement of chicks. *J. Nutr.* 100: 855-867, 1970.
100. NGO, A. & COON, C.N. The effect of feeding various levels of dietary glycine in a pre-experimental diet to one-day old chicks on their subsequent glycine plus serine requirement. *Poultry Sci.* 55: 1672-1677; 1976.
101. AXELROD, A.E., MADDEN, R.J. & ELVEHJEM, C.A. The effect of a nicotinic acid deficiency upon the coenzyme I content of animal tissues. *J. Biol. Chem.* 131: 85-93, 1939.

102. BARMAN, T. E. *Enzyme Handbook*. Berlin, Springer-Verlag, 1969. V. 1. 499 p.
103. WOOLLEY, D.W. Production of nicotinic acid deficiency with 3-acetylpyridine, the ketone analogue of nicotinic acid. *J. Biol. Chem.* 157: 455-459, 1945.
104. WOOLLEY, D.W. Reversal by tryptophan of the biological effects of 3-acetylpyridine. *J. Biol. Chem.* 162: 179-180, 1946.
105. KODICEK, E., CARPENTER, K.J. & HARRIS, L.J. "Pellagrigenic" activity of indole-3-acetic acid in the rat. *Lancet* 2: 491-492, 1946.