

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE NUTRICIONAL E
MICROBIOLÓGICA DE RAÇÃO AUTOCLAVÁVEL PARA RATOS
E CAMUNDONGOS DE BIOTÉRIO LIVRES DE PATÓGENOS
ESPECÍFICOS (SPF)

31/92

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE NUTRICIONAL E MICROBIOLÓGICA DE RAÇÃO
AUTOCLAVÁVEL PARA RATOS E CAMUNDONGOS DE BIOTÉRIO LIVRES DE
PATÓGENOS ESPECÍFICOS (SPF)

Pamer

*Este exemplar corresponde a segunda
fórmula da tese defendida por Cecília
Ribeiro Piau Vieira e aprovada pela
comissão julgadora em 23.10.92*

CECILIA RIBEIRO PIAU VIEIRA

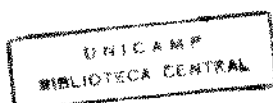
ENGENHEIRA DE ALIMENTOS

ORIENTADORA: PROFA. DRA. DÉBORA DE QUEIROZ TAVARES

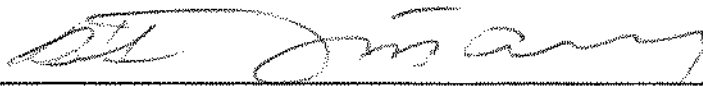
Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de
Mestre em Ciência da Nutrição

Campinas

1992



BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Débora de Queiroz Tavares
(orientadora)



Profa. Dra. Berenice Cunha Wilke
(membro)



Prof. Dr. Humberto de Araújo Rangel
(membro)



Profa. Dra. Ana Maria Aparecida Guaraldo
(membro)

Campinas, 23 de outubro de 1992.

A DEUS, pelo dom da existência, pela presença constante em minha vida, uma fonte de esperança e força...

"Os que esperam no Senhor renovarão as suas forças, subirão com asas como águias; correrão, e não se cansarão; caminharão, e não se fatigarão." (Is. 40:31)

Aos meus pais, Antonio e Zilla, pelo amor e dedicação incansáveis; ao Euclides, meu esposo, pelo incentivo, amor e compreensão em todos os momentos; aos meus irmãos, Antonio, Débora, Cláudia e Raquel, pela grande amizade.

Dedico.

À avó Augusta (*in memoriam*), com amor, minha homenagem, por tudo que representou em vida, um exemplo de luta e amor, incentivando-me sempre.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Débora de Queiroz Tavares, pela orientação competente e dedicada, pelos conhecimentos e experiências transmitidos, e ainda pelo incentivo e apoio amigo.

Ao Dr. Joseph J. Knapka, do National Institute of Health (NIH) e membro do Comitê de Nutrição do National Research Council (NRC), pelas orientações recebidas durante suas visitas ao Brasil, as quais orientaram os itens sobre dietas, e ainda pela gentileza em nos fornecer formulações ainda inéditas.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, por possibilitar o desenvolvimento deste trabalho.

À Técnica Yara Fagnani Honório, pelo apoio no trabalho de laboratório.

Às colegas Gabriela, Márcia e Priscila, pela grande colaboração na execução deste trabalho.

Ao Biotério Central da UNICAMP e à Nuvital Nutrientes Ltda., pela cessão de material para a realização deste trabalho.

À INPAL S.A. Indústrias Químicas, pela cessão dos kits de análise bacteriológica rápida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e à Universidade Estadual de Campinas, pelo apoio financeiro.

À Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação, pelo fornecimento das capas e cópias deste trabalho.

Aos professores, colegas e funcionários da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, que contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos amigos, pelos incentivos em muitos momentos.

Ao Euclides e a minha família, especialmente a minha mãe, minha profunda gratidão, por tudo.

SUMÁRIO

ÍNDICE GERAL	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABELAS	v
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xvi
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
MATERIAIS E MÉTODOS	77
RESULTADOS E DISCUSSÕES	90
CONCLUSÕES	129
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	132

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABELAS	v
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Animais de laboratório	4
2.1.1 Histórico	4
2.1.2 Situação internacional e brasileira	6
2.1.3 Qualidade dos animais de laboratório	8
2.1.4 Nutrição dos animais de laboratório	11
2.1.4.1 Componentes energéticos	13
2.1.4.2 Proteínas	19
2.1.4.3 Minerais	27
2.1.4.4 Vitaminas	36
2.2 Dietas	43
2.2.1 Tipos de dietas	44
2.2.2 Formulação e preparo de dietas	48
2.2.3 Dietas recomendadas	50
2.2.3.1 NIH-07	50

2.2.3.2	AIN-76	51
2.2.3.3	AIN-90	54
2.2.3.4	NIH-42	55
2.2.3.5	NIH-autoclavável	55
2.2.4	Qualidade nutricional	56
2.2.5	Qualidade microbiológica	65
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	77
3.1	Dietas purificadas	77
3.1.1	AIN-76	77
3.1.2	AIN-90	77
3.2	Dietas de ingredientes naturais	77
3.2.1	Ração NUVILAB CR-1 autoclavável	78
3.2.2	Rações para ensaio produzidas por Nuvital Nutrientes Ltda.	79
3.3	Determinações químicas para avaliação da qualidade protéica: nitrogênio, proteína e determinação aminoacídica	80
3.4	Avaliação biológica da qualidade nutricional das dietas	80
3.4.1	Avaliação da eficiência protéica operacional (EPop)	81
3.4.2	Balanço de nitrogênio	82
3.5	Avaliação microbiológica	83
3.5.1	Preparo das amostras	84
3.5.2	Testes microbiológicos	84
3.5.3	Análise bacteriológica rápida	86

3.5.4	Determinação de unidade e atividade de água	87
3.6	Análise estatística	87
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	90
4.1	Determinações químicas para avaliação da qualidade protéica	90
4.1.1	Proteína	90
4.1.2	Composição aminoacídica	91
4.2	Avaliação biológica da qualidade nutricional das dietas	98
4.2.1	Avaliação da eficiência protéica operacional (EPop)	98
4.2.2	Balanço de nitrogênio	105
4.3	Avaliação microbiológica	108
5.	CONCLUSÕES	129
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	132

ÍNDICE DE FIGURAS

- FIGURA 1. Regressão linear obtida para consumo alimentar acumulado (CAA) em função do tempo de experimento, para ratos Wistar machos alimentados com as dietas discriminadas nos respectivos ensaios para avaliação da EPop. 126
- FIGURA 2. Regressão linear obtida para peso corporal (PC) em função do tempo de experimento, para ratos Wistar machos alimentados com as dietas discriminadas nos respectivos ensaios para avaliação da EPop. 127
- FIGURA 3. Regressão linear obtida para peso corporal (PC) em função do consumo alimentar acumulado (CAA), para ratos Wistar machos alimentados com as dietas discriminadas nos cinco ensaios para avaliação da EPop. 128

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1.	Peso corporal médio (M) e amplitude das médias (A) para 26 linhagens de camundongo, segundo POILEY (1972) <i>apud</i> NATIONAL RESEARCH COUNCIL (1978).	69
TABELA 2.	Peso corporal médio (M) e amplitude das médias (A) de ratos Sprague-Dawley e Fischer ^a , segundo POILEY (1972) <i>apud</i> NATIONAL RESEARCH COUNCIL (1978).	69
TABELA 3.	Requerimentos nutricionais de ratos, de acordo com NATIONAL RESEARCH COUNCIL (1978).	70
TABELA 4.	Requerimentos nutricionais estimados de camundongos ^a , de acordo com NATIONAL RESEARCH COUNCIL (1978).	71
TABELA 5.	Dieta purificada AIN-76 ^a para ratos e camundongos, de acordo com AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION (1977).	72
TABELA 6.	Mistura mineral AIN-76, de acordo com AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION (1977), para ser usada a 3,5% da dieta.	72

TABELA 7.	Mistura vitamínica AIN-76, de acordo com AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION (1977), para ser usada a 1% da dieta.	72
TABELA 8.	Quantidades de minerais fornecidos pela dieta AIN-76 (AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION, 1977), comparadas aos requerimentos do NRC (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1978).	72
TABELA 9.	Quantidades de vitaminas fornecidas pela dieta AIN-76 (AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION, 1977), comparadas aos requerimentos do NRC (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1978).	73
TABELA 10.	Dietas purificadas AIN-90 ^a e AIN-76 ^b , para ratos e camundongos.	73
TABELA 11.	Misturas vitamínicas das dietas AIN-90 ^a e AIN-76 ^b	73
TABELA 12.	Mistura de elementos ultra-traços da dieta AIN-90 e quantidades de elementos fornecidos pela dieta AIN-90, de acordo com KNAPKA (1990, idem rodapé p. 54).	73
TABELA 13.	Dieta de ingredientes naturais de fórmula aberta NIH-42, para ratos e camundongos, de acordo com KNAPKA (1990, idem rodapé p. 54).	74

TABELA 14.	Mistura vitamínica da dieta NIH-42, de acordo com KNAPKA (1990, idem rodapé p. 54).	74
TABELA 15.	Mistura mineral da dieta NIH-42, de acordo com KNAPKA (1990, idem rodapé p. 54).	74
TABELA 16.	Concentrações calculadas de nutrientes da dieta NIH-42, de acordo com KNAPKA (1990, idem rodapé p. 54).	75
TABELA 17.	Dieta NIH-autoclavável de ingredientes naturais de fórmula aberta, para ratos e camundongos "germ-free", gnotobióticos e SPF, de acordo com KNAPKA (1990, idem rodapé p. 54).	75
TABELA 18.	Fortificação vitamínica da dieta NIH-autoclavável, de acordo com KNAPKA (1990, idem rodapé p. 54).	76
TABELA 19.	Fortificação mineral da dieta NIH-autoclavável, de acordo com KNAPKA (1990, idem rodapé p. 54).	76
TABELA 20.	Concentrações calculadas de nutrientes da dieta NIH-autoclavável, de acordo com KNAPKA (1990, idem rodapé p. 54).	76

TABELA 21.	Formulação da mistura mineral utilizada na dieta AIN-76, segundo AOAC (1975).	89
TABELA 22.	Formulação da mistura vitamínica utilizada na dieta AIN-76, segundo NUTRITIONAL BIOCHEMICALS CORPORATION (1977/1978).	89
TABELA 23.	Meios de cultura utilizados nas análises microbiológicas e procedências, de acordo com o "Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods" (SPECK, 1984) ^a .	89
TABELA 24.	Conteúdo protéico das dietas de ingredientes naturais.	119
TABELA 25.	Composição de aminoácidos das proteínas da dieta comercial "NUVILAB CR-1 autoclavável" e das rações para ensaio "NUVITAL 18% vegetal" e "NUVITAL 22% vegetal", em g/100 g de proteína (%P) ou em g/100 g de dieta (%D).	119
TABELA 26.	Composição de aminoácidos das proteínas da dieta comercial "NUVILAB CR-1 autoclavável (NV-CR-1)" e das rações para ensaio "NUVITAL 18% vegetal (NV-18%)" e "NUVITAL 22% vegetal (NV-22%)", comparativamente aos requerimentos para ratos e camundongos recomendados pelo NRC (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1978), expressos como porcentagem da proteína.	120

TABELA 27.	Adequação aminoacídica das rações: relação expressa em porcentagem entre o conteúdo dos aminoácidos nas proteínas das dietas experimentais e os requerimentos do NRC (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1978) para ratos (R) e camundongos (C).	120
------------	--	-----

TABELA 28.	Composição de aminoácidos das proteínas das dietas experimentais "NUVILAB CR-1 autoclavável (NV-CR-1)", "NUVITAL 18% vegetal (NV-18%)" e "NUVITAL 22% vegetal (NV-22%)", comparativamente às dietas recomendadas NIH-07, NIH-42 e NIH-autoclavável (NIH-aut), expressa como porcentagem da proteína.	121
------------	--	-----

TABELA 29.	Dietas utilizadas nos ensaios para avaliação da EPop e seus respectivos conteúdos de proteína.	121
------------	--	-----

TABELA 30.	Valores obtidos no primeiro ensaio biológico para avaliação da EPop, realizado com ratos Wistar recém-deesmamados, submetidos às dietas por um período de 28 dias: peso inicial, peso final, ganho de peso, consumo alimentar, coeficiente de eficiência alimentar (CEA), proteína ingerida e EPop.	121
------------	---	-----

TABELA 31. Valores obtidos no segundo ensaio biológico para avaliação da EPop, realizado com ratos Wistar recém-desmamados, submetidos às dietas por um período de 28 dias: peso inicial, peso final, ganho de peso, consumo alimentar, coeficiente de eficiência alimentar (CEA), proteína ingerida e EPop. 122

TABELA 32. Valores obtidos no terceiro ensaio biológico para avaliação da EPop, realizado com ratos Wistar recém-desmamados, submetidos às dietas por um período de 28 dias: peso inicial, peso final, ganho de peso, consumo alimentar, coeficiente de eficiência alimentar (CEA), proteína ingerida e EPop. 122

TABELA 33. Valores obtidos no quarto ensaio biológico para avaliação da EPop, realizado com ratos Wistar recém-desmamados, submetidos às dietas por um período de 28 dias: peso inicial (PI), peso final (PF), ganho de peso (GP), consumo alimentar (CA), coeficiente de eficiência alimentar (CEA), proteína ingerida (PRIN) e EPop. 122

TABELA 34. Valores obtidos no quinto ensaio biológico para avaliação da EPop, realizado com ratos Wistar recém-desmamados, submetidos às dietas por um período de 28 dias: peso inicial, peso final, ganho de peso, consumo alimentar, coeficiente de eficiência alimentar (CEA), proteína ingerida e EPop. 122

TABELA 35.	Crescimento e eficiência alimentar de ratos Wistar machos em ensaios para avaliação da EPop, obtidos nas três primeiras semanas dos experimentos.	123
TABELA 36.	Valores obtidos no ensaio de balanço de nitrogênio de cinco dias, após adaptação de 6 dias, com ratos Wistar recém-desmamados: peso inicial, peso final, ganho de peso, consumo alimentar e coeficiente de eficiência alimentar (CEA).	123
TABELA 37.	Valores obtidos no ensaio de balanço de nitrogênio de cinco dias, após adaptação de 6 dias, com ratos Wistar recém-desmamados: nitrogênio ingerido, nitrogênio fecal, nitrogênio urinário, balanço de nitrogênio (BN), digestibilidade aparente (DA), valor biológico aparente (VBA) e utilização líquida aparente da proteína (NPUA).	123
TABELA 38.	Umidade e atividade de água (a_w) da ração comercial NUVILAB CR-1 autoclavável.*	124
TABELA 39.	Qualificação microbiológica da ração NUVILAB CR-1 autoclavável. Primeiro e segundo ensaios.	124
TABELA 40.	Qualificação microbiológica da ração NUVILAB CR-1 autoclavável. Terceiro ensaio.	125

TABELA 41. Qualificação microbiológica da ração
NUVILAB CR-1 autoclavável com kits de análise
bacteriológica rápida. Terceiro e quarto ensaios. 125

TABELA 42. Normas microbiológicas para rações
utilizadas na Holanda (GEMAEL, 1990, comunicação
pessoal). 125

RESUMO

Os países onde a ciência de animais de laboratório está bem estabelecida administram dietas de ingredientes naturais autoclavadas para a criação e manutenção de ratos e camundongos livres de patógenos específicos (SPF).

No presente trabalho, pela primeira vez no Brasil, foi conduzido um estudo sistematizado com o objetivo de avaliar a qualidade nutricional e microbiológica de uma ração de ingredientes naturais autoclavável, a qual é administrada aos ratos e camundongos SPF do CEMIB (Centro Multi-Institucional de Bioterismo)/UNICAMP.

A qualidade nutricional da ração NUVILAB CR-1 autoclavável após autoclavagem foi avaliada em ratos através de ensaios de avaliação da Eficiência Protéica operacional (EPop) e Balanço de Nitrogênio, incluindo ainda a Determinação do Conteúdo Protéico e da Composição Aminoacídica; a adequação foi verificada pela comparação com valores obtidos para dietas de referência (AIN-76/AIN-90) e com valores recomendados de nutrientes. Foram também conduzidos testes com dietas formuladas apenas com ingredientes de origem vegetal (NUVITAL 18% vegetal e NUVITAL 22% vegetal), na tentativa de eliminar proteínas de origem animal para minimizar a contaminação microbiológica.

Microbiologicamente, a ração NUVILAB CR-1 autoclavável foi analisada nas formas não autoclavada, autoclavada e retirada dos cochos dos animais após 72 horas. Foram utilizados métodos tradicionais de análise microbiológica para os testes de contagem

padrão em placas de mesófilos aeróbios, bolores e leveduras, *Staphylococcus aureus*, coliformes totais, coliformes fecais, *Salmonella*, clostrídios sulfito-redutores e *Bacillus cereus*, e kits de análise bacteriológica rápida para os testes de contagem total, bolores e leveduras, coliformes totais e *Staphylococcus aureus*. A avaliação incluiu ainda determinações de umidade e atividade de água.

Os resultados obtidos indicaram que as dietas atendem aos requerimentos estabelecidos pelo National Research Council dos Estados Unidos para ratos e camundongos quanto ao conteúdo protéico, mas quanto à composição aminoacídica apresentam deficiências de aminoácidos sobretudo pelo déficit de metionina e cisteína.

Em todos os ensaios biológicos para avaliação da EPop, a dieta-controle apresentou os melhores valores para coeficiente de eficiência alimentar (CEA) e EPop, indicando melhor valor promotor de crescimento, com valores 1,2 a 1,5 vezes maiores e 1,3 a 1,7 vezes maiores, para CEA e EPop, respectivamente, do que os encontrados para as dietas de ingredientes naturais (NUVILAB CR-1 autoclavável e NUVITAL 22% vegetal), as quais apresentaram, entre si, valores semelhantes. Na média, as dietas proporcionaram aos animais ganho de peso dentro das taxas esperadas. Estabeleceu-se que o consumo alimentar acumulado e o peso dos animais são funções lineares do tempo, e que o peso dos animais é função linear do consumo alimentar acumulado, existindo entre estas variáveis fortes correlações lineares positivas significantes, com coeficientes de correlação superiores a 0,9899 ($p < 0,01$), 0,9885 ($p < 0,01$) e 0,9896 ($p < 0,01$), respectivamente.

A dieta AIN-76 apresentou 96,35% de Digestibilidade Aparente e 70,06% de Valor Bioló^gico Aparente, enquanto que a dieta NUVILAB CR-1 autoclavável apresentou 76,47% e 78,76%, respectivamente. Quanto ao NPU Aparente, o mesmo foi 67,51% para a dieta AIN-76, e 60,28% para a dieta NUVILAB CR-1 autoclavável.

A determinação da umidade da ração indicou níveis dentro dos limites especificados pelo fabricante (12,5%, máximo); a atividade de água da ração no intervalo de 0,590 a 0,752 indicou possibilidade de proliferação microbiana limitada, restrita a bolores xerófilos.

Os resultados dos ensaios microbiológicos efetuados no intervalo de 13 meses demonstraram qualidade microbiológica estável para a ração não autoclavada, aceitável pelo padrão utilizado pela firma produtora. As análises indicaram ausência de *Salmonella* e não detecção de *Staphylococcus aureus* e coliformes para todas as formas de ração. Para as amostras de ração autoclavada e retirada dos cochos dos animais o crescimento de clostrídios sulfito-redutores e *Bacillus cereus* também não foi evidenciado. Os resultados obtidos com os kits de análise bacteriológica rápida indicaram valores mais elevados, quando comparados aos da metodologia convencional. A esterilidade da ração não foi alcançada, o que sugere a existência de falhas nos processos de autoclavagem e/ou na amostragem da ração.

ABSTRACT

The present work was undertaken aiming to evaluate the nutritional and microbiological quality of the autoclavable diet of natural ingredients which has been offered ordinarily to rats and mice Specific Pathogen Free (SPF) of the CEMIB (Centro Multi-Institucional de Bioterismo - Multi-Institutional Center for Laboratory Animal Science)/UNICAMP.

The nutritional quality of the autoclaved autoclavable diet NUVILAB CR-1 was evaluated through operative Protein Efficiency (EPop) evaluation and Nitrogen Balance assays, with rats, as well as by Crude Protein Content and Amino Acids Composition Determinations; the adequacy was determined by comparison with values obtained from reference diets (AIN-76/AIN-90) as well as from nutrients recommendations. Assays were also performed with diets formulated only with vegetable source ingredients (vegetal NUVITAL 18% and vegetal NUVITAL 22%), in order to eliminate the animal proteins therefore minimizing the microbiological contamination.

Microbiological examination consisted of analysis of not autoclaved, autoclaved and leftover animal cages feed samples. Feed was analysed for mesophilic aerobic standard plate count, molds and yeasts, *Staphylococcus aureus*, coliforms, fecal coliforms, *Salmonella*, sulfite-reducing clostridia and *Bacillus cereus* by traditional microbiological methods and for bacterial total count, molds and yeasts, coliforms and *Staphylococcus aureus* by rapid bacteriological analysis kits. Moisture and water

activity determinations were also performed.

The results showed that the diets are in accordance with the United States National Research Council Requirements with regard to crude protein content, but in relation to amino acids composition they are deficient mainly by methionine and cysteine deficit.

At all EPop evaluation biological assays the control-diet showed the best food efficiency ratio (CEA) and EPop values, indicating the best growth promoting value, with 1,2 to 1,5 and 1,3 to 1,7 times greater values, to CEA and Epop, respectively, than those for natural ingredients diets (autoclavable NUVILAB CR-1 and vegetal NUVITAL 22%), which were analogous among themselves. On the average, the diets provided animal gain weight within the expected rates. It was settled that the cumulative food consumption and the body weight are time linear functions, and the body weight is a cumulative food consumption linear function, showing strong positive significant linear correlations, with correlation coefficients greater than 0,9899 ($p < 0,01$), 0,9885 ($p < 0,01$) and 0,9896 ($p < 0,01$), respectively.

The AIN-76 diet showed 96,35% of Apparent Digestibility and 70,06% of Apparent Biological Value whereas the autoclavable diet NUVILAB CR-1, 76,47% and 78,76%, respectively. With regard to Apparent NPU, it was 67,51% for AIN-76 and 60,28% for autoclavable NUVILAB CR-1.

The moisture determination showed levels within manufacturer specifications (12,5%, maximum); the water activity within the 0,590 to 0,752 interval indicated limited microbial proliferation chance, limited to xerophilic molds.

The microbial assays results performed within a 13 months interval showed stable microbiological quality for not autoclaved ration, meeting manufacturer standard, and indicated *Salmonella* absence and no *Staphylococcus aureus* and coliforms detection. The not autoclaved and left over animal cages feed samples did not show sulfite-reducing clostridia and *Bacillus cereus* growth. The rapid bacteriological analysis kits results indicated greater values than those with traditional methods. The ration sterility was not reached, suggesting autoclaving and/or feed sampling failures.

1. INTRODUÇÃO

Os animais de laboratório têm sido usados em pesquisas biomédicas, em desenvolvimento e controle farmacológico, em estudos de alimentos, em análises de contaminantes ambientais e de produtos químicos, contribuindo grandemente para o desenvolvimento científico (ROSENKRANZ & JURKIEWICZ, 1987*).

A importância da utilização de animais padronizados e de qualidade adequada foi reconhecida há várias décadas nos países desenvolvidos, proporcionando o crescimento da Ciência do Animal de Laboratório, a qual envolve o uso de animais definidos genética, microbiológica, parasito, nutricional e ambientalmente, exigindo a presença de pessoal técnico, construções, materiais e técnicas adequados. Nos últimos 30 anos, estes aspectos proporcionaram a mudança de todo o sistema de produção e cuidado dos animais de laboratório (MENENDEZ, 1985).

Nos países em desenvolvimento, verifica-se um atraso de décadas no desenvolvimento da Ciência do Animal de Laboratório, fato refletido na falta de laboratórios de suporte e referência. O Brasil reconheceu a deficiência e esforços têm sido despendidos para o avanço desta área (ROSENKRANZ, JURKIEWICZ & CORRADO, 1980; ROSENKRANZ & JURKIEWICZ, 1987*).

*ROSENKRANZ & JURKIEWICZ, 1987. Comunicação verbal. "Qualidade de animais de laboratório: situação internacional e brasileira". Palestra apresentada no debate "Estratégia Política para o Desenvolvimento de Ciência e Tecnologia em Relação à Qualidade de Animais de Laboratório". CPCT/CNPq. Brasília, 1987.

Fatores genéticos, sanitários, ambientais, nutricionais podem afetar a qualidade do animal influenciando os resultados experimentais. A fim de obter resultados válidos é necessário monitorar adequadamente estas variáveis.

Neste estudo a atenção será concentrada sobre uma variável: a dieta. Qualquer dieta utilizada interferirá nos dados obtidos pois os constituintes dietários influenciam numerosos processos bioquímicos e fisiológicos (KNAPKA, 1987; RAO, 1987). A dieta deve fornecer todos os nutrientes essenciais nas proporções corretas e os contaminantes devem ser levados a um mínimo para que sejam assegurados resultados fidedignos. O controle de qualidade sobre a dieta é de primordial importância considerando-se o ponto de vista nutricional e também o higiênico-sanitário (COATES, 1987).

Muitos dos produtos empregados na composição da ração são bons substratos para o crescimento microbiológico. É evidente que animais experimentais não podem ser afetados por alimentação contaminada por microorganismos patogênicos ou suas toxinas; a contaminação de dietas poderia causar doenças que invalidariam os resultados experimentais (NEWBERNE & FOX, 1980).

A qualidade das dietas oferecidas aos roedores está relacionada com as condições de manipulação a que são submetidas e com os tipos de microorganismos presentes. Não há método prescrito para assegurar a esterilidade de ingredientes e dietas ou excluir a possibilidade de contaminação durante a manufatura, sendo necessário o controle microbiológico da ração, acentuando-se sua importância no caso de animais criados em condições assépticas, ou seja, "Specific Pathogen Free" (SPF) (KNAPKA,

SMITH & JUDGE, 1974; NEWBERNE & FOX, 1980).

Portanto, pesquisas que visam garantir a qualidade nutricional e microbiológica das dietas dos animais de laboratório têm relevância porque objetivam a criação de animais segundo normas internacionais, para as mais diversas linhas de pesquisa.

O presente trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar a qualidade nutricional e microbiológica de ração de ingredientes naturais autoclavável oferecida aos ratos e camundongos do CEMIB (Centro Multi-Institucional de Bioterismo) da UNICAMP, comparando-a com o desempenho nutricional obtido por dieta semi-purificada. Como decorrência do estudo se contribue com resultados experimentais e com sugestões para sistematizar a avaliação nutricional dos roedores dos centros de bioterismo brasileiros.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Animais de laboratório

2.1.1 Histórico

Através da história, os animais têm contribuído com a evolução das ciências biológicas (BLEBY, 1987; HELD, 1987; ROTHSCILD, 1990).

Gradualmente se estabeleceram cinco espécies convencionais de laboratório: camundongo, hamster, rato, cobaia e coelho (ROTHSCILD, 1990). O rato ocupa posição dominante, resultante de grandes vantagens na sua utilização relacionadas à sua fecundidade, ao seu tamanho, à sua resistência e ao seu custo, compensando possíveis desvantagens e garantindo o seu contínuo uso na pesquisa de nutrição (WADDELL & DESAI, 1981).

O Instituto Wistar da Filadélfia, formalmente aberto em 1894, é o mais antigo instituto de pesquisa independente dos Estados Unidos e forneceu os fundamentos para o estabelecimento do rato como animal de laboratório (LINDSEY, 1979). A colônia de ratos Wistar serviu como teste inicial para desenvolvimento de gaiolas e equipamentos adicionais, dietas, práticas de criação e instalações para ratos. O instituto se responsabilizou pelo fornecimento a outros laboratórios até 1960, quando todos os estoques de criação e direitos para perpetuação foram vendidos para uma firma comercial.

A linhagem Wistar foi disseminada por todo o mundo,

contribuindo geneticamente para uma grande proporção das linhagens estabelecidas de ratos. Outra linhagem, a Sprague-Dawley, também muito disseminada, foi estabelecida por R. W. Dawley, ao redor de 1925, em Wisconsin, utilizando fêmeas de provável descendência Wistar e um macho híbrido de origem desconhecida. Dawley estabeleceu uma firma comercial conhecida como "Sprague-Dawley Inc.", dedicada exclusivamente ao aperfeiçoamento e venda desses ratos, a qual continua atualmente sob o nome de ARS/Sprague-Dawley.

O desenvolvimento da "Ciência do Animal de Laboratório" deu-se após a Segunda Guerra Mundial, quando foi reconhecida a necessidade de animais geneticamente definidos e livres de doenças (BLEBY, 1987), sendo fruto do trabalho de diversas organizações, das quais permanecem relevantes (LINDSEY, 1979):

- ILAR (Institute of Laboratory Animal Resources), estabelecido em 1952, nos Estados Unidos, pela Divisão de Biologia e Agricultura do NRC-NAS (National Research Council-National Academy of Sciences).

- Repositório de Roedores do NIH (National Institute of Health), criado na década de 40, em Bethesda, representando uma coleção de linhagens e estoques de roedores e lagomorfos com características genéticas conhecidas. Foi designado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como Centro de Colaboração para Animais Seleccionados de Laboratório.

A produção de animais para fins experimentais é uma parte dispendiosa das pesquisas biológicas, havendo uma tendência

crescente para o uso de animais definidos genética, microbiológica, parasito, nutricional e ambientalmente, o que exige a presença de pessoal técnico, construções, materiais e técnicas adequados (CLOUGH & GAMBLE, 1976; COHEN & RINGLER, 1987). Nos últimos 30 anos, estes aspectos têm proporcionado a mudança de todo o sistema de produção e cuidado dos animais de laboratório (BEALL, TORNING & RUNKLE, 1971; MENENDEZ, 1985; DILLEHAY, LEHNER & HUERKAMP, 1990).

2.1.2 Situação internacional e brasileira

O desenvolvimento da "Ciência do Animal de Laboratório" é refletido pela existência internacional de laboratórios adequados de monitoração genética, microbiológica e nutricional, bancos de embriões que permitem disponibilidade de modelos com características genéticas e sanitárias bem definidas e utilização de tecnologias adequadas associadas aos animais de laboratório, envolvendo o treinamento especializado de profissionais nos mais diversos níveis (BLEBY, 1987; COHEN & RINGLER, 1987). As normas éticas têm merecido destaque nas comunidades científicas que têm se preocupado em fornecer aos animais experimentais a garantia de bem-estar, bem como a defesa contra crueldades desnecessárias (FLOWERS, 1987; RIDDELL & BALLS, 1987; ROWSELL, 1987).

Nos países em desenvolvimento, verifica-se um atraso de décadas no desenvolvimento da ciência de animais de laboratório, fato refletido, principalmente, na falta de laboratórios de suporte e referência (GAMERMAN *et alii*, 1985; ROSENKRANZ & JURKIEWICZ, 1987, *idem* rodapé p. 1). O Brasil recentemente tem

reconhecido esta deficiência e esforços têm sido gastos no sentido de um avanço nesta área.

Em 1977, com financiamento do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), iniciou-se um trabalho pioneiro de conhecimento dos biotérios brasileiros, com a finalidade de avaliar a qualidade e quantidade de animais disponíveis para o projeto integrado de farmacologia e química de produtos naturais, bem como para verificar a situação dos animais experimentais brasileiros em relação aos padrões internacionais (ROSENKRANZ *et alii*, 1980). Concluiu-se que os animais existentes no Brasil eram, praticamente em sua totalidade, criados em ambientes inadequados, geneticamente indefinidos e viviam em condições que favoreciam o desenvolvimento de doenças crônicas e agudas, tanto bacterianas como viróticas, bem como moléstias causadas por parasitas internos e externos.

Em 1981, a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e a Secretaria da Ciência e Tecnologia do Estado de São Paulo nomearam um comitê para investigar os biotérios do estado. Apontadas as deficiências, foram estabelecidos alvos. Em 1984, a fim de atingir estes alvos, foi implantado o projeto CEMIB (Centro Multi-Institucional de Bioterismo), tomando parte do projeto o Biotério Central da Escola Paulista de Medicina (São Paulo), Biotério para Camundongos Isogênicos do Departamento de Imunologia da Universidade de São Paulo, USP (São Paulo) e o Biotério Central da Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP (Campinas). O projeto visa colocar à disponibilidade da comunidade científica

diversas linhagens de ratos e camundongos, criados atrás de barreiras e definidos genética e sanitariamente, além do desenvolvimento de laboratórios de controle sanitário e genético, bancos de embriões, criação de animais gnotobióticos em isoladores e treinamento de pessoal para o desenvolvimento das atividades.

Em 1986, o CEMIB, apoiado pela FESBE (Federação das Sociedades de Biologia Experimental) e pelo ICLAS (International Council for Laboratory Animal Science), realizou um Encontro Científico em Águas de Lindóia (SP), com participação de representantes de diversos países, visando o estudo de questões importantes na ciência do animal de laboratório (ROTHSCHILD, ROSENKRANZ & MOURA DUARTE, 1987).

Em 1990, com o apoio de diversas instituições, foi realizado em Caxambu (MG) o Primeiro Congresso Mundial na Ciência do Animal de Laboratório (First World Congress on Laboratory Animal Science), juntamente com o Segundo Congresso Brasileiro de Animais de Laboratório.

2.1.3 Qualidade dos animais de laboratório

Os animais de laboratório podem ser classificados de acordo seu nível de definição genética em (FESTING, 1987):

a) Animais isogênicos (inbred):- são aqueles que apresentam alto coeficiente de consangüinidade, exibindo variação genética mínima resultante de cruzamentos entre irmãos por pelo menos vinte gerações consecutivas.

Estes animais fornecem resultados que apresentam pouca variabilidade e alta reprodutibilidade, reduzindo sobremaneira o consumo de animais na obtenção de resultados confiáveis.

Têm sido extensivamente usados em oncologia, toxicologia, quimioterapia, no estudo das influências alimentares, ação cancerígena, em farmacologia e no estudo de algumas doenças hereditárias do homem.

b) Animais heterogenéticos (outbred):- são aqueles obtidos por um sistema de acasalamentos programados de tal maneira que os cruzamentos consanguíneos são evitados, a fim de garantir o polimorfismo genético na população.

Estes animais são úteis em experimentos relacionados a radiações, indução química, mutagênese e estudo teratogênicos, pois apresentam mortalidade embrionária muito baixa.

c) Animais com mutações hereditárias:- são animais que apresentam mutações espontâneas, as quais, em certas ocasiões, podem manifestar certas anomalias, sendo utilizados como modelos experimentais adequados no estudo de certas enfermidades.

Existem certas categorias genéticas de sub-linhagens, tais como coisogênicas, congênicas e recombinantes, com interesses específicos na manipulação genética.

Dentro do desenvolvimento de técnicas para melhoramento da qualidade genética destaca-se o congelamento de embriões, o qual permite o armazenamento de embriões de mamíferos, por tempos prolongados, a baixas temperaturas (-196°C). Desde o final da década passada, vários laboratórios do mundo têm congelado

embriões de ratos, coelhos, carneiros, cabras, com sucesso (WHITTINGHAN, 1974), provendo proteção contra possíveis perdas de linhagens de animais.

O uso crescente de animais sanitariamente definidos tem desenvolvido o conceito de "barreira", que indica qualquer grupo de arranjo físico, procedimentos e rotinas estabelecidos em relação à uma instalação animal com o objetivo de minimizar a probabilidade de contaminação dos animais com organismos indesejáveis. O termo pode também ser usado para os sistemas desenvolvidos com o propósito de evitar a saída de organismos de áreas ou animais infectados.

A sofisticação e tipo de barreira a ser usada dependerão do nível sanitário que se deseja dar ao animal e por quanto tempo é necessário mantê-lo neste nível.

Certos termos técnicos têm sido usados para a classificação dos animais de laboratório de acordo com seu nível higiênico-sanitário, isto é, na dependência do conhecimento das formas de vida a eles associadas (FOSTER, 1980; MENENDEZ, 1985; ROTHSCHILD, 1990):

a) Convencionais:- são animais mantidos em condições ambientais normais, não protegidos por barreira sanitária, possuindo flora indefinida.

b) Germ-free (Axênicos):- são animais livres de todas as formas associadas de vida, incluindo bactérias, vírus, fungos, protozoários e outros saprófitas ou formas parasitárias. São obtidos a partir de animais convencionais, através de cirurgias cesarianas em condições estéreis.

c) Gnotobióticos:- são animais que abrigam uma ou mais espécies associadas conhecidas de vida, sendo protegidos por barreiras sanitárias de extrema eficiência. São obtidos a partir de animais axênicos.

d) SPF (Specific Pathogen Free):- são animais que adquirem vida associada sempre controlada, protegidos por barreiras sanitárias, sem abrigar microorganismos capazes de lhes induzir doenças. São obtidos por cirurgia cesariana em ambiente axênico e posteriormente associados com uma flora microbiana definida.

2.1.4 Nutrição dos animais de laboratório

Nutrição adequada envolve a formulação de dietas que contenham aproximadamente 50 nutrientes essenciais nas proporções corretas, contendo proteína, carboidratos, vitaminas, minerais, água, e manuseio adequado de fatores relacionados com a ingesta e qualidade da dieta: palatabilidade, natureza física, procedimentos de preparo e estocagem, qualidade microbiológica, tipo de dieta, biodisponibilidade dos nutrientes e presença de contaminantes (COATES, 1976; GHIRINGHELLI & LÓPEZ, 1987; KNAPKA, 1987). Assim, o termo "adequação nutricional" deve indicar uma faixa de ingesta de nutrientes entre o mínimo e o excessivo, com a observação de que dietas para animais de laboratório devem conter nutrientes em quantidades próximas às requeridas, pois os mesmos não têm a opção de consumir alimentos suplementares, quando alimentados com dietas deficientes, ou de se exercitarem nos ambientes restritos em que são mantidos, quando em presença

de excessos de nutrientes, resultando em obesidade (KNAPKA, 1987).

Vários critérios podem ser usados na verificação e determinação da adequação dietária dos vários nutrientes e o requerimento para um dado nutriente pode variar com o critério utilizado. São muito utilizados os critérios de crescimento e desempenho reprodutivo. Outros critérios têm sido desenvolvidos incluindo: conteúdo do nutriente nos tecidos, conteúdo do nutriente no sangue e na urina, atividade de enzimas relacionadas ao nutriente, balanço do nutriente, alterações bioquímicas específicas para o nutriente, conteúdo de proteína e ácido nucléico dos tecidos e padrões de comportamento (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1978).

Cite-se também que modelos matemáticos têm sido desenvolvidos para determinação dos requerimentos nutricionais, nos quais as respostas fisiológicas de organismos vivos são descritas graficamente como uma função de um dado nutriente em uma concentração dietária específica (MERCER *et alii*, 1984; MERCER, MAY & DODDS, 1989).

Os procedimentos experimentais e as condições ambientais podem alterar os requerimentos para um ou mais nutrientes. O impedimento da coprofagia e/ou a manutenção dos animais em ambientes "germ-free", gnotobiótico ou SPF, onde os tipos e números de microorganismos intestinais são mínimos, podem ter profundo efeito na concentração dietária requerida de vários nutrientes. Além disso, o crescente uso de animais SPF, gnotobióticos e "germ-free" requer que níveis maiores de nutrientes sejam necessários nas dietas, a fim de compensar a

perda dos mesmos durante o tratamento das dietas, isto é, durante estocagem, pasteurização, esterilização, peletização e outros processamentos. Outro fator que dificulta o estabelecimento dos requerimentos nutricionais é o grande número de linhagens disponíveis, as quais diferem nas taxas de crescimento, nos requerimentos para crescimento, reprodução e manutenção e nas respostas a deficiências nutricionais. As tabelas 1 e 2 (p. 69) apresentam os resumos das amplitudes dos pesos médios de linhagens de camundongos e ratos, respectivamente, demonstrando a variabilidade existente entre as diferentes linhagens.

Os requerimentos para ratos e camundongos segundo o NRC (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1978) se encontram sumarizados nas tabelas 3 e 4 (p. 70 e 71). Na maioria dos casos, um único requerimento para cada nutriente foi estabelecido, considerado adequado para todos os estágios do ciclo da vida. O NRC já designou o comitê que atualizará os requerimentos. A revisão dos manuscritos e a publicação estão previstas para 1993*.

2.1.4.1 Componentes energéticos

A energia dietária é suprida principalmente por carboidratos e gorduras e secundariamente pelas porções não nitrogenadas dos aminoácidos não utilizadas para síntese protéica.

*Comunicação transmitida a partir do NIH (National Institute of Health) através de J.J. Knapka, membro do Comitê de Nutrição Animal do NRC (National Research Council), em 02/09/1992.

O requerimento diário de energia para manutenção de ratos adultos é de aproximadamente 110 kcal de energia digerível por $\text{kg}^{0.75}$, cerca de 50% superior à taxa metabólica basal, representando a soma de necessidades para a produção de calor basal, atividades físicas, alterações na temperatura ambiente e para as necessidades associadas com o consumo e utilização da energia alimentar.

Grandes quantidades de energia são necessárias durante a síntese de novos tecidos. Animais em crescimento devem consumir alimento suficiente para fornecer cerca de quatro vezes a energia de seu metabolismo basal, cerca de 280 kcal/ $\text{W}_{\text{kg}}^{0.75}$. O requerimento durante a gestação pode ser de 10-30% maior do que em ratas fêmeas adultas em estado de não gestação (121 a 143 kcal/ $\text{W}_{\text{kg}}^{0.75}$), e a restrição calórica durante este período decresce o tamanho e a viabilidade dos recém-nascidos e pode induzir a reabsorção intrauterina do feto. Ratas em lactação consomem duas a quatro vezes a energia que consumiriam quando não lactantes (220 a 440 kcal/ $\text{W}_{\text{kg}}^{0.75}$) requerendo uma dieta de alta qualidade em quantidades irrestritas (CLARKE *et alii*, 1977; NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1978; ROGERS, 1979).

Estudos têm demonstrado que camundongos consomem a média de 3,5 g de dieta por dia durante 14 dias pós-desmame. A ingesta de energia expressa como quilocaloria baseada nos valores de energia metabolizável de uma variedade de dietas que produziram taxas de crescimento adequadas foi de cerca de 14,5 kcal por dia (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1978).

Em relação ao requerimento dietário de energia, o NRC recomenda a concentração de 3.800 quilocalorias de energia

digerível por quilograma de dieta (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1978).

Em geral, os animais com livre acesso ao alimento ingerem suas dietas em quantidades que satisfaçam seus requerimentos energéticos. Assim, a ingesta quantitativa de uma dieta altamente energética será provavelmente menor do que aquela de uma dieta com baixo conteúdo de energia (CLARKE *et alii*, 1977; NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1979; COATES, 1987).

- Carboidratos

Nas dietas de ingredientes naturais, os carboidratos estão presentes quase exclusivamente na forma de carboidratos complexos; nas dietas purificadas pode ocorrer uma combinação de amidos (carboidratos complexos) e carboidratos simples (sacarose e glucose) (RAO, 1987).

Embora não existam requerimentos quantitativos estabelecidos para os carboidratos, a glucose ou seus precursores devem ser incluídos nas dietas dos animais de laboratório. Vários estudos têm demonstrado que dietas livres de carboidratos provocam incapacidade de manutenção do peso corporal, hipoglicemia, hiperinsulinemia e aumento da concentração de lipídios corporais; o acréscimo de proteína dietária alivia os problemas metabólicos induzidos por dietas livres de carboidratos e com altos teores de lipídios (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1978).

Em dietas experimentais, quando os ratos são alimentados com dietas deficientes em proteínas ou vitaminas hidrossolúveis, os carboidratos insolúveis (amidos ou dextrinas) promovem maior crescimento do que os carboidratos solúveis

(sacarose ou glucose), devido ao aumento das bactérias intestinais e também pelo aumento da síntese de vitaminas disponíveis diretamente pela absorção ou coprofagia. Muitas fontes de carboidratos podem ser utilizadas, incluindo glucose, sacarose, maltose, frutose e amidos de trigo, milho, arroz e mandioca. Altos níveis de lactose, galactose ou xilose resultam em baixo crescimento e formação de catarata. O amido de batata apresenta baixa disponibilidade, provavelmente devido à resistência do seu grânulo às enzimas digestivas (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1978; ROGERS, 1979).

Dietas consideradas adequadas para ratos e camundongos contêm aproximadamente 60% de carboidratos em suas formulações (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1972, 1978).

As fibras, apesar de não apresentarem valor nutricional próprio, exercem profundos efeitos na nutrição dos animais consumindo dietas que as contenham. Sofrem degradação parcial principalmente no intestino grosso, pela ação de microorganismos fermentadores com a produção de ácidos graxos voláteis, ácido láctico e outros ácidos orgânicos, dióxido de carbono, metano e hidrogênio. Apresentam propriedades de absorção de água e intumescimento, aumentando o volume intestinal e a taxa de passagem da digesta através do trato gastrointestinal. Além disso, têm fortes propriedades de troca de cátions e podem ligar cátions nutricionalmente importantes como zinco, cálcio e ferro e outros de significância toxicológica como cádmio e chumbo (COATES, 1976; EGGUM *et alii*, 1982; SGARBIERI, 1987).

O conteúdo máximo de fibra compatível com crescimento máximo ou normal depende da natureza do material fibroso, desde

que podem ocorrer efeitos sobre palatabilidade, digestão, lactação, biossíntese microbiana intestinal e ingestão de outros nutrientes. Não há requerimento estabelecido para fibra em dietas de ratos e camundongos, mas geralmente há a inclusão de cerca de 5%, a qual é aproximadamente a quantidade em dietas formuladas com ingredientes naturais (KNAPKA, SMITH & JUDGE, 1974; AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION, 1977).

- Lipídios

Os lipídios representam uma fonte significativa de energia, apresentando elevado potencial calórico, com uma energia metabolizável de cerca de 9 kcal/g, contra 4 kcal/g dos carboidratos, embora estes constituam a maior fonte de energia na maioria das dietas para animais de laboratório.

Os lipídios dietários são requeridos como fontes dos ácidos graxos essenciais necessários para síntese dos lipídios dos tecidos e membranas celulares, além de serem requeridos para absorção e utilização normal das vitaminas lipossolúveis. A essencialidade do ácido linolênico para mamíferos não está totalmente esclarecida; ratos alimentados com ácido linoléico como única fonte de ácidos graxos essenciais por duas gerações apresentaram crescimento, reprodução e lactação adequados (GURR, 1986).

As dietas comercialmente formuladas contêm lipídios naturais que ocorrem como constituintes de sementes e de produtos de origem animal, principalmente na forma de lipídios neutros, isto é, ésteres de glicerol e ácidos graxos, podendo ser também deliberadamente adicionados. A adição nas dietas semi-sintéticas

é recomendada (CLARKE *et alii*, 1977). A adição de antioxidantes para evitar deterioração dos óleos durante a estocagem ou após mistura na dieta é prática comum entre os fabricantes (COATES, 1976).

O tipo e nível de gordura podem influenciar o comportamento de seleção de dietas em animais. MULLEN & MARTIN (1990) estudaram os efeitos da gordura bovina (saturada) e do óleo de milho (insaturado) na preferência de ratos por carboidratos e proteínas e encontraram que ratos alimentados com dietas com altos teores de gordura bovina ingeriram posteriormente mais proteína como porcentagem da ingesta energética total. Os efeitos não foram atribuídos ao grau de insaturação dos lipídios, já que os resultados obtidos com óleo de coco (saturado) foram semelhantes aos do óleo de milho (insaturado), sugerindo que diferenças na composição química das gorduras dietárias podem contribuir para seus efeitos sobre a preferência dietária, influenciando diferencialmente a composição das membranas e funções celulares. Quando estas alterações ocorrem no cérebro em áreas envolvidas no comportamento de escolha dietária, respostas comportamentais podem ser influenciadas (MULLEN & MARTIN, 1990).

As evidências para o estabelecimento da concentração dietária ótima de lipídios não são conclusivas, com dados bastante contraditórios. Dietas para ratos geralmente contém 5 a 15% de lipídios. Contudo, um nível mínimo de 5% tem sido recomendado; este valor propicia ampla inclusão de ácidos graxos essenciais na dieta, atingindo as necessidades para todas as atividades fisiológicas. Para camundongos, não há requerimento

estabelecido e dietas adequadas para estes animais contêm cerca de 5% de lipídios (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1978).

Os requerimentos para ácidos graxos essenciais geralmente são expressos em termos do ácido linoléico, com a maior atividade biológica atribuída ao isômero cis-cis. O requerimento dietário de ratos é de 1,3% das calorias ou 0,6% de ácido linoléico por 100 gramas de dieta, e 0,5% das calorias ou 0,22% de ácido linoléico por 100 gramas de dieta para machos e fêmeas, respectivamente. Dietas adequadas para crescimento são adequadas para reprodução. Durante a lactação, há aumento no requerimento das fêmeas para 0,3%. Dietas com altos teores de gorduras saturadas (>5%), de ácido oléico ou de colesterol aumentam o requerimento dietário de ácido linoléico (ROGERS, 1979).

Os camundongos requerem uma fonte dietária de ácido linoléico e/ou araquidônico; não há estudos específicos na determinação dos requerimento para camundongos, adotando-se a concentração de 0,3% de ácido linoléico, baseada no requerimento de ratos (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1978).

Os sinais de deficiência para ratos e camundongos estão descritos pelo NATIONAL RESEARCH COUNCIL (1978).

2.1.4.2 Proteínas

A escolha adequada do conteúdo protéico da dieta é de particular importância, a fim de que o animal satisfaça seus requerimentos de aminoácidos e alcance seu potencial de crescimento e reprodução, e ao mesmo tempo não empregue os

aminoácidos sob a forma antieconômica de energia dietária.

A taxa de energia para proteína deve ser tal que, um animal, ao satisfazer sua demanda energética, o alimento ingerido deveria conter a quantidade de proteína requerida para uma dada função (GHIRINGHELLI & LÓPEZ, 1987).

O NRC recomenda para ratos em crescimento níveis protéicos de 13,6% da dieta, se a caseína for a proteína dietária, e 18-25%, se ingredientes não purificados forem utilizados. Estes níveis devem ser formulados com uma densidade energética de 3.800 kcal/kg de energia digerível. Assim, os níveis protéicos equivalem a 15% da energia metabolizável total, para dietas de caseína (13,6% de proteína), e 19-26% da energia metabolizável, para dietas de ingredientes naturais. Para ratos em condição de manutenção, níveis de 4,8% e 7% são recomendados para caseína e ingredientes não purificados, respectivamente. Estes níveis equivalem a aproximadamente 5% da energia metabolizável total, para dietas de caseína, e 7%, para dietas de ingredientes naturais. Para camundongos, os requerimentos estabelecidos são de 12,5% para crescimento e 18,0% para reprodução, correspondendo a 13% e 20%, respectivamente, da energia metabolizável total (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1978).

Cerca de vinte aminoácidos são encontrados nas proteínas da maioria dos animais. Para os ratos, são dez os aminoácidos dieteticamente indispensáveis: isoleucina, leucina, lisina, fenilalanina, metionina, treonina, triptofano, valina, histidina e arginina (TAGLE, 1981). Aminoácidos essenciais para a nutrição de camundongos incluem histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina,

enquanto que a arginina parece ser sintetizada por esses animais (JOHN & BELL, 1976). Com referência à arginina e ratos, a requisição de arginina parece se restringir aos jovens, não sendo requerida para ratos adultos (ROGERS, 1979). A tirosina e cisteína devem ser supridos pela dieta quando for baixo o aporte dos aminoácidos indispensáveis aos quais estão ligados quimicamente.

A escolha de proteínas para as dietas animais deve ser determinada pelo exame cuidadoso da composição, balanço, digestibilidade e biodisponibilidade de seus aminoácidos. Na prática, há poucas proteínas que oferecem uma composição ideal de aminoácidos e geralmente se utiliza uma mistura de fontes protéicas, de tal modo que as deficiências de determinadas fontes sejam compensadas pelos excessos de outras (MITCHELL, 1924; COATES, 1976; CLARKE *et alii*, 1977).

Os cereais são deficientes em lisina, e este aminoácido aparece como o primeiro limitante, sendo seguido pela treonina. HEGER & FRYDRYCH (1986) no estudo de dietas baseadas em trigo e cevada estimaram a sequência na qual os aminoácidos tornam-se limitantes nestes cereais: lisina e treonina foram considerados os primeiro e segundo aminoácidos limitantes, respectivamente, sendo seguidos pelos sulfurados (metionina e cistina), isoleucina, valina e finalmente pela leucina e aminoácidos aromáticos. Estes autores confirmaram que a utilização da proteína de cereais pode ser consideravelmente melhorada pela adição dos aminoácidos limitantes; contudo, mesmo os suplementos ótimos desses aminoácidos não elevaram a qualidade da proteína ao nível das proteínas animais de alta qualidade como as

lactalbuminas. Dietas baseadas inteiramente em cereais são inadequadas para crescimento e reprodução da maioria das espécies (COATES, 1976).

As proteínas das leguminosas são geralmente deficientes em aminoácidos sulfurados. A metionina, por ser nutricionalmente essencial para o organismo animal, é considerada o aminoácido limitante do valor biológico dessas proteínas. A cisteína é sintetizada a partir da metionina e pode acentuar a limitação da metionina. Essas proteínas geralmente apresentam concentração elevada de lisina, sendo consideradas de grande valor na complementação das proteínas de cereais, que de um modo geral são pobres em lisina, conforme já descrito no parágrafo anterior (SOUZA & DUTRA DE OLIVEIRA, 1969; EVANS & BAUER, 1978; SGARBIERI, 1980; SGARBIERI & GARRUTI, 1986).

A ingestão de dietas com quantidades desproporcionadas de aminoácidos, isto é, dietas com desbalanços de aminoácidos, causa alterações nas respostas fisiológicas dos animais. Na toxicidade ou deficiência de aminoácidos, a severidade depende não apenas do nível mas também do tipo do aminoácido em déficit ou em excesso.

A metionina é provavelmente o aminoácido mais tóxico dos essenciais para a síntese protéica e a ingestão em excesso desse aminoácido (2 a 3% da dieta) é caracterizada no rato por supressão marcada na ingesta alimentar voluntária e retardo no crescimento e efeitos nos tecidos de danos à membrana dos eritrócitos, aumento do fígado e degeneração da aorta, propondo-se que produtos intermediários do catabolismo da metionina podem estar envolvidos na origem desses efeitos, quando se ligam às

proteínas das membranas ou por inibição de enzimas sensíveis das mesmas (FINKELSTEIN & BENEVENGA, 1986; FAU, PERET & HADJIISKY, 1988). STRAIN & LYNCH (1990) sugerem que alguns efeitos sejam devidos à alteração do nível de cobre ou inibição do seu metabolismo e de enzimas cobre-dependentes, pois a suplementação do aminoácido (2% da dieta) provocou diminuição nos níveis de cobre e da atividade de várias enzimas que contém cobre.

PENG (1979) estudou a severidade relativa de desbalanços de aminoácidos pela comparação da extensão de depressão na ingesta alimentar e crescimento de ratos; seus resultados indicaram que o desbalanço de metionina foi o mais severo, seguido em ordem decrescente por isoleucina, triptofano, leucina e valina, histidina, fenilalanina, treonina, lisina e arginina.

Sabe-se também que os aminoácidos exercem função no controle da ingesta alimentar e que o excesso ou deficiência causam diminuição na ingesta. A ingestão de dietas desbalanceadas resulta em alterações nas concentrações de aminoácidos do plasma e do cérebro, conduzindo a ajustes na ingesta, onde o cérebro parece ter função primordial, pois mudanças nas concentrações cerebrais de aminoácidos induzidas por alterações nas concentrações plasmáticas estão envolvidas no controle da ingesta alimentar. A depressão da ingesta em ratos alimentados com dietas excessivamente altas em proteínas é transitória, devido à ocorrência de adaptações metabólicas. As depressões de ingesta associadas com padrões de aminoácidos dietários severamente desbalanceados ocorrem em curto tempo e são severos e prolongados e dificilmente recuperáveis devido à diminuição da ingesta.

Entretanto, em desbalanços pouco acentuados os animais podem gradualmente se adaptar metabolicamente às dietas e sobreviverem, e com ingesta aumentada, podem crescer (TACKMAN, TEWS & HARPER, 1990). Segundo esses autores, apenas pequenas diferenças na ingesta alimentar são observadas em ratos consumindo dietas com conteúdo protéico de 15 a 40% e composição aminoacídica usual, já que nessas condições o envolvimento de mudanças de aminoácidos cerebrais e plasmáticos no controle do comportamento alimentar é secundário ao controle por mecanismos que conduzem à manutenção do balanço energético.

CIESLAK & BENEVENGA (1984 a, b, c) estudaram o efeito do excesso de aminoácidos sobre a utilização dos aminoácidos limitantes lisina e treonina e encontraram que o efeito do balanço de aminoácido depende de qual aminoácido é mais limitante e do nível no qual ele é suprido. Ratos alimentados com dietas deficientes em lisina não foram afetados pelo excesso de outros aminoácidos; entretanto, o excesso de aminoácidos provocou a queda de crescimento de ratos alimentados com dietas contendo treonina a 75% dos requerimentos NRC (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1978). Nestes experimentos, as quedas de crescimento associadas ao excesso de aminoácidos foram devidas inteiramente às mudanças na ingesta alimentar voluntária.

Estudos realizados com frangos e ratos em crescimento demonstraram que quando os aminoácidos essenciais foram supridos na dieta na taxa de 0,55 em relação aos aminoácidos totais, os animais apresentaram desempenho máximo (MATSUNO *et alii*, 1976; BEDFORD & SUMMERS, 1985). De acordo com HARPER (1974), os ratos não alcançam seu potencial genético para crescimento se o

nitrogênio da dieta for suprido apenas por uma mistura de aminoácidos essenciais. Uma combinação dos aminoácidos dispensáveis deve ser provida na dieta em conjunto com os essenciais para assegurar uma taxa de crescimento equivalente a de animais-controle consumindo uma dieta adequada contendo proteína.

HEGER (1990) estudou os efeitos de suplementos de asparagina, prolina e ácido glutâmico e de níveis excessivos e reduzidos de aminoácidos essenciais na utilização de dietas baseadas em aminoácidos essenciais. A adição de asparagina, prolina e ácido glutâmico e a redução dos níveis dietários de arginina, lisina e metionina+cistina provocaram um aumento no balanço de nitrogênio e valor biológico, indicando que a utilização ótima da proteína pode ser influenciada pela presença de alguns aminoácidos dispensáveis e pela quantidade extra de alguns aminoácidos essenciais.

Presume-se que as respostas obtidas pela adição destes aminoácidos dispensáveis são devidas à inabilidade do rato de sintetizar as quantidades requeridas para o crescimento muito rápido. Contudo, parece haver uma certa adaptação a dietas deficientes em aminoácidos dispensáveis após um período de tempo, com obtenção de taxas de crescimento adequadas (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1978).

Portanto, o requerimento dietário para proteína envolve o requerimento para aminoácidos dispensáveis e aminoácidos indispensáveis (SELLIGSON & MACKEY, 1984), sendo influenciado pela condição fisiológica, pelo conteúdo calórico da dieta e pela composição aminoacídica e digestibilidade da proteína.

TURNER *et alii* (1987), no estudo para determinação e comparação do nível protéico necessário para iniciar e manter um desempenho reprodutivo satisfatório e maximizar o crescimento, encontraram que uma ingesta de 8,6% de proteína de ovo integral retardou a puberdade, mas atendeu as necessidades para as funções reprodutivas posteriores, exceto no peso médio da cria, enquanto que uma ingesta de 15,6% foi requerida para máximo crescimento do desmame até a reprodução, sugerindo que o nível protéico recomendado pelo NRC para o rato jovem é insuficiente para proporcionar o crescimento máximo. Por outro lado, o nível protéico para reprodução recomendado pelo NRC (12%) pode ser excessivo se o atraso da puberdade não estiver sendo considerado.

Deve-se considerar entretanto que os ratos podem se adaptar a dietas deficientes em alguns aminoácidos essenciais: dietas com a falta de um único aminoácido essencial promovem a queda da utilização protéica para 20-40% do valor obtido com dietas adequadas, exceto para treonina, isoleucina ou aminoácidos sulfurados, onde a utilização é completamente prejudicada (ROGERS, 1979).

Para camundongos, os estudos têm indicado grande variação entre as linhagens na concentração necessária de proteína dietária. Muitas das colônias mantidas para experimentação e reprodução são alimentadas com dietas de ingredientes naturais com concentrações protéicas de 20-25%. Níveis protéicos satisfatórios em várias dietas comerciais, institucionais e purificadas variam de 20-30% (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1972).

Encerrando, as deficiências dietárias protéicas são inúmeras e estão descritas no NATIONAL RESEARCH COUNCIL (1978).

2.1.4.3 Minerais

Os minerais, em função das quantidades presentes nos tecidos e das requeridas nas dietas, são divididos em macroelementos e microelementos ou elementos-traços.

Os macroelementos ocorrem em concentrações relativamente altas em um ou mais tecidos e são requeridos nas dietas em concentrações de 0,05 a 0,5%. São eles: cálcio, cloro, fósforo, potássio, sódio e enxofre. Os microelementos ou elementos-traços são elementos que ocorrem mais ou menos constantemente em plantas e animais em baixas concentrações, geralmente nas faixas de 10^{-6} a 10^{-12} gramas por grama de tecido úmido e são requeridos nas dietas em concentrações de 0,1-400 mg/kg. São eles: ferro, cobre, cobalto, manganês, magnésio, zinco, iodo, flúor, molibdênio, selênio, cromo, silício. Alguns elementos-traços são requeridos em quantidades diminutas e não há necessidade de adicioná-los às dietas, pois ocorrem em quantidades suficientes nos macronutrientes, na água, ou como impurezas nos suplementos minerais.

Os níveis de minerais eletrólitos e estruturais são bem controlados nos tecidos animais através de mecanismos homeostáticos e variações dietárias são toleradas em condições normais dos rins e intestinos. Para os microelementos, o controle homeostático é menos efetivo (CLARKE *et alii*, 1977).

Será apresentado a seguir um breve estudo dos

requerimentos minerais e vitamínicos de ratos e camundongos. O estudo é fundamentado nas recomendações do NRC (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1978) e quando necessário, atualizado através da composição da dieta AIN-90 (KNAPKA, 1990, idem rodapé p. 54).

- Cálcio e fósforo

Os cereais são pobres em cálcio e o suprimento deste elemento deve ser feito pela utilização de produtos de origem animal, tais como: leite, farinha de carne e farinha de ossos, ou pela inclusão de cálcio extra na forma de farinha de calcário ou fosfato de cálcio, na formulação das dietas. O fósforo é mais abundante nos produtos vegetais, mas nesta situação não é rapidamente absorvido pois a maior parte do elemento se encontra na forma de ácido fítico, indisponível para o animal (COATES, 1976).

Estes minerais devem estar presentes em quantidades e proporções adequadas nas dietas. Para a maior parte dos animais, a taxa dietária de cálcio para fósforo encontra-se entre 2:1 e 1:1, permitindo um metabolismo mineral normal (COATES, 1976).

Os requerimentos dietários para ratos em crescimento baseados na máxima calcificação são aproximadamente 5 e 4 g/kg de dieta para cálcio e fósforo, respectivamente, com uma taxa de cálcio para fósforo entre 1,0 e 1,5 recomendada durante o período de crescimento rápido.

Para a manutenção, os requerimentos são relativamente baixos e não têm sido estabelecidos, mas uma taxa de 2:1 de cálcio para fósforo é superior à de 1:1 para prevenção da osteoporose. Para os estados de gestação e lactação, estes

elementos devem ser abundantemente supridos nas dietas para compensar as quantidades transferidas para o desenvolvimento dos embriões e secreção do leite (COATES, 1976; ROGERS, 1979).

Para os camundongos, o NRC recomenda níveis de 4 g/kg de dieta para cálcio e fósforo, baseado no conteúdo de dietas adequadas. Estes requerimentos são adequados para crescimento e reprodução. Vale notar que os camundongos são menos sensíveis do que os ratos às deficiências, pois apresentam mecanismos compensatórios, provendo uma melhor utilização do cálcio e um crescimento reduzido do esqueleto. Assim, o sinal de deficiência mais proeminente é a redução do crescimento e não a osteoporose.

- Sódio

O requerimento dietário para ratos é de 0,5 g/kg de dieta, sendo adequado para crescimento e reprodução. Para camundongos, embora o elemento seja requerido, não há dados quantitativos. As concentrações usadas em várias fórmulas de dietas se situam na faixa de 5 a 10 g/kg de dieta. Dietas com níveis de sódio de 3,6 e 4,9 g/kg de dieta, analisadas sob o ponto de vista de adequação para crescimento e reprodução, foram consideradas satisfatórias (KNAPKA *et alii*, 1974). Deficiências de sódio resultam em apetite reduzido, atraso no crescimento, formação óssea anormal e deficiências na fertilidade.

- Potássio

O requerimento dietário para ratos é de 3,6 g/kg de dieta, sendo suficiente para crescimento e reprodução. Há sugestões de aumento para 5 g/kg de dieta durante o período de

lactação, embora estudos dos efeitos do nível de 3,6 g/kg de dieta sobre a lactação em ratos tenham indicado que este valor é suficiente (AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION, 1977).

Ratos alimentados com dietas deficientes em potássio exibem apetite reduzido e crescimento mínimo, tornando-se letárgicos e apresentando perda de pelo, ascite, hidrotórax, atrofia e necrose dos músculos cardíacos e esqueléticos, lesões renais, podendo morrer dentro de três semanas.

Os camundongos apresentam um requerimento dietário de 2 g/kg de dieta, adequado para crescimento e reprodução e quando alimentados com dietas deficientes podem morrer dentro de uma semana, após terem exibido sinais de inanição.

- Cloro

O requerimento para ratos é de 0,5 g/kg de dieta, estabelecido na base de estudos que demonstraram a adequação deste valor e a falta de efeitos sobre o ganho de peso em ratos alimentados com dietas com teor de cloreto variando de 0,5 a 2 g/kg de dieta.

Os sinais de deficiência se desenvolvem lentamente e envolvem principalmente depressão do apetite, crescimento atrasado e redução no cloreto sanguíneo e excretado, podendo, em deficiências crônicas, ocorrer o desenvolvimento de fibroses renais.

Para o camundongo, não há dados quantitativos, embora o elemento seja requerido. A dieta AIN-76, adequada para crescimento, lactação e reprodução, apresenta 1,56 g de cloreto/kg de dieta em sua formulação (AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION,

1977).

- Magnésio

Os requerimentos de magnésio são da ordem de 400 mg/kg de dieta para ratos em crescimento, com níveis mais elevados sendo provavelmente necessários para reprodução e lactação adequadas. Para camundongos, o requerimento estimado para crescimento é de 500 mg/kg de dieta, havendo necessidade de aumento no nível para lactação.

Sinais de deficiência envolvem vasodilatação, hiperirritabilidade, problemas cardíacos, conduzindo finalmente a mortes por convulsões.

- Enxofre

A presença dietária do elemento significa economia de metionina, já que o sulfato dietário é rapidamente incorporado na cartilagem, decrescendo o catabolismo de metionina. Assim, 0,3 g de enxofre como sulfato/ kg de dieta foi estabelecido como requerimento para ratos, sugerindo-se que nas condições de metionina mínima 1 g de enxofre/kg de dieta seja incluído. (ROGERS, 1979).

- Cromo

Em condições ambientais e dietárias normais, concentrações de 0,3 mg e 2 mg de cromo/kg de dieta são usadas como requerimentos para ratos e camundongos, respectivamente. Para camundongos, o valor foi estabelecido com base no conteúdo de cromo de dietas publicadas. A deficiência do elemento provoca

hiperglicemia e glicosúria similares a diabetes mellitus, com decréscimo significativo no ganho de peso e duração da vida.

- Cobre

O requerimento para ratos é de 5 mg/kg de dieta, enquanto que para camundongos, dietas com os níveis mais baixos apresentam valores de 4,5 mg/kg de dieta, sendo este valor recomendado como adequado para crescimento e reprodução. A deficiência de cobre produz anemia e acromotriquia(perda do pigmento capilar). Em deficiências extremas, há perda da capacidade oxidativa na mitocôndria e síntese reduzida de ATP e fosfolipídios.

- Flúor

Sob condições usuais de laboratório, o requerimento estabelecido é de 1 mg/kg de dieta para ratos; para camundongos, o nível é incerto, sem requerimento estabelecido: os resultados obtidos em vários estudos são controversos. Nos ratos, a deficiência provoca descoloração dos incisivos e baixo ganho de peso. Em camundongos a deficiência de flúor provoca fertilidade reduzida e anemia materna e do recém-nascido.

- Iodo

O requerimento para ratos é de 0,15 mg/kg de dieta para crescimento e aparentemente não há requerimento especial para reprodução. Para camundongos, o requerimento estimado é de 0,25 mg/kg de dieta, embora dietas adequadas variem grandemente no conteúdo desse elemento: uma ração de ingredientes naturais

fornece 1,9 mg/kg de dieta, possibilitando boa reprodução, enquanto que uma ração purificada, propiciando bom crescimento e reprodução em camundongos, contém 36 mg de iodo/kg de dieta.

- Ferro

O requerimento de ferro para ratos é de 35 mg/kg de dieta, permitindo crescimento e manutenção da concentração máxima de hemoglobina; para reprodução, não existem requerimentos separados. Para camundongos, o requerimento para crescimento é de 25 mg/kg da dieta, enquanto que para reprodução o menor conteúdo já testado é de 120 mg/kg de dieta, o qual produziu boa reprodução através de três gerações.

- Manganês

O requerimento estabelecido para ratos é de 50 mg/kg de dieta para crescimento, o qual também suporta a reprodução. Para camundongos, o requerimento é de 45 mg/kg de dieta, estimado a partir de dietas consideradas adequadas para a reprodução, o crescimento das crias e para o desenvolvimento dos otolitos do ouvido interno para várias linhagens.

- Selênio

É o mais tóxico dos minerais essenciais, apresentando importância nutricional em deficiência tanto quanto em excesso.

Para ratos, o requerimento estabelecido é de 0,1 mg/kg de dieta, adequado para evitar necrose hepática, permitir ganho de peso máximo e manter concentração normal de glutathione-peroxidase nos tecidos. Concentrações de selênio acima de 1-2

mg/kg de dieta devem ser evitadas. O selênio é requerido por camundongos, mas não existem requerimentos estabelecidos.

- Zinco

A disponibilidade do zinco dietário pode ser afetada negativamente por altos níveis de cálcio e pelo ácido fítico, devido à formação de complexos insolúveis. A farinha de soja apresenta um efeito adverso, parcialmente pelo seu conteúdo de fitato, além de provável existência de algum fator zinco-ligante. Assim, o nível de zinco presente nas rações animais pode ser inadequado em certas circunstâncias. A utilização de gaiolas e recipientes galvanizados pode significar uma boa fonte fornecedora de zinco para os animais de laboratório (COATES, 1976).

O requerimento de zinco para ratos é de 12 mg/kg de dieta; quando proteína de soja é utilizada pode haver um aumento deste valor para 18 mg/kg de dieta, enquanto que na utilização de gaiolas galvanizadas, não mais que 2-4 mg de zinco/kg de dieta são requeridos. Para camundongos, o requerimento estimado a partir do conteúdo de dietas adequadas é de 30 mg/kg de dieta, permitindo crescimento e reprodução adequados. Animais deficientes em zinco apresentam retardo no crescimento, acompanhado de anorexia, alopecia, lesões da epiderme envolvendo o esôfago e a pele e hiperirritabilidade, além de distúrbios na reprodução.

- Cobalto

Aparentemente o cobalto não é requerido pelo rato a não

ser como constituinte da vitamina B₁₂. Estudos realizados com camundongos indicaram que há necessidade de 2 g de cloreto de cobalto/kg de dieta para manter reprodução através de gerações sucessivas de animais alimentados apenas com derivados vegetais.

Dietas adequadas para ratos e camundongos têm apresentado satisfatoriedade para reprodução, lactação e manutenção com teores de 0,44 mg/kg de dieta (AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION, 1977).

- Molibdênio

Não há requerimentos dietários estabelecidos para este elemento, com base em estudos que demonstraram que dietas com 0,02 mg de molibdênio/kg de dieta, ou inibição da enzima xantina oxidase com tungstato de sódio não resultaram em anormalidades e não prejudicaram a reprodução.

- Outros elementos

Várias evidências têm sido acumuladas sobre a inclusão de outros elementos na lista dos elementos já considerados essenciais, principalmente sob condições ambientais rigidamente controladas incluindo o uso de gaiolas plásticas e isoladores permitindo a presença somente de ar filtrado, uso de água e dietas livres dos elementos estudados.

Nestas condições, melhora na saúde e crescimento de ratos resultaram da inclusão dietária dos elementos ultra-traços em concentrações dietárias apresentadas na tabela 12 (p. 73), segundo KNAPKA (1990, idem rodapé p. 54).

2.1.4.4 Vitaminas

- Vitamina A

Os requerimentos para vitamina A são influenciados por outros componentes das dietas: proteína, lipídios, vitaminas D e E, zinco e ácidos graxos insaturados afetam a absorção e utilização da vitamina A.

Um nível de 4.000 UI/kg de dieta é recomendado para ratos, sendo adequado para crescimento ótimo, reprodução e manutenção. Os três indicadores mais sensitivos de deficiência de vitamina A são: decréscimo na taxa de crescimento, elevação da pressão do fluido cerebrospinal e metaplasia escamosa do duto nasolacrimal. Outros sinais de deficiência envolvem aumento na susceptibilidade a infecções, excessiva queratinização e subsequente ulceração da córnea, redução da síntese de mucopolissacarídeos no trato gastrointestinal, degeneração da retina, falha reprodutiva e defeitos ósseos.

O requerimento estabelecido para camundongos é de 1-2 UI/dia ou 250-500 UI/kg de dieta, e os requerimentos para gestação e lactação são similares aos de crescimento. As dietas para camundongos entretanto contêm, na sua maioria, concentrações consideravelmente superiores aos requerimentos. As dietas AIN-76 e AIN-90 contêm 4.000 UI/kg e a dieta de ingredientes naturais utilizada por KNAPKA *et alii* (1974) contêm 15.000 UI/kg de dieta.

- Vitamina D

Para ratos, o requerimento é de 1.000 UI/kg de dieta, quando cálcio (5 g/kg de dieta) e fósforo (4 g/kg de dieta) estão

presentes em quantidades adequadas. Para camundongos, o requerimento estimado é de 150 UI/kg de dieta. Dietas de ingredientes naturais, que suportam reprodução aceitável em camundongos, apresentam concentração de aproximadamente 5.000 UI/kg de dieta. As dietas purificadas AIN-76 e AIN-90 recomendadas pelo Instituto Americano de Nutrição contêm 1.000 UI/kg de dieta, sendo adequadas para crescimento e manutenção durante o primeiro ano de vida, para reprodução e lactação de ratos e camundongos.

- Vitamina E

O requerimento para ratos é de 30 UI/kg de dieta, na forma estabilizada, para dietas que apresentam concentração de ácido linoléico de até 50 g/kg de dieta e aminoácidos sulfurados e selênio em níveis adequados.

A hemólise é o indicador mais sensível de deficiência. Em adição, ratos e camundongos com deficiência poderão apresentar convulsão e falhas cardíacas, distrofia e degeneração hialina do músculo esquelético, acúmulo de pigmento amarelo no músculo e fígado, degeneração testicular com falhas reprodutivas e necrose hepática, a qual é freqüentemente a causa da morte.

O requerimento para camundongos é de 20 UI/kg de dieta.

- Vitamina K

Ratos mantidos sob condições ambientais normais requerem um nível de 0,05 mg/kg de dieta (vitamina K₁) para manutenção dos níveis normais de protrombina, sendo adequado em situações de baixa síntese intestinal e baixa contribuição da

caseína. Em condições "germ-free" e em impedimento da coprofagia, os requerimentos são 0,2 e 0,1 mg/kg de dieta, respectivamente. A menadiona apresenta aproximadamente 10% da atividade da vitamina K₁, e deve ser utilizada em quantidades 10 vezes superiores às citadas. O requerimento para camundongos é de 3,0 mg/kg de dieta (equivalente de vitamina K₁), estimado do conteúdo de dietas adequadas; estudos têm demonstrado que camundongos mantidos em ambientes "germ-free" ou SPF requerem suplementação da vitamina. Em geral, a vitamina K não é adicionada a dietas de camundongos convencionais, devido à síntese do nutriente pelos microorganismos intestinais. Deficiência de vitamina K resulta em falha no mecanismo de coagulação sangüínea, conduzindo a hemorragias. As fêmeas são mais resistentes às deficiências do que os machos.

- Ácido ascórbico

Os ratos e camundongos não requerem uma fonte dietária de ácido ascórbico. Entretanto, este nutriente pode proporcionar economia de certas vitaminas B, pelo aumento do conteúdo fecal das mesmas, as quais podem ser recuperadas via coprofagia. Estudos de adição de ácido ascórbico sob formas variadas demonstraram que a suplementação de dietas deficientes em tiamina com 50 g de ácido ascórbico/kg de dieta promoveu, em ratos, o aumento do conteúdo de tiamina nas fezes, proporcionando taxa de crescimento próxima à normal e evitando outros sintomas de deficiência (MURDOCK, DONALDSON & GUBLER, 1974). A deficiência de ácido ascórbico causa o escorbuto, com alterações patológicas nos dentes, gengivas e tecidos conjuntivos em geral.

- Biotina

Não é requerida por ratos sob condições padronizadas de laboratório, sendo suprida em quantidades adequadas pela síntese bacteriana intestinal. CLARKE *et alii* (1977) recomenda a adição de biotina no nível de 1 mg/kg de dieta em situações de síntese microbiana limitada ou ausente, como por exemplo, em animais germ-free ou SPF.

Não há requerimento real estabelecido para camundongos, estimando-se um valor de 0,2 mg/kg de dieta, a partir do conteúdo de dietas adequadas, as quais contêm de 0,2 a 1,0 mg/kg de dieta.

- Colina

Ratos e camundongos requerem colina, e o requerimento dietário é influenciado pelo conteúdo lipídico e conteúdo calórico da dieta e pelo comprimento da cadeia e grau de insaturação dos lipídios dietários.

Em dietas adequadas, com cerca de 4 a 4,5 kcal/g, o requerimento é aproximadamente 1 g/kg de dieta para ratos, e estimativas para o requerimento de camundongos sugerem 0,6 g/kg de dieta. Dietas com maior conteúdo de lipídios ou com níveis deficientes de metionina requerem maior adição de colina. De acordo com CLARKE *et alii* (1977), a colina está presente em quantidades consideráveis nos materiais crus utilizados em dietas de ingredientes naturais e a adição não é necessária; nas dietas purificadas, recomenda-se a adição de um grama de colina por quilograma de dieta.

Em ratos, a deficiência de colina produz fígado gorduroso, podendo levar a quadros de cirrose. Ratos jovens

deficientes apresentam efeitos marcantes nos sistemas renal e cardiovascular. Os camundongos apresentam sinais semelhantes, a exceção da cirrose, que não se desenvolve nesses animais.

- Ácido fólico

A síntese microbiana intestinal atende os requerimentos dietários para ratos, mas a alimentação com dietas inadequadas em colina, metionina e vitamina B₁₂ pode induzir deficiência de folato; a gestação e lactação podem aumentar o requerimento. Uma faixa de 0,5-10 mg/kg de dieta tem sido utilizada; o nível de 1 mg/kg é recomendado.

Sinais de deficiência em ratos incluem taxa de crescimento decrescida, leucopenia, anemia megaloblástica.

Para camundongos é recomendado 0,5 mg/kg de dieta, baseado na menor concentração encontrada em dietas adequadas. Os sinais de deficiência são similares àqueles de ratos.

- Inositol

O inositol não é requerido por ratos e camundongos em condições convencionais de laboratório e alimentados com dietas normais. Entretanto, certas condições ambientais (ambientes SPF, "germ-free", gnotobiótico), a supressão da síntese intestinal, determinados tipos de dieta e condições de "stress" fisiológico podem exigir o requerimento deste nutriente. Sinais de deficiência incluem crescimento retardado, alopecia e metabolismo lipídico deficiente.

- Niacina

O requerimento de niacina do rato é de 20 mg/kg de dieta, sendo adequado em uma concentração de triptofano de 1,5 g/kg de dieta. A concentração de niacina à 10 mg/kg de dieta para camundongos parece satisfatória; as dietas disponíveis excedem este requerimento, com níveis de 48-143 mg/kg de dieta em dietas de ingredientes naturais.

Sinais de deficiência incluem anormalidades comportamentais, convulsões, diarreia, perda de peso e alopecia.

- Ácido pantotênico

O requerimento para crescimento, reprodução e manutenção de reações de acetilação em ratos é de 8 mg de pantotenato de cálcio/kg de dieta. Para camundongos, a concentração sugerida é de 10 mg/kg de dieta, embora existam diferenças entre as diversas linhagens. Dietas satisfatórias contêm de 16 a 50 mg/kg.

- Riboflavina (vitamina B₂)

O requerimento para ratos baseado no crescimento e reservas hepáticas é de 2 mg/kg de dieta; para reprodução normal, 3 mg/kg e um aumento para 4 mg/kg pode ser recomendável durante a gestação. Para camundongos, o requerimento para crescimento normal é de cerca de 4 mg/kg de dieta, enquanto que 7 mg/kg são sugeridos para reprodução e lactação adequadas.

Sinais de deficiência de riboflavina envolvem dermatite, alopecia, fraqueza, crescimento retardado, ulceração e vascularização da córnea, formação de catarata, degeneração da

mielina, além de efeitos metabólicos complexos. O desempenho reprodutivo é diminuído, com produção de crias anormais. Ratos deficientes em niacina apresentam conteúdo hepático de riboflavina diminuído e ratos deficientes em riboflavina apresentam reservas hepáticas diminuídas de folatos. Camundongos deficientes apresentam menor resistência à infecções por *Salmonella*.

- Tiamina (vitamina B₁)

O requerimento para ratos é de 4 mg/kg de dieta e para camundongos é de 5 mg/kg de dieta; dietas satisfatórias para camundongos contêm de 5 a 23 mg de tiamina por quilograma de dieta.

A deficiência de tiamina induz anormalidades do sistema nervoso e do coração, falhas reprodutivas, anorexia e perda de peso. Ratos deficientes são atáxicos, com reflexos defeituosos e sonolência. Camundongos deficientes apresentam convulsões, movimentos circulares, hemorragias cerebrais, morte prematura, lesões musculares, degeneração testicular e ataxia.

As perdas de tiamina em dietas esterilizadas por vapor podem ser ou mesmo exceder 80%, recomendando-se determinações da vitamina e fortificação das dietas com tiamina. (BAKER, 1979).

- Vitamina B₆

O requerimento mínimo de ratos para crescimento e reprodução é de 5 mg/kg de dieta, e para manutenção da atividade normal de transaminase é de aproximadamente 7 mg/kg. A concentração de 1 mg/kg de dieta é indicada como adequada para

camundongos.

Animais deficientes têm o sistema nervoso danificado, apresentando convulsões e hiperexcitabilidade. Há produção deficiente de insulina e influência na atividade de diversos outros hormônios, lesões na pele, anemia microcítica e falhas reprodutivas.

- Vitamina B₁₂ (cianocobalamina)

O conteúdo dietário de 0,05 mg/kg de dieta é adequado para ratos. Concentrações menores podem ser adequadas em dietas contendo proteínas de origem animal, mas não em dietas que contêm somente proteínas vegetais. Os camundongos requerem a vitamina para crescimento, lactação e reprodução, e o requerimento estabelecido é baseado na menor concentração de dietas satisfatórias: 0,01 mg/kg de dieta.

Em ratos, a deficiência isolada de vitamina B₁₂ é de difícil produção. Os sinais de deficiência envolvem principalmente falhas reprodutivas, produzindo anormalidades nos recém-nascidos. Camundongos jovens deficientes demonstram crescimento retardado e atrofia renal, com possível morte.

2.2 Dietas

As dietas para roedores têm apresentado melhora no decorrer do tempo; atualmente, uma variedade de fórmulas e tipos dietários são rapidamente disponíveis para várias espécies de roedores.

As dietas utilizadas interferem na resposta dos animais

de laboratório nos diversos experimentos, pois os constituintes dietários influenciam numerosos processos bioquímicos e fisiológicos (KNAPKA, 1987; RAO, 1987).

Além das considerações nutricionais, outros aspectos afetam a qualidade e a aceitabilidade das dietas oferecidas aos animais, com efeitos sob o desempenho dos mesmos; o tipo de dieta, sua palatabilidade, procedimentos relacionados ao preparo e estocagem da dieta e a concentração de contaminantes devem ser considerados.

2.2.1 Tipos de dietas

As dietas para animais de laboratório são classificadas de acordo com o grau de refinamento de seus ingredientes. Assim o NRC (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1978) tem identificado três tipos: dietas de ingredientes naturais, dietas purificadas e dietas quimicamente definidas.

- Dietas de ingredientes naturais

São formuladas com grãos integrais processados (trigo, arroz, milho, aveia) e outros produtos parcialmente refinados (farinha de peixe, farinha de carne, farinha de soja, farelos de cereais). As vitaminas e minerais são adicionados na forma de pré-misturas, fornecendo as quantidades adequadas desses nutrientes.

Estas dietas são as mais utilizadas, sendo rapidamente disponíveis e econômicas, apresentando boa palatabilidade para a maioria das espécies de animais de laboratório. Entretanto, o seu

uso está associado a algumas desvantagens: a falta de controle e grande variação na concentração de ingredientes e ocorrência de contaminantes indesejáveis, tais como resíduos de pesticidas, metais pesados, antibióticos ou hormônios e contaminantes biológicos, que podem alterar a resposta do animal a um tratamento experimental.

As dietas de ingredientes naturais provenientes de indústrias de rações bem estabelecidas, geralmente contêm quantidades adequadas de nutrientes essenciais conhecidos, propiciando crescimento, reprodução e manutenção normais. As inadequações podem surgir devido a estocagem imprópria (períodos excessivamente longos/altas temperaturas) ou devido à presença de contaminantes indesejáveis (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1978; NEWBERNE & FOX, 1980).

Baseado no conhecimento da composição quantitativa de ingredientes, as dietas de ingredientes naturais podem ser classificadas em dietas de fórmula aberta e dietas de fórmula fechada.

As dietas de fórmula aberta revelam a quantidade de cada ingrediente, juntamente com a garantia de concentrações mínimas e/ou máximas aceitáveis para a composição de nutrientes dos ingredientes, apresentando formulação constante e o compromisso do fabricante de oferecê-las de acordo com as especificações. A composição de ingredientes das dietas de fórmula fechada é mantida em segredo pela indústria, que fabrica e comercializa a dieta sob uma marca registrada. As especificações incluem uma lista de ingredientes que podem ser usados na formulação, juntamente com a garantia da composição de

nutrientes da dieta.

A maioria das colônias de animais de laboratório é mantida em rações comerciais de fórmulas fechadas, as quais propiciam crescimento e reprodução adequados. Entretanto, o uso de rações de fórmula aberta é recomendado, a fim de minimizar a variabilidade na resposta que pode ser introduzida quando os ingredientes ou suas proporções são alterados, o que passa despercebido em dietas de fórmula fechada (KNAPKA *et alii*, 1974; AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION, 1977; NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1979).

- Dietas purificadas

As dietas purificadas ou semi-purificadas são compostas basicamente por ingredientes refinados, isto é, lipídios, carboidratos e proteínas refinados comercialmente; sais inorgânicos e vitaminas quimicamente puros são adicionados.

A capacidade de reprodução das concentrações de nutrientes ou de alteração para a indução de deficiências ou excessos nutricionais e o baixo potencial de contaminação química representam vantagens na utilização dessas dietas. Entretanto, a sua produção é cara e não são rapidamente consumidas por todas as espécies.

- Dietas quimicamente definidas

Estas dietas são formuladas com compostos quimicamente puros, tais como aminoácidos, açúcares, triglicerídeos, ácidos graxos essenciais, sais inorgânicos e vitaminas, sendo úteis em estudos que requerem um rígido controle das concentrações de

nutrientes; permitem a identificação de todos os nutrientes e um controle de qualidade exato. Entretanto, sua produção é cara e permite a modificação da disponibilidade dos nutrientes por oxidação ou interações químicas.

A lista recomendada de termos e definições para caracterização das dietas de animais de laboratório tem sido amplamente difundida na literatura referente a animais de laboratório (AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION, 1977; NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1977; BAKER, LINDSEY & WEISBROTH, 1979; ROGERS, 1979; NEWBERNE & FOX, 1980; KNAPKA, 1987; RAO, 1987).

A escolha de um tipo de dieta depende dos objetivos experimentais a serem atingidos, apresentando influência na qualidade e interpretação dos dados experimentais. Além disso, outros fatores como disponibilidade, custo, palatabilidade para a espécie envolvida, devem ser considerados. É importante salientar a ausência de uma fórmula dietária padrão satisfatória para todos os experimentos, isto é, não existe dieta ótima para todos os animais de laboratório e que sirva a todos os experimentos (KNAPKA, 1987).

As dietas mais utilizadas nas colônias de animais experimentais são também utilizadas nas colônias de produção. Geralmente, são as mais rapidamente disponíveis e apresentam excessos nutricionais. Entretanto, apesar de resultarem em desempenho aceitável, podem ser impróprias para determinadas pesquisas. Além disso, a alimentação "ad libitum" dos animais com dietas padrões comercialmente formuladas durante grande período de suas vidas pode conduzir a obesidade e longevidade reduzida

(ANVER & COHEN, 1979; KNAPKA, 1987).

WISE (1981) estudou a composição de nutrientes de diversas dietas para ratos e camundongos utilizadas em diversos países, comparativamente aos requerimentos do NRC e encontrou grande variabilidade na composição das diversas dietas, quase sempre em excesso considerável aos requerimentos propostos, concluindo que há ausência de padrão internacional para "dietas estoques", o que dificulta comparações entre experimentos de diferentes laboratórios.

Assim, a escolha de uma dieta adequada é importante, devendo-se escolher aquela que proporcione nutrição adequada, com ingredientes que não influenciem parâmetros medidos e que não variem de batelada para batelada, o que seria conseguido, efetivamente, com o uso de dietas purificadas (COATES, 1987).

2.2.2 Formulação e preparo de dietas

O objetivo da formulação de dietas é determinar as proporções dos vários ingredientes e níveis de vitaminas e minerais a serem suplementados, o que produzirá uma dieta contendo as concentrações requeridas de nutrientes essenciais. Assim, é necessário o conhecimento dos requerimentos nutricionais das espécies de interesse (COATES, 1976; KNAPKA & MORIN, 1979). A formulação deve também levar em consideração fatores que influenciam a estabilidade e o consumo da dieta (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1978; KNAPKA, 1987).

A formulação de dietas de ingredientes naturais é complexa, desde que os diversos ingredientes podem contribuir com

diversas classes de nutrientes. Vários fatores devem ser levados em consideração na escolha dos ingredientes: concentração dos diversos nutrientes, disponibilidade no mercado, palatabilidade para a espécie envolvida, custo, variação das concentrações de nutrientes e potencial para a contaminação química e biológica (KNAPKA, 1987).

Vários materiais adequados são disponíveis para a formulação das dietas de ingredientes naturais, de acordo com CLARKE *et alii* (1977).

Em geral, a qualidade da dieta aumenta com o número de ingredientes utilizados na sua formulação, devido à minimização do efeito que a variação na composição de nutrientes de um dado ingrediente exerce sobre as concentrações dietárias totais de nutrientes; além disso, as dietas podem apresentar melhor palatabilidade e possibilitar uma maior probabilidade de que os elementos-traços sejam supridos em quantidades adequadas (KNAPKA *et alii*, 1974; NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1978). Os detalhes e os passos envolvidos na formulação de dietas de ingredientes naturais estão descritos em KNAPKA & MORIN (1979).

O processo de formulação de dietas purificadas é menos complexo. Informações detalhadas na formulação destas dietas são descritas pelo Instituto Americano de Nutrição (AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION, 1977).

As dietas para animais de laboratório podem ser obtidas na forma de farelo ("meal"), ou como dietas enfiadas, extrusadas, gelificadas, líquidas ou peletizadas. As dietas para roedores geralmente são peletizadas (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1977, 1978).

Pesquisadores têm sugerido que a peletização melhora o crescimento dos animais por aumentar o consumo das dietas e/ou por alterar a química dos nutrientes dietários, tornando-os mais disponíveis para as enzimas digestivas dos animais (ZATARI & SELL, 1990).

2.2.3 Dietas recomendadas

O reconhecimento da importância das dietas na qualidade dos resultados obtidos em experimentos com animais tem conduzido a esforços, nos últimos anos, no sentido de padronizar o processo de seleção, utilização e comunicação sobre dietas experimentais. Regras específicas para a descrição de dietas utilizadas em experimentos com animais são apresentadas pelo AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION (1984).

2.2.3.1 NIH-07

A dieta NIH-07 é uma dieta de ingredientes naturais, de fórmula aberta, sendo recomendada pelo AIN (American Institute of Nutrition) como dieta padrão-referência (AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION, 1977). Sua fórmula foi desenvolvida pelo NIH (National Institute of Health) em 1972 (KNAPKA *et alii*, 1974), sendo adequada para reprodução, lactação e manutenção de ratos e camundongos. Esta dieta é a mais utilizada para estas espécies mantidas em ambiente convencional nesta instituição.

2.2.3.2 AIN-76

A dieta AIN-76 é uma dieta purificada para ratos e camundongos, desenvolvida e testada pelo AIN (AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION, 1977), sendo recomendada como dieta de referência. Objetiva o crescimento e manutenção durante o primeiro ano de vida, sendo também adequada para reprodução e lactação.

No desenvolvimento de sua fórmula, várias considerações foram feitas:

- as quantidades de vitaminas e minerais na dieta não deveriam apresentar grandes excessos em relação aos requerimentos do NRC (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1972).
- no geral, os valores para minerais se aproximaram bem dos requerimentos. O requerimento para potássio (0,18%) foi considerado inadequado para crescimento. Assim, esse elemento foi adicionado em quantidades maiores (duas vezes o requerimento NRC). O requerimento NRC de 1978 (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1978) considerou esta observação, estabelecendo um requerimento de 0,36% para potássio. O sódio foi adicionado em quantidades de duas vezes o requerimento, e o zinco, 2,5 vezes. Todos os elementos-traços requeridos por ratos e camundongos mantidos sob condições convencionais foram adicionados na mistura mineral. Para vitaminas, as relações são variáveis.

A fórmula da dieta AIN-76 é mostrada nas tabelas 5, 6 e 7 (p. 72) e as concentrações dietárias de minerais e vitaminas comparadas aos requerimentos do NRC (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1972, 1978), nas tabelas 8 e 9 (p. 72 e 73).

Apesar da sua adequação nutricional, o uso da dieta AIN-76 pode provocar efeitos adversos.

O alto conteúdo de sacarose (50%) pode ter efeito cariogênico e provocar, em algumas linhagens de ratos, o desenvolvimento de lesões renais após períodos prolongados (AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION, 1977).

A ocorrência de hemorragias em ratos alimentados com a dieta AIN-76 ou com formas modificadas desta dieta foi relatada. A suplementação da dieta com vitamina K (10 vezes o conteúdo da dieta) interrompeu as hemorragias, sugerindo que a dieta AIN-76 deveria ser modificada para incorporar quantidades adicionais de vitamina K e que certas modificações ou adições na dieta podem causar deficiências desta vitamina (ROEBUCK, 1979; BIERI, 1979). Em dietas não modificadas, BIERI (1979) sugere que estes efeitos sejam devidos a efeitos ambientais desconhecidos na flora intestinal, a uma linhagem de rato com requerimentos da vitamina maiores ou talvez a mudanças deteriorativas na dieta.

A ocorrência de nefrocalcinose em fêmeas Sprague-Dawley alimentadas com AIN-76 foi relatada (NGUYEN, 1982). Lipidoses periportais foram observadas em fígados de ratos alimentados com a dieta AIN-76 e sua forma modificada AIN-76A (conteúdo de vitamina K de 10 vezes ao original). Em dietas onde ocorreu a substituição da sacarose por amido, estas lesões não foram observadas (HAMM, RAYNOR & CAVISTON, 1982).

O AIN publicou um segundo artigo sobre a dieta AIN-76 (AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION, 1980), ressaltando que os problemas têm ocorrido principalmente pela modificação da dieta ou por estocagem imprópria da mesma, já que problemas de rancidez

têm sido observados em condições não refrigeradas de estocagem.

Assim, foram feitas as seguintes recomendações com respeito à dieta AIN-76:

- a quantidade de vitamina K deve ser aumentada dez vezes (500 ug/kg de dieta), devendo-se utilizar uma forma estabilizada da vitamina :complexo bissulfito de sódio menadiona (MSBC) ou bissulfito dimetilpirimidinol menadiona (MPB). A dieta assim modificada foi designada AIN-76A.

- um antioxidante deve ser adicionado ao óleo de milho, considerando que os óleos mais populares não possuem antioxidante adicionado e que os tocoferóis endógenos não são muito efetivos em estabilizar o óleo quando adicionado em dietas purificadas.

- o conteúdo de sacarose pode ser modificado, quando seus efeitos metabólicos prejudicam o experimento, sugerindo as seguintes alternativas: substituir sacarose por glucose, substituir pelo menos metade da sacarose por glucose, usar apenas amido ou usar proporções variáveis de glucose, sacarose e amido, dependendo da natureza do estudo em questão.

A necessidade de atualização ou reformulação da dieta AIN-76 tem sido revista. Assim, em 1989, foi realizado um seminário da AIN-76, a fim de se decidir sobre possíveis mudanças a serem feitas na formulação da dieta AIN-76 (REEVES, 1989); recomendações preliminares incluem:

- manutenção do nível e qualidade protéicos (20% de caseína) e metionina (0,3%).

- diminuição do teor de sacarose para menor ou igual a 10% das calorias, o restante de carboidrato sendo suprido por amido, que pode ser substituído parcialmente por dextrina para peletização

eficiente.

- os lipídios devem representar um teor mínimo de 10% (por peso), com conteúdo balanceado de ácidos graxos.
- manutenção do teor de fibras, com padronização da fonte de celulose.
- aumento do nível de vitamina E na dieta em 50%, se a fonte de lipídios for aumentada para 10%
- manutenção dos níveis das vitaminas hidrossolúveis.
- redução do conteúdo de fosfato de cálcio dibásico de 500 para 400 g/kg de mistura salina ou adição de 357 g de CaCO_3 /kg de mistura mineral e 402 g de KH_2PO_4 /kg de mistura mineral, eliminando a fonte de sulfato na formulação, fornecendo potássio na forma de fosfato de potássio, como alternativas para solução dos problemas de nefrocalcinose advindos do uso da dieta AIN-76.
- redução do nível de manganês de 54 para 10 mg/kg de dieta.
- substituição da fonte de selênio: selenito para selenato.

2.2.3.3 AIN-90

A dieta AIN-90 é uma dieta purificada para ratos e camundongos, representando uma proposta de modificação da dieta AIN-76 (KNAPKA, 1990*).

A fórmula da dieta AIN-90 é mostrada nas tabelas 10, 11 e 12 (p. 73), estabelecendo-se nas tabelas 10 e 11 (p. 73), comparações com a fórmula da dieta AIN-76.

*KNAPKA, 1990. Comunicação verbal. Nutrition Course. First World Congress on Laboratory Animal Science/II Congresso Brasileiro de Animais de Laboratório, Caxambu-MG, 1990.

As principais modificações propostas na dieta AIN-76, para obtenção da dieta AIN-90 são indicadas pelas tabelas 10 e 11 (p. 73): redução do conteúdo de metionina (de 0,3% para 0,15% da dieta), redução do conteúdo de sacarose (de 50% para 10% da dieta), com conseqüente aumento do teor de amido, aumento do teor de óleo de milho (de 5% para 10% da dieta) e finalmente, a introdução de uma mistura de elementos-traços (tabela 12, p. 73); na mistura vitamínica (tabela 11, p. 73), observa-se um aumento de 50% do conteúdo de vitamina E (5.000 UI para 7.500 UI), devido ao aumento do conteúdo de lipídios da dieta.

2.2.3.4 NIH-42

A dieta NIH-42 é uma dieta de ingredientes naturais de fórmula aberta, para ratos e camundongos, formulada pelo NIH para estudos toxicológicos, sendo composta predominantemente por ingredientes de origem vegetal (KNAPKA, 1990*). A fórmula da dieta é mostrada nas tabelas 13, 14 e 15 (p. 74), e as concentrações calculadas de nutrientes, na tabela 16 (p. 75).

2.2.3.5 NIH-autoclavável

Esta dieta é utilizada pelo NIH em colônias de ratos e camundongos "germ-free" e gnotobióticos mantidos em isoladores, assim como em colônias de ratos e camundongos mantidos em ambiente SPF. É uma dieta de ingredientes naturais, de fórmula aberta (KNAPKA, 1990, idem rodapé p. 54).

Sua formulação é apresentada nas tabelas 17, 18 e 19

(p. 75 e 76) e as concentrações calculadas de nutrientes são apresentadas na tabela 20 (p. 76).

Finalizando o sub-item "Diets recomendadas" é necessário admitir que outras dietas poderão ser empregadas desde que se proceda a verificação da adequação nutricional das mesmas. Uma aproximação possível é a verificação do ganho de peso periódico de animais em crescimento. Uma boa dieta deve promover uma taxa de ganho aceitável, comparável às taxas esperadas de crescimento de animais de laboratório (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1978, 1979): durante as três primeiras semanas pós-desmame, linhagens de crescimento rápido (ex. Sprague Dawley) deveriam ganhar pelo menos 6 g/dia, enquanto que aquelas de crescimento mais lento (ex. Wistar) deveriam ganhar 5g/dia, em situações de adequação nutricional. A adequação de uma dieta purificada deve ser verificada comparativamente a uma dieta de ingredientes naturais que, neste caso, servirá como controle, e os animais alimentados com a dieta purificada deverão ter ganho de peso similar ao dos animais alimentados com a dieta de ingredientes naturais.

2.2.4 Qualidade nutricional

As vitaminas, em geral, são os nutrientes mais lábeis, sendo susceptíveis à destruição por outros ingredientes da dieta ou pela exposição a fatores externos (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1979).

A autoclavagem de dietas peletizadas pode causar a destruição de aproximadamente 40% da vitamina A; a vitamina E na dieta pode ser facilmente destruída pela presença de gorduras rancificadas ou de certos metais; perdas de 80% de tiamina podem ser resultantes da esterilização de dietas (BAKER, 1979). A riboflavina, o ácido fólico e a vitamina B₁₂ são os ingredientes mais fotolábeis das dietas (CLARKE *et alii*, 1977; NEWBERNE & FOX, 1980.).

Há diversas variáveis associadas com o controle de mudanças nutricionais que ocorrem durante a estocagem. Fatores que contribuem para perdas incluem conteúdo de umidade, temperatura, exposição ao oxigênio, pH e tempo de estocagem.

A estocagem das dietas deve ser feita em área apropriada, preferencialmente com temperatura controlada ao redor de 15 °C, adequadamente ventilada, com baixa umidade. Muitos ingredientes das dietas se deterioram durante a estocagem devido a mudanças oxidativas ou hidrolíticas e devido à ação de enzimas presentes nos mesmos. Além disso, há consenso geral de que a atividade microbiana aumentada em rações pode afetar a composição química e o valor nutritivo (BLÁHA *et alii*, 1990). Assim, o mínimo tempo possível deve ser levado entre a manufatura e o consumo das dietas (CLARKE *et alii*, 1977; NEWBERNE & FOX, 1980; CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE, 1984).

As recomendações para dietas de animais geralmente sugerem que as dietas de ingredientes naturais não sejam estocadas por períodos superiores a 90 dias e preferencialmente sejam utilizadas dentro de um mês a partir da data da manufatura (CLARKE *et alii*, 1977; NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1977; NEWBERNE

& FOX, 1980; CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE, 1984; OLLER, GREENMAN & SUBER, 1985).

Entretanto, OLLER *et alii* (1985) estudaram o efeito de estocagens prolongadas sobre a qualidade nutricional de uma dieta comercial autoclavável após autoclavagem (135°C/3 minutos) e encontraram manutenção da qualidade nutricional da dieta em estocagem ($18,5 \pm 2$ °C/ UR=50 $\pm$ 5%) de até 130 dias após autoclavagem, sem efeitos deletérios aparentes sobre os animais alimentados com a dieta; a qualidade microbiológica da dieta também foi mantida, fato evidenciado pela não detecção de bolores e leveduras em amostras estocadas e de bactérias patógenas nas amostras de sobras de ração obtidas nas gaiolas dos animais. Contudo, os autores salientaram que condições de manuseio e estocagem diferentes das utilizadas no trabalho podem resultar em rápida deterioração da qualidade dietária, merecendo avaliações específicas para possíveis conclusões a este respeito.

Dietas purificadas estocadas em áreas com temperaturas ao redor de 15 °C devem ser utilizadas dentro de 40 dias a partir da data da manufatura (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1978). Entretanto, a vida de prateleira destas dietas pode ser aumentada em estocagem sob condições de temperaturas mais baixas.

FULLERTON, GREENMAN & KENDALL (1982) estudaram os efeitos de várias condições de estocagem sobre a vida de prateleira da dieta semi-purificada AIN-76, estabelecendo como parâmetros: níveis de vitamina A e tiamina, índice de peróxido (rancidez de lipídios) e contagem de bactérias e bolores totais. Os resultados obtidos confirmaram a recomendação de que esta dieta pode ser estocada a 4° C ou a temperaturas menores, por um

período de até 4 meses (AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION, 1977), desde que nenhum dos parâmetros testados alcançou níveis inaceitáveis em nenhuma das amostras estocadas a 4° C ou a temperaturas inferiores durante 168 dias.

O processamento de dietas pode causar deterioração da qualidade nutricional pela aplicação de tratamentos como exposição à luz, ao ar, ao calor, fumigação e radiação.

Os nutrientes mais fotolábeis são a riboflavina, o ácido fólico e a vitamina B12. Mudanças oxidativas podem ocorrer nos componentes dietários durante mistura vigorosa ou na secagem em corrente de ar: a vitamina A é particularmente sensível à oxidação.

A aplicação de calor, seco ou por vapor, para esterilização, pasteurização ou peletização, resulta em destruição de alguns nutrientes, favorecendo mudanças químicas, produzindo perda ou disponibilidade de nutrientes, com possível formação de produtos tóxicos e/ou antinutrientes. O grau de deterioração da qualidade nutricional é, em geral, proporcional à temperatura e ao tempo de exposição, acima de uma temperatura crítica (BENDER, 1972).

O calor também afeta adversamente a natureza física da dieta causando endurecimento excessivo, aglutinação ou desintegração dos pelets. A fim de evitar que os pelets se desmanchem durante o processo, os ingredientes devem ser adequadamente selecionados e os pelets devem ser envoltos em silicone e autoclavados em bandejas de pouca profundidade (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1977; NEWBERNE & FOX, 1980; MENENDEZ, 1985). De acordo com MAERKI, ROSSBACH & LEUENBERGER (1989), o

pré-aquecimento (85 °C/aproximadamente 12 horas) de dietas a serem autoclavadas resulta em melhora na consistência dos pelets, favorecendo o manuseio das dietas esterilizadas para animais de laboratório.

A temperatura de 80 °C obtida em alguns processos de peletização e na pasteurização resulta em mínimo efeito desestabilizante na qualidade nutritiva (NEWBERNE & FOX, 1980; CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE, 1984), o que pode gerar efeitos positivos, já que as alterações químicas dos nutrientes dietários pode torná-los mais disponíveis para as enzimas digestivas do animal (ZATARI & SELL, 1990). Entretanto, vitaminas e aminoácidos termolábeis podem ser destruídos a temperaturas superiores. FOSTER, BLACK & PFAU (1964) utilizaram temperatura de 107,2 °C por 15 minutos para pasteurização de dieta peletizada e obtiveram resultados que indicaram alguma destruição de tiamina e vitamina A, com extensão menor para ácido pantotênico e vitamina E, sugerindo uma pré-fortificação com estas vitaminas, a fim de manter os níveis requeridos após pasteurização.

O aumento do número de animais "germ-free", gnotobióticos e SPF utilizados em pesquisas tem propiciado considerações mais interessadas sobre técnicas de esterilização de dietas. Vários métodos existem, e a escolha de um ou outro está sob a dependência de vários fatores, incluindo-se o efeito sobre o valor nutritivo.

Os estudos dos efeitos dos métodos têm revelado redução na qualidade de dietas esterilizadas por autoclavagem, redução nos aminoácidos totais e pequeno efeito da gama-irradiação sobre a qualidade protéica e redução da disponibilidade de aminoácidos

em dietas expostas ao Óxido de etileno (FORD, 1976). O autor estudou os efeitos dos métodos de esterilização sobre o valor nutritivo da proteína em uma dieta comercial para ratos. A autoclavagem (121 °C/60 minutos; 134 °C/3 minutos) causou redução na qualidade protéica, demonstrada pela redução do valor biológico, NPU (Net Protein Utilization) e digestibilidade e redução da disponibilidade dos aminoácidos, com efeitos maiores resultantes do tratamento a 121 °C/60 minutos. A irradiação (2,5 Mrad; 10,0 Mrad) apresentou pequeno efeito na qualidade da proteína da dieta, enquanto que a exposição ao óxido de etileno causou redução significativa na disponibilidade da histidina, metionina e triptofano.

Vários pares temperatura/tempo podem ser utilizados para a esterilização de dietas autoclaváveis. O tempo requerido para obtenção da esterilidade pode ser reduzido através do uso de temperaturas mais altas, possibilitando a redução das perdas de vitaminas (WILLIAMS *et alii*, 1968) e da qualidade protéica (FORD, 1976).

A perda da qualidade protéica pode ser atribuída à destruição dos aminoácidos por oxidação, à modificação da proteína devido à formação de pontes entre seus aminoácidos, retardando a liberação dos mesmos durante a digestão e à formação de ligações entre os aminoácidos e outros componentes da dieta, tornando a proteína resistente à digestão (BENDER, 1972; CLARKE *et alii*, 1977).

Reações do tipo "Maillard" entre proteínas e carboidratos causam deterioração do alimento durante estocagem e processamento, e a perda da qualidade nutricional é atribuída à

destruição de aminoácidos essenciais e a um decréscimo na digestibilidade (FRIEDMAN, GUMBEMANN & ZIDERMAN, 1987).

Um dos aminoácidos mais rapidamente injuriados é a lisina: durante aquecimento seu grupo epsilon-amino sofre reação de Maillard, tornando o aminoácido quimicamente ligado e nutricionalmente indisponível (COATES, 1976; KRATZER *et alii*, 1990).

Portanto, a qualidade protéica pode se deteriorar durante más condições de estocagem ou como resultado de processamentos da dieta, sendo altamente desejável e recomendável a avaliação da qualidade nutricional das dietas a serem oferecidas aos animais (COATES, 1976; CLARKE *et alii*, 1977).

Vários métodos têm sido estabelecidos para a avaliação da qualidade protéica dos alimentos. Estes métodos têm sido revistos por diferentes pesquisadores (ALLISON, 1949; EVANS & WITTY, 1978; PELLETT, 1978; SARWAR & McDONOUGH, 1990).

Os métodos químicos permitem a avaliação inicial do valor protéico do alimento, através da determinação do conteúdo de proteína (geralmente determinada como "proteína bruta", a partir do conteúdo de nitrogênio total), da composição e do ~~escore de aminoácidos~~, sendo de fácil execução e permitindo a identificação do aminoácido limitante (escore químico).

Entretanto, o uso destes métodos não é suficiente para determinar a qualidade protéica, apresentando diversas limitações (PELLETT, 1978; SELIGSON & MACKEY, 1984):

- não distinção do nitrogênio protéico e do nitrogênio não protéico na determinação do nitrogênio total;
- problemas associados com a análise dos aminoácidos: o

procedimento de hidrólise pode influenciar o perfil de aminoácidos, desde que alguns aminoácidos podem ser destruídos, enquanto que outros podem ser liberados mais lentamente; além disso, diferentes procedimentos analíticos podem resultar em diferentes predições da qualidade protéica;

- não consideração da digestibilidade e disponibilidade de aminoácidos, introduzindo erros, pois alguns aminoácidos podem estar presentes em formas não susceptíveis à hidrólise durante a digestão *in vivo*, sendo biologicamente indisponíveis;
- não consideração da presença de fatores antinutricionais e da existência de desbalanços de aminoácidos, que podem afetar a qualidade protéica;
- problemas associados à escolha do padrão de referência para o perfil de aminoácidos, desde que a utilização de padrões diferentes pode conduzir a resultados variáveis sobre a qualidade de determinada proteína.

Procedimentos microbiológicos podem ser utilizados para determinação da concentração e disponibilidade de diversos nutrientes, sendo particularmente aplicados a vitaminas e aminoácidos. Os microorganismos podem ser empregados na determinação de aminoácidos individuais em hidrolisados protéicos ou para determinação direta de proteínas intactas, através da utilização de suas enzimas proteolíticas. Muitos organismos têm sido utilizados: *Streptococcus zymogenes*, *Tetrahymena pyriformis*, *Streptococcus faecalis*, *Leuconostoc mesenteroides* (EVANS & WITTY, 1978; PELLETT & YOUNG, 1980). Vantagens advindas do uso de métodos microbiológicos em relação aos biológicos referem-se principalmente à utilização de períodos experimentais menores.

Entretanto, deve-se considerar que dificilmente um microorganismo apresentará requerimentos e capacidade de utilização metabólica de um determinado nutriente iguais aos dos animais de interesse.

As técnicas para avaliação biológica das proteínas foram desenvolvidas nos primeiros anos do século, sendo baseadas no balanço de nitrogênio (MITCHELL, 1923-1924) e no crescimento (OSBORNE, MENDEL & FERRY, 1919).

O PER (Protein Efficiency Ratio) foi introduzido por OSBORNE *et alii* (1919), indicando numericamente o valor promotor de crescimento de uma proteína, sendo definido como o ganho de peso dividido pelo peso de proteína consumida. Assim, este método assume que o ganho de peso é indicativo da deposição de proteína nos tecidos (TEMLER, DORMOND & FINOT, 1983). É o método oficial de avaliação da qualidade protéica nos Estados Unidos e Canadá, sendo descrito no AOAC. Os procedimentos padronizados requerem que os ratos desmamados (21-28 dias) sejam alimentados com uma dieta contendo 10% de proteína por um período teste de 4 semanas, e que os resultados sejam expressos relativamente à dieta controle de caseína (AOAC, 1980). Entretanto, as indústrias têm padronizado condições diferentes, a fim de atender a ampla faixa de alimentos a serem considerados (BURNETTE & RUSOFF, 1978; HACKLER, 1978; STAUB, 1978).

Os valores de PER são afetados pela idade e pela linhagem do animal, pela duração do experimento e pelos diversos nutrientes dietários, sendo de maior influência o nível de proteína da dieta (McLAUGHLAN, 1974; HURT, FORSYTHE & KRIEGER, 1976; SARWAR, PEACE & BOTTING, 1989).

A maior crítica ao PER é a não consideração da proteína

utilizada para manutenção (SARWAR & McDONOUGH, 1990). Assim, uma proteína com PER próximo de zero pode ser inferior para crescimento, mas adequada para manutenção. A fim de superar esta deficiência, BENDER & DOELL (1957) desenvolveram um método, o NPR (Net Protein Ratio), o qual credita a proteína utilizada para manutenção, assumindo que a proteína requerida para evitar perda de peso de ratos alimentados com dieta aprotéica é equivalente à proteína requerida para manutenção, permitindo então a avaliação de proteínas pobres que não propiciam crescimento.

Assim, diversos pesquisadores têm sugerido a substituição do PER por outros métodos mais adequados, como método oficial de avaliação da qualidade protéica (JANSEN, 1978; SARWAR & McDONOUGH, 1990).

2.2.5 Qualidade microbiológica

As dietas de ingredientes naturais contêm altas concentrações de microorganismos. Os materiais crus que são utilizados na formulação de dietas freqüentemente apresentam alta contagem bacteriana (10^6 - 10^7 microorganismos/grama), adquirida durante colheita, manuseio e processamento (CLARKE *et alii*, 1977; NEWBERNE & FOX, 1980). Os produtos de origem animal (farinha de carne, farinha de peixe, farinha de osso) representam a maior fonte de bactérias patogênicas nas rações animais (KNAPKA *et alii*, 1974; CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE, 1984). Os cereais, quando cultivados, armazenados e manuseados em condições favoráveis à proliferação do fungo *Aspergillus flavus* podem estar contaminadas com Aflatoxina B₁, um potente agente carcinogênico

produzido por este microorganismo (LÁPA *et alii*, 1988). Os alimentos frescos representam uma fonte potencial de contaminação biológica e devem ser evitados como suplementos à dieta básica (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1977). Ingredientes submetidos a tratamento térmico durante preparo (farinhas, farelos, leite desidratado) geralmente apresentam contagem bacteriana baixa. Assim, a qualidade dos ingredientes utilizados é de vital importância na determinação da qualidade da dieta (COATES, 1976; CLARKE *et alii*, 1977).

Idealmente, os animais de laboratório deveriam ser alimentados com dietas estéreis, isto é, livres de toda contaminação microbiana. Entretanto, o custo de tal procedimento limita o uso destas dietas a animais com características mais específicas. Assim, as dietas fornecidas a animais gnotobióticos devem ser estéreis, e o uso das mesmas é também recomendado para animais SPF (COATES, 1976; CLARKE *et alii*, 1977; NEWBERNE & FOX, 1980). Os animais convencionais exigem ausência de parasitas e patógenos, e o uso de dietas estéreis, embora desejável, não é indispensável. A qualidade microbiológica exigida por estes animais pode ser obtida por processos relativamente simples, como por exemplo, a aplicação de vapor durante peletização.

Várias condições de aplicação de calor têm sido descritas. FORD (1976) estudou o efeito de várias condições de temperatura/tempo (121 °C:60 minutos/30 minutos/15 minutos; 115°C: 60 minutos/30 minutos/15 minutos; 134 °C/3 minutos) sobre organismos aeróbicos, anaeróbicos e leveduras e obteve organismos viáveis somente em amostras de dietas não tratadas e tratadas a 115 °C por 15 minutos.

WILLIAMS et alii (1968) utilizaram um ciclo de autoclavagem de 18-20 minutos, com uma fase de alta temperatura (135 °C) por três minutos, alcançando esterilidade completa, baseada na esterilidade de culturas de *Bacillus stearothermophilus* e *Bacillus subtilis*. Esses microorganismos foram inoculados nos pelets de ração, anteriormente à autoclavagem, nas formas vegetativa e esporulada. A análise de amostras de ração não autoclavada indicou a contaminação com *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Alcaligenes faecalis*, *Streptococcus faecalis* e um organismo coliforme não identificado.

FOSTER et alii (1964) demonstraram a ausência de organismos vegetativos (*Serratia marcescens*/*Bacillus subtilis*), após um processo de pasteurização de 68 minutos, mantendo a temperatura mais alta (107,2 °C) por 15 minutos. Esporos de *Bacillus subtilis* foram incluídos nos testes, apresentando após o tratamento apenas crescimento ocasional, o que demonstrou o efeito letal do tratamento sobre estas formas, indicando que níveis de pasteurização superiores ao esperado foram obtidos.

Durante a peletização de dietas, o efeito combinado de vapor e pressão provoca o aumento da temperatura na matriz para cerca de 75-80 °C, causando uma redução de aproximadamente 1000 vezes na contagem bacteriana total (NEWBERNE & FOX, 1980). Assim, a utilização de dietas peletizadas é mais recomendável, quando comparada à utilização de dietas fareladas, permitindo maior grau de segurança.

Não há entretanto método prescrito para assegurar a esterilidade de ingredientes e dietas ou excluir a possibilidade de contaminação durante a manufatura, sendo portanto necessária,

a avaliação microbiológica da ração (KNAPKA *et alii*, 1974; NEWBERNE & FOX, 1980).

Padrões microbiológicos foram publicados para dietas de ingredientes naturais não esterilizadas, estabelecendo procedimentos de amostragem e de análises microbiológicas e tipos e níveis aceitáveis de microorganismos (CLARKE *et alii*, 1977). De acordo com estes padrões, *Salmonella* e *Escherichia coli* tipo 1 devem estar ausentes da dieta, e não mais do que 10 organismos coliformes presuntivos ou mais do que 5000 organismos tetrazólio-positivos (organismos viáveis a 37 °C) por grama de dieta podem estar presentes.

No Brasil, a legislação referente à alimentação animal é limitada e parcialmente desconhecida, e as indústrias aplicam procedimentos diversos para avaliação das rações e matérias-primas. Assim, o assunto será discutido no capítulo "Resultados e Discussões" deste trabalho.

TABELA 1. Peso corporal médio (M) e amplitude das médias (A) para 26 linhagens de camundongo, segundo POILEY (1972) *apud* NATIONAL RESEARCH COUNCIL (1978).

Idade (dias)	Fêmeas		Machos	
	M (g)	A (g)	M (g)	A (g)
21	10,2	7,5-14,8	11,0	7,7-15,8
28	14,2	9,9-18,6	15,7	11,3-20,5
42	18,6	13,1-25,8	21,0	14,4-28,7
56	21,5	15,1-28,9	24,1	16,1-30,8
112	28,1	21,1-37,6	30,2	23,2-35,7

TABELA 2. Peso corporal médio (M) e amplitude das médias (A) de ratos Sprague-Dawley e Fischer^a, segundo POILEY (1972) *apud* NATIONAL RESEARCH COUNCIL (1978).

Idade (dias)		Sprague-Dawley		Fischer	
		M (g)	A (g)	M (g)	A (g)
21	M ^b	46	50-61	—	24-39
	F ^c	44	45-63	—	22-39
28	M	75	71-114	53	28-56
	F	64	71-130	44	35-51
56	M	236	206-259	160	155-209
	F	185	188-205	123	105-156
84	M	365	317-385	256	183-238
	F	230	231-283	162	112-175

^a As médias são valores fornecidos por dois diferentes laboratórios, enquanto que as amplitudes são provenientes de apenas um laboratório, onde os pesos médios são superiores.

^b Machos.

^c Fêmeas.

TABELA 3. Requerimentos nutricionais de ratos, de acordo com NATIONAL RESEARCH COUNCIL (1978).

Nutriente	Concentração na dieta*	
	Crescimento, gestação ou lactação	Manutenção
Proteína (%)		
Proteína ideal	12,00	4,20
Caseína	13,80	4,80
Mistura de diversas fontes	15,00-20,00	7,00
Lipídios (%)	5,00	5,00
Energia digerível (kcal/kg)	3.800,00	3.800,00
L-aminoácidos (%)		
Arginina	0,80	-
Asparagina	0,40	-
Ácido glutâmico	4,00	-
Histidina	0,30	0,08
Isoleucina	0,50	0,31
Leucina	0,75	0,18
Lisina	0,70	0,11
Metionina	0,60 ^d	0,23
Fenilalanina-tirosina	0,80 ^e	0,18
Prolina	0,40	-
Treonina	0,50	0,16
Triptofano	0,15	0,05
Valina	0,60	0,23
Não essenciais ^f	0,59	0,48
Minerais		
Cálcio (%)	0,50	
Cloreto (%)	0,05	
Magnésio (%)	0,04	
Fósforo (%)	0,40	
Potássio (%)	0,36	
Sódio (%)	0,05	
Enxofre (%)	0,03	
Cromo (mg/kg)	0,30	
Cobalto (mg/kg)	5,00	
Fluoreto (mg/kg)	1,00	
Iodo (mg/kg)	0,15	
Ferro (mg/kg)	35,00	
Manganês (mg/kg)	50,00	
Selênio (mg/kg)	0,10	
Zinco (mg/kg)	12,00 ^g	

Continua...

TABELA 3. Continuação

Vitaminas	
A ^b (UI/kg)	4.000,00
D ^b (UI/kg)	1.000,00
E ^b (UI/kg)	30,00
K ¹ (mg/kg)	0,05 ¹
Colina (mg/kg)	1.000,00
Ácido fólico (mg/kg)	1,00
Niacina (mg/kg)	20,00
Pantotenato de cálcio (mg/kg)	5,00
Riboflavina (mg/kg)	2,00 ²
Tiamina (mg/kg)	4,00
Vitamina B ₆ (mg/kg)	5,00 ³
Vitamina B ₁₂ (mg/kg)	0,05

* Baseada em 90% de matéria seca.
^b Ácido linoléico: 0,6% e 0,22% para machos e fêmeas, respectivamente. Durante lactação, 0,3% é requerido pelas fêmeas.
^c Para dieta que contém 12% de proteína.
^d 1/3 a 1/2 pode ser suprido por L-cistina.
^e 1/3 a 1/2 pode ser suprido por L-tirosina.
^f Mistura de glicina, L-alanina e L-serina.
^g 18 mg/kg são requeridos quando proteína de soja é utilizada.
^h Vitamina A: 1 UI=0,300 µg de retinol, 0,344 µg de retinil acetato; 0,550 µg de retinil palmitato.
ⁱ Vitamina D: 1 UI=0,025 µg de ergocalciferol.
^j Vitamina E: 1 UI=1 mg DL-alfa-tocoferil acetato.
^k Em condições "germ-free" e em impedimento da coprofagia, os requerimentos são de 0,2 mg/kg e 0,1 mg/kg, respectivamente.
^l Para reprodução normal e gestação, recomenda-se um aumento para 3 mg/kg e 4 mg/kg, respectivamente.
^m Para crescimento e reprodução. Para manutenção da atividade normal de transaminase são requeridos 7 mg/kg.

TABELA 4. Requerimentos nutricionais estimados de camundongos, de acordo com NATIONAL RESEARCH COUNCIL (1978).

Nutriente	Requerimentos ^b
Proteína (%)	12,5 ^a
Crescimento	18,0 ^a
Reprodução	0,3 ^a
Ácido linoléico (%)	
L-aminoácidos (%)	
Arginina	0,3
Histidina	0,2
Isoleucina	0,4
Leucina	0,7
Lisina	0,4
Metionina	0,5
Fenilalanina	0,4
Treonina	0,4
Triptofano	0,1
Valina	0,5
Minerais	
Cálcio (%)	0,4
Cloro	±
Magnésio (%)	0,05 ^a
Fósforo (%)	0,4
Potássio (%)	0,2
Sódio	±
Cromo (mg/kg)	2,0
Cobre (mg/kg)	4,5
Fluoreto	h
Iodo (mg/kg)	0,25
Ferro (mg/kg)	25,0 ^a
Manganês (mg/kg)	45,00
Selênio	±
Zinco (mg/kg)	30,0

Continua...

TABELA 4. Continuação

Vitaminas	250-500
A (UI/kg)	150,0
D (UI/kg)	20,0
E (UI/kg)	3,0
K ₁ (mg/kg)	0,2
Biotina (mg/kg)	600,0
Colina (mg/kg)	0,5
Ácido fólico (mg/kg)	10,0
Niacina (mg/kg)	10,0
Pantotênato de cálcio (mg/kg)	10,0
Riboflavina (mg/kg)	4,0 ^j
Tiamina (mg/kg)	5,0
Vitamina B ₆ (mg/kg)	1,0
Vitamina B ₁₂ (mg/kg)	0,01

- ^a Adequados para crescimento e reprodução, com possíveis exceções.
- ^b Baseado nos pesos de ingredientes contendo uma média de 10% de unidade.
- ^c Caseína e aminoácidos (JOHN & BELL, 1976).
- ^d Ingredientes naturais (KNAPKA, SMITH & JUDGE, 1977).
- ^e Baseado no requerimento de ratos.
- ^f Requerido; não há dados quantitativos.
- ^g Para crescimento; pode ser baixo para reprodução.
- ^h Nível incerto; não há requerimento estabelecido.
- ⁱ Para crescimento; o menor nível testado para reprodução é de 120 mg/kg.
- ^j Para crescimento; para reprodução e lactação o nível sugerido é de 7,0 mg/kg.

TABELA 7. Mistura vitamínica AIN-76, de acordo com AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION (1977), para ser usada a 1% da dieta.

Vitamina	Quantidade por quilograma de mistura
Itamina-HCl, mg	500
Riboflavina, mg	500
Piridoxina-HCl, mg	700
Ácido nicotínico*, g	3
D-Pantotenato de cálcio, g	1.6
Ácido fólico, mg	200
D-Biotina, mg	20
Cianocobalamina (vitamina B12), mg	1
Retinil palmitato ou acetato (vitamina A)	10
DL-Alfa-tocoferil acetato (vitamina E)	2.54
Colecalciferol (vitamina D3), mg	5.0
Menquinona (vitamina K)*, mg	5.0
Sacarose, pó fino	para fazer 1.000 g

* Nicotinamida é equivalente.
 * Como pó estabilizado para prover 400.000 UI de atividade de vitamina A ou 120.000 equivalentes de retinol.
 * Como pó estabilizado para prover 5.000 UI de atividade de vitamina E.
 * 100.000 UI. Pode ser na forma de pó.
 * Menadiona.

TABELA 8. Quantidades de minerais fornecidos pela dieta AIN-76 (AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION, 1977), comparadas aos requerimentos do NRC (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1978).

Elemento	Concentração dietária (mg/kg de dieta)	Requerimentos NRC/1978
	Rato	Camundongo
Cálcio	5.200,0	5.000,0
Fósforo	4.000,0	4.000,0
Sódio	1.020,0	500,0
Potássio	3.600,0	3.600,0
Magnésio	500,0	400,0
Manganês	54,0	45,0
Ferro	35,0	35,0
Cobre	6,0	5,0
Zinco	30,0	12,0
Iodo	0,2	0,15
Selênio	0,1	0,1
Cromo	2,0	0,3
Cloreto	1.560,0	500,0
Sulfato	1.000,0	300,0

* Requerido; não há dados quantitativos.
 * Não há requerimento.

TABELA 5. Dieta purificada AIN-76* para ratos e camundongos, de acordo com AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION (1977).

Ingrediente	% da Dieta
Caseína ^b	20,0
DL-metionina	0,3
Amido de milho	15,0
Sacarose	50,0
Fibras	5,0
Óleo de milho ^c	5,0
Mistura mineral AIN ^a	3,5
Mistura vitamínica AIN	1,0
Bitartarato de colina	0,2
Total	100,0

* Quando utilizada em ambientes ultra-limpas, vários elementos traços devem ser adicionados.
^b Caseína grau-dieta tendo pelo menos 85% de proteína.
^c Fibra tipo celulose.
 * Alguns óleos comerciais contêm antioxidante (máximo 0,02%) e surfactante (dimetil silicose). Estes aditivos devem ser inscuos para a maioria dos estudos nutricionais, entretanto suas presenças devem ser observadas. É recomendado que óleo com antioxidante adicionado seja usado para evitar rancidez. A dieta deve ser estocada a 4 °C ou menos, e é recomendado que não seja conservada por mais de 4 meses.
 * O conteúdo dietário de alguns minerais presentes na caseína será levemente maior e variará de acordo com a caseína utilizada.

TABELA 6. Mistura mineral AIN-76, de acordo com AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION (1977), para ser usada a 3,5% da dieta.

Ingrediente	g/kg de mistura
Fosfato de cálcio dibásico (CaHPO ₄)	500,0
Cloreto de sódio (NaCl)	74,0
Citrato de sódio monohidratado (K ₂ CaH ₂ O ₇ .H ₂ O)	220,0
Sulfato de potássio (K ₂ SO ₄)	52,0
Óxido de magnésio (MgO)	24,0
Carbonato manganoso (43-48% Mn)	3,5
Citrato férrico (16-17% Fe)	6,0
Carbonato de zinco (70% ZnO)	1,6
Carbonato cúprico (53-55% Cu)	0,3
Iodato de potássio (KIO ₃)	0,01
Selenito de sódio (Na ₂ SeO ₃ .5H ₂ O)	0,01
Sulfato de cromo-potássio <CrK(SO ₄) ₂ .12H ₂ O>	0,55
Sacarose, em pó fino	para fazer 1.000,0

TABELA 11. Misturas vitamínicas das dietas AIN-90^a e AIN-76^b.

Vitamina	Quantidade por quilograma de mistura	
	AIN-90	AIN-76
Tiamina.HCl, mg	600	600
Riboflavina, mg	600	600
Piridoxina.HCl, mg	700	700
Ácido nicotínico, mg	3.000	3.000
D-Pantotenato de cálcio, mg	1.600	1.600
Ácido fólico, mg	200	200
D-Biotina, mg	20	20
Cianocobalamina (vitamina B ₁₂), mg	1.0	1.0
Retinil palmitato ou acetato (vitamina A), UI	400.000 ^c	400.000 ^c
DL-Alfa-tocoferil acetato (vitamina E), UI	7.500 ^d	5.000 ^e
Colecalciferol (vitamina D ₃), mg	2.5 ^f	2.5 ^g
Menaquinona (vitamina K), mg	5.0	5.0
Sacarose, para fazer	1.000 g	1.000 g

^a De acordo com KNAFKA (1990, idem rodapé p. 54).
^b De acordo com AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION (1977).
^c Ou 120.000 equivalentes de retinol.
^d UI de atividade de vitamina E.
^e 100.000 UI.

TABELA 12. Mistura de elementos ultra-traços da dieta AIN-90 e quantidades de elementos fornecidos pela dieta AIN-90, de acordo com KNAFKA (1990, idem rodapé p. 54).

Ingrediente	Quantidade (g/kg de mistura)	Elemento	Concentração dietética ^a (mg/kg de dieta)
Molibdato de amônio.H ₂ O	0,200	molibdênio	1,1
Fluoreto de sódio	0,220	flúor	1,0
Ácido bórico	0,300	boro	0,5
Vanadato de amônio	0,050	vanádio	0,2
Arseniato de sódio.7H ₂ O	0,210	arsênio	0,5
Silicato de sódio.9H ₂ O	46,500	silício	46,0
Cloreto de níquel	0,220	níquel	1,0
Cloreto estanhoso	0,160	estanho	1,0
Amido	952,140	-	-

^a Obtida pela utilização da mistura de elementos ultra-traços a 1% da dieta.

TABELA 9. Quantidades de vitaminas fornecidas pela dieta AIN-76 (AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION, 1977), comparadas aos requerimentos do NRC (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1978).

Vitamina	Concentração dietética ^a	Requerimentos NRC/1978	
		Rato	Camundongo
Tiamina.HCl, mg/kg	6,0	4,0	5,0
Riboflavina, mg/kg	6,0	2,0	7,0
Piridoxina.HCl, mg/kg	7,0	7,0	1,0
Ácido nicotínico, mg/kg	30,0	20,0	10,0
Pantotenato de cálcio, mg/kg	16,0	8,0	10,0
Ácido fólico, mg/kg	2,0	1,0	0,5
Biotina, mg/kg	0,2	- ^b	0,2
Cianocobalamina, µg/kg	10,0	50,0	0,01
Vitamina A, UI/kg	4.000,0	4.000,0	250-500
Vitamina D, UI/kg	1.000,0	1.000,0	150,0
Vitamina E, UI/kg	50,0	30,0	20,0
Vitamina K, µg/kg	50,0	50,0	3,0

^a Obtida pela utilização da mistura vitamínica a 1% da dieta.
^b Não é requerida em condições convencionais, sendo suprida em quantidades adequadas pela síntese bacteriana intestinal.

TABELA 10. Dietas purificadas AIN-90^a e AIN-76^b, para ratos e camundongos.

Ingrediente	Concentração dietética (g/kg de dieta)	
	AIN-90	AIN-76
Caseína ^c	200,0	200,0
DL-metionina	1,5	3,0
Amido de milho	491,5	150,0
Sacarose	100,0	500,0
Fibra	50,0	50,0
Óleo de milho	100,0	50,0
Mistura mineral AIN ^a	35,0	35,0
Mistura de elementos ultra-traços AIN-90	10,0	-
Mistura vitamínica AIN-90	10,0	10,0
Bitartrato de colina	2,0	2,0

^a De acordo com KNAFKA (1990, idem rodapé p. 54).
^b De acordo com AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION (1977).
^c Caseína com pelo menos 85% de proteína.
^d Mistura mineral utilizada na dieta AIN-76 (tabela 6).

TABELA 13. Dieta de ingredientes naturais de fórmula aberta NIH-42, para ratos e camundongos, de acordo com KNAPEA (1990, idem rodapé p. 54).

Ingrediente	Quantidade (% da dieta)
Isolado protéico de soja (80% de proteína)	2,00
Caseína	3,00
Farinha de glúten de milho (60% de proteína)	6,80
Trigo integral moído	21,50
Farelo de trigo	6,00
Aveia integral moída	23,80
Milho amarelo nº 2 moído	28,00
Extrato seco de levedura de cerveja	3,00
Óleo de milho	1,75
Sal	0,80
Fosfato dicálcico	2,35
Carbonato de cálcio	1,20
Pré-mistura mineral	0,25
Pré-mistura vitamínica	0,25
Total	100,00

TABELA 14. Mistura vitamínica da dieta NIH-42, de acordo com KNAPEA (1990, idem rodapé p. 54).

Vitamina	Quantidade por quilograma de dieta	Fonte
A, UI	25.130,0	palmitato ou acetato de vitamina A
B ₆ , UI	3.970,00	esterol animal ativado
K, mg	19,8	atividade de menadiona
DL-alfa tocoferil acetato, mg	11,0	-
Colina, g	1,2	cloreto de colina
Ácido fólico, mg	1,1	-
Niacina, mg	24,3	-
Ácido d-pantotênico, mg	25,4	d-pantotenato de cálcio
Riboflavina, mg	5,5	-
Tiamina, mg	70,5	monohidrato de tiamina
B ₁₂ , µg	37,5	-
Piridoxina, mg	6,6	hidrocloreto de piridoxina
Biotina, mg	0,1	d-biotina
Hidroxi-ácido de metionina, g	0,5	-
Para dietas não autoclaváveis acrescentar somente		
A, UI	10,0	-
Tiamina, mg	9,9	-

TABELA 15. Mistura mineral da dieta NIH-42, de acordo com KNAPEA (1990, idem rodapé p. 54).

Mineral	Quantidade por quilograma de dieta	Fonte
Cobalto, mg	0,7	carbonato de cobalto
Cobre, mg	4,4	sulfato de cobre
Ferro, mg	22,0	sulfato de ferro
Magnésio, mg	395,8	óxido de magnésio
Manganês, mg	121,3	óxido de manganês
Zinco, mg	24,3	óxido de zinco
Iodo, mg	1,9	iodato de cálcio
Potássio, g	4,32	bicarbonato de potássio

TABELA 16. Concentrações calculadas de nutrientes da dieta NIH-42, de acordo com KNAPEA (1990, idem rodapé p. 54).

Nutriente	Quantidade
Proteína bruta, %	18,04
Gordura bruta, %	4,11
Fibra bruta, %	5,04
Aminoácidos (% da dieta)	
Arginina	0,858
Lisina	0,753
Metionina	0,410
Cistina	0,292
Triptofano	0,201
Glicina	0,779
Histidina	0,447
Leucina	1,858
Isoleucina	0,943
Fenilalanina	1,027
Treonina	0,711
Valina	1,029
Minerais	
Cálcio, %	1,101
Fósforo, %	0,812
Cobalto, PPM	0,90
Cobre, PPM	13,6
Ferro, PPM	380
Manganes, PPM	152
Magnésio, %	0,22
Potássio, %	0,82
Sódio, %	0,30
Zinco, %	50
Iodo, %	1,9
Vitaminas	
Vitamina A, UI/g	30,1
Biotina, PPM	0,27
Colina, PPM	1997
Ácido fólico, PPM	2,36
Niacina, PPM	70,3
Ácido pantotênico, PPM	39,9
Piridoxina, PPM	11,6
Riboflavina, PPM	7,9
Tiamina, PPM	77,6
Vitamina B12, ug/kg	37,5
Alfa-tocoferol, PPM	53,4
Vitamina D, UI/g	3,96
Vitamina K, PPM	19,8

TABELA 17. Dieta NIH-autoclavável de ingredientes naturais de fórmula aberta, para ratos e camundongos "gera-fres", probióticos e SPF, de acordo com KNAPEA (1990, idem rodapé p. 54).

Ingrediente	Quantidade (% da dieta)
Farinha de peixe (80% de proteína)	9,0
Farinha de soja (48,5% de proteína)	5,0
Farinha de alfafa (17% de proteína)	2,0
Farinha de glúten de milho (60% de proteína)	2,0
Trigo integral moído	35,5
Milho amarelo integral na 2 moído	21,0
Aveia integral moída	10,0
Farelo de trigo	10,0
Extrato seco de levedura de cerveja	1,0
Óleo de soja	1,5
Sal	0,5
Fosfato dicálcico	1,5
Pedra calcárea moída	0,5
Pré-misturas	0,5
Total	100,00

TABELA 20. Concentrações calculadas de nutrientes da dieta NIH-autoclavável, de acordo com KNAPEA (1990, idem rodapé p. 54).

Nutriente	Quantidade
Proteína bruta, (% min.)	17.9
Gordura bruta, (% min.)	4.0
Fibra bruta, (% máx.)	5.0
Cinza (% máx.)	8.9
Aminoácidos (% da dieta, min.)	
Arginina	0.90
Lisina	0.85
Metionina	0.35
Cistina	0.25
Triptofano	0.20
Glicina	0.95
Histidina	0.38
Leucina	1.40
Isoleucina	0.95
Fenilalanina	0.85
Tirosina	0.80
Treonina	0.65
Valina	0.90
Minerais (min.)	
Cálcio, %	1.15
Fósforo, %	0.85
Potássio, %	0.75
Sódio, %	0.30
Magnésio, %	0.15
Ferro, ppm	345.00
Zinco, ppm	40.00
Manganês, ppm	140.00
Cobre, ppm	12.00
Cobalto, ppm	0.70
Iodo, %	1.80
Vitaminas (min.)	
Vitamina A, UI/g	30.0
Vitamina D, UI/g	4.0
Alfa-tocoferol, UI/kg	45.0
Tiamina, ppm	70.0
Riboflavina, ppm	7.0
Niacina, ppm	55.0
Ácido pantotênico, ppm	30.0
Colina, ppm	1.900.0
Piridoxina, ppm	10.0
Ácido fólico, ppm	2.0
Biotina, ppm	0.2
Vitamina B12, ug/kg	26.5
Vitamina K, ppm	20.0

TABELA 18. Fortificação vitamínica da dieta NIH-autoclavável, de acordo com KNAPEA (1990, idem rodapé p. 54)

Vitamina	Quantidade por quilograma de dieta	Fonte
A, UI	24.200,00	palmitato ou acetato de vitamina A
Ba, UI	4.180,00	esterol animal ativado
K, mg	22,00	atividade de menadiona
DL-alfa tocoferol, mg	16,50	
Colina, mg	770,00	cloreto de colina
Ácido fólico, mg	1,10	
Niacina, mg	22,00	
Ácido d-pantotênico, mg	27,50	d-pantotenato de cálcio
Riboflavina, mg	5,50	mononitrato de tiamina
Tiamina, mg	71,50	
B12, ug	15,40	hidroclorato de piridoxina
Piridoxina, mg	2,20	d-biotina
Biotina, mg	0,13	

TABELA 19. Fortificação mineral da dieta NIH-autoclavável, de acordo com KNAPEA (1990, idem rodapé p. 54)

Mineral	Quantidade (mg/kg de dieta)	Fonte
Cobalto	0.44	carbonato de cobalto
Cobre	4.40	sulfato de cobre
Ferro	66.00	sulfato de ferro
Magnésio	440.00	óxido de magnésio
Manganês	110.00	óxido de manganês
Zinco	11.00	óxido de zinco
Iodo	1.65	iodato de cálcio

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Dietas purificadas

3.1.1 AIN-76

A dieta AIN-76 (tabela 5, p. 72) foi utilizada como dieta-controle em todos os ensaios biológicos realizados neste trabalho, à exceção do último ensaio de avaliação da eficiência protéica operacional (EPop).

As misturas mineral (tabela 21, p. 89) e vitamínica (tabela 22, p. 89) foram adaptadas segundo as recomendações da AOAC (1975) e da NUTRITIONAL BIOCHEMICALS CORPORATION (1977/1978), respectivamente.

3.1.2 AIN-90

A dieta AIN-90 (tabelas 10 a 12, p. 73) foi utilizada como dieta-controle no último ensaio de avaliação da EPop realizado neste trabalho.

As quantidades necessárias de AIN-76 E AIN-90 foram formuladas previamente a cada ensaio e conservadas sob refrigeração (5° C), sendo administradas aos animais na forma de pó fino.

3.2 Dietas de ingredientes naturais

Foram analisadas três dietas de ingredientes naturais formuladas por uma única firma.

3.2.1 Ração NUVILAB CR-1 autoclavável

Esta ração, indicada como alimento para camundongos e ratos de laboratório, apresenta as seguintes características, de acordo com informações do fabricante (rótulo registrado na DIFISA sob nº 14942):

COMPOSIÇÃO BÁSICA: milho moído, farelo de trigo, farinha de torta de soja, farinha de carne, farinha de peixe, fosfato bicálcico, carbonato de cálcio, sal comum, suplementos e aditivos.

EVENTUAIS SUBSTITUTIVOS: sub-produtos do milho, sub-produtos do arroz, alfafa, cevada, farinha de sangue, farinha de penas hidrolisadas, farinha de torta de girassol, soro de leite dessecado, solúveis dessecados do pescado, gordura animal, farinha de casca de ostra.

NÍVEIS DE GARANTIA:

Umidade (máx.)	12,50%
Proteína bruta (mín.)	22,00%
Extrato etéreo (mín.)	3,00%
Matéria fibrosa (máx.)	9,00%
Matéria mineral (máx.)	8,00%
Cálcio (máx.)	1,40%
Fósforo (mín.)	0,60%

ENRIQUECIMENTO POR QUILOGRAMA DO PRODUTO:

VITAMINAS: Vitamina A, 25.200 UI; Vitamina D₃, 2.100 UI; Vitamina E, 60,00 mg; Vitamina K₃, 12,50 mg; Vitamina B₁, 14,40 mg; Vitamina B₂, 11,00 mg; Vitamina B₆, 12,00 mg; Vitamina B₁₂, 6,00 µg; Ácido nicotínico, 52,50 mg; Ácido pantotênico, 112,00 mg; Ácido fólico, 6,00 mg; Biotina, 0,26 mg; Colina, 1.100,00 mg.

MICROELEMENTOS MINERAIS: Ferro, 50,00 mg; Zinco, 60,00 mg; Cobre, 10,00 mg; Iodo, 2,00 mg; Manganês, 60,00 mg; Selênio, 0,05 mg; Cobalto, 1,50 mg.

AMINOÁCIDOS: metionina, 300,00 mg; lisina, 100,00 mg.

ADITIVO: antioxidante, 100,00 mg.

3.2.2 Rações para ensaio produzidas por Nuvital Nutrientes Ltda.

Foram avaliadas dietas contendo proteína vegetal a 18% e a 22%, segundo informações do fabricante, sendo denominadas neste trabalho de ração "NUVITAL 18% vegetal" e ração "NUVITAL 22% vegetal", respectivamente.

Todas as dietas de ingredientes naturais foram avaliadas nutricionalmente somente após autoclavagem, a qual foi feita no CEMIB-UNICAMP, segundo suas normas de rotina.

Após autoclavagem, as dietas foram entregues para os ensaios, sendo congeladas (-18° C) quando necessário. Nos dias próximos ao uso, foram retiradas do freezer e mantidas sob

refrigeração (5° C), sendo administradas aos animais na forma peletizada. Microbiologicamente, a ração foi analisada imediatamente após sua recepção no laboratório.

3.3 Determinações químicas para avaliação da qualidade protéica: nitrogênio, proteína e determinação aminoacídica.

NITROGÊNIO: a determinação de nitrogênio total das amostras foi feita pelo método de Kjeldahl (semi-micro), utilizando como catalisadores na fase de digestão das amostras o sulfato de potássio (K_2SO_4), o sulfato de cobre ($CuSO_4$) (GUNNING, 1889; ARNOLD & WEIDEINEYER, 1892, *apud* MONTES, 1966) e o dióxido de titânio (WILLIAMS, 1973).

PROTEÍNA: determinada como "proteína bruta", multiplicando-se o nitrogênio total encontrado pelo fator de conversão nitrogênio->proteína: 6,38 para caseína e o fator geral 6,25 para as dietas contendo outras fontes protéicas.

DETERMINAÇÃO AMINOACÍDICA: foi feita após hidrólise ácida, em analisador Beckman 119 CL, de acordo com BECKMAN INSTRUMENTS (1977), pelo método da resina de troca iônica. A determinação do triptofano foi feita pelo método de CONTRERAS GUZMAN & LAPA GUIMARAES (1989), baseado na reação do triptofano com antrona, com formação de um composto colorido.

3.4 Avaliação biológica da qualidade nutricional das dietas

A avaliação nutricional das dietas foi feita através de

ensaios biológicos com ratos, realizados no Laboratório de Ensaios Biológicos do DEPAN da FEA-UNICAMP.

Foram realizados ensaios de avaliação da eficiência protéica operacional (EPop) e balanço de nitrogênio.

Para estes ensaios, foram utilizados ratos albinos machos SPF, da linhagem Wistar Hannover, recém-desmamados (21-25 dias), provenientes do CEMIB-UNICAMP, os quais foram mantidos em ambiente com temperatura ao redor de 22 °C, umidade controlada e iluminação artificial com ciclos de luz-escuro a cada 12 horas.

3.4.1 Avaliação da eficiência protéica operacional (EPop)

Para esta avaliação, os animais foram pesados e colocados em gaiolas individuais, com água e ração *ad libitum*, para um período de adaptação de três dias.

A seguir, os animais foram repesados e divididos em grupos de dez animais por dieta, sendo submetidos às dietas por um período de 28 dias. Neste período, as dietas foram renovadas três vezes por semana, registrando-se também, nas mesmas ocasiões, o consumo de alimento pelos animais e os pesos dos mesmos. Ao final dos 28 dias, foi calculado o valor da EPop para cada animal, através da razão entre o ganho de peso em gramas e a quantidade de proteína ingerida também em gramas, segundo OSBORNE *et alii* (1919).

Neste trabalho, foram realizados 5 ensaios para avaliação da EPop.

3.4.2 Balanço de nitrogênio

O balanço de nitrogênio foi realizado segundo ALLISON (1949).

Para o ensaio de balanço de nitrogênio, os animais foram pesados e divididos em grupos de 6 animais por dieta, procedendo-se de modo a obter médias e desvios-padrões de peso próximos entre os grupos.

Os animais foram colocados em gaiolas metabólicas individuais, sendo submetidos a um período de adaptação às dietas durante 6 dias, recebendo água e ração *ad libitum*.

Após este período, os animais foram novamente pesados e procedeu-se ao balanço nitrogenado durante 5 dias, com coleta de fezes e urina para análise, registrando também a variação de peso dos animais e o consumo de alimento pelos mesmos durante o período do balanço.

O balanço de nitrogênio permitiu a determinação da Digestibilidade Aparente (DA), do Valor Biológico Aparente (VBA) e da Utilização Líquida Aparente da Proteína (NPUA), conforme PELLETT & YOUNG (1980).

Em todos os ensaios biológicos, o controle de peso dos animais e de consumo de dieta permitiu o cálculo do coeficiente de eficiência alimentar (CEA), mostrando a relação entre o ganho de peso pelo animal e a dieta consumida (PELLETT & YOUNG, 1980).

Estes índices foram calculados individualmente para cada animal, permitindo o cálculo do valor médio e desvio-padrão

para cada grupo experimental.

3.5 Avaliação microbiológica

Foram utilizadas amostras da dieta comercial NUVILAB-CR-1 autoclavável (Nuvital Nutrientes Ltda.), descrita no item 3.2.1, nas formas não autoclavada, autoclavada e retirada após 72 horas dos cochos dos animais.

Executaram-se os seguintes testes microbiológicos: contagem padrão em placas de mesófilos aeróbios, bolores e leveduras, *Staphylococcus aureus*, coliformes totais, coliformes fecais, *Salmonella*, clostrídios sulfito-redutores e *Bacillus cereus*.

Foram também realizados os seguintes testes com kits de análise bacteriológica rápida: contagem total, bolores e leveduras, coliformes totais e *Staphylococcus aureus*.

Os meios de cultura utilizados nas análises e suas respectivas procedências encontram-se relacionados na tabela 23 (p. 89).

As amostras utilizadas foram coletadas no CEMIB-UNICAMP, durante o período de janeiro de 1990 a maio de 1991.

Foram feitas 5 coletas nas seguintes datas: 22 de janeiro, 02 de abril, 14 de maio e 27 de agosto, no ano de 1990 e 07 de maio, no ano de 1991.

As amostras da primeira coleta foram destinadas à determinação de umidade e atividade de água, enquanto que as demais foram submetidas também às análises microbiológicas:
02/04 e 14/05 de 1990: métodos convencionais;

27/08/1990: métodos convencionais e kits de análise bacteriológica rápida;

07/05/1991: kits de análise bacteriológica rápida.

Obedecendo normas vigentes no CEMIB, as coletas foram feitas pelos funcionários do próprio biotério em frascos esterilizados, que foram trazidos para o laboratório para execução imediata das análises.

3.5.1 Preparo das amostras

As amostras foram pesadas assepticamente em recipientes estéreis. Adicionou-se o diluente água peptonada 0,1% em quantidade suficiente para obter a diluição inicial de 10^{-1} , procedendo-se à homogeneização da mistura por 2 minutos em liquidificador. A seguir, foram preparadas as diluições 10^{-2} e 10^{-3} , no mesmo diluente.

3.5.2 Testes microbiológicos

CONTAGEM PADRÃO EM PLACAS DE MESÓFILOS AERÓBIOS: foi utilizada a técnica recomendada por BUSTA *et alii* (1984) no "Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods" (SPECK, 1984).

BOLORES E LEVEDURAS: para enumeração de bolores e leveduras foi utilizado o procedimento recomendado por KOBURGER & MARTH (1984), no "Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods" (SPECK, 1984).

STAPHYLOCOCCUS AUREUS: foi utilizada a técnica de plaqueamento direto em superfície, recomendada pelo ICMSF (1983). Após o período de incubação, placas contendo de 20 a 200 colônias foram selecionadas e contadas para colônias conforme recomendações do método, sendo então testadas para produção de coagulase (TATINI, HOOVER & LACHICA, 1984) e, quando necessário, foram conduzidos testes adicionais de exame microscópico (coloração de Gram), de reação de catalase (SPECK, 1984) e de produção de termonuclease (ICMSF, 1983).

COLIFORMES TOTAIS: determinou-se o número mais provável (NMP) de bactérias coliformes, segundo metodologia de MEHLMAN (1984), no "Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods" (SPECK, 1984).

COLIFORMES FECAIS: foi determinado o NMP de coliformes fecais, segundo metodologia de MEHLMAN (1984), no "Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods" (SPECK, 1984).

SALMONELLA: foi investigada a presença de *Salmonella* em 25 gramas do produto, segundo recomendações de POELMA, ANDREWS & SILLIKER (1984), no "Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods" (SPECK, 1984).

CLOSTRÍDIOS SULFITO-REDUTORES: as amostras coletadas em 02 de abril e 14 de maio de 1990 foram examinadas segundo a metodologia de SPECK & GRAVES (1984), no "Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods" (SPECK, 1984), a qual determina o número de esporos de *Desulfotomaculum nigrificans*, responsável pelo fenômeno de deterioração sulfídrica. Para a

análise da amostra coletada em 27 de agosto de 1990, foi utilizada a metodologia de HARMON et alii (1971) para enumeração de *Clostridium perfringens*, quanto aos meios de cultura e método de semeadura, com a caracterização de clostrídios sulfito-redutores feita pela incubação a 46° C por 24 horas em anaerobiose, de acordo com a Portaria 001/1987 da Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos-DINAL (ABIA, 1989).

BACILLUS CEREUS: para a contagem de *B. cereus* foi utilizada a metodologia de plaqueamento direto em superfície, descrita por HARMON & GOEPFERT (1984) no "Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods" (SPECK, 1984).

3.5.3 Análise bacteriológica rápida

Para a análise bacteriológica rápida, foram utilizados kits do sistema Hy-Food-Test (HFT), produzidos pela empresa Hy Labs, especializada na produção de kits para análise no campo de saúde pública e alimentação.*

HFT é um sistema de teste, no qual os meios bacteriológicos de cultura, esterilizados por irradiação gama, estão aderidos em uma pá e podem ser mergulhados em líquidos ou usados por contato em superfície.

Foram realizados testes de Contagem Total, Bolores e Leveduras, Coliformes Totais e *Staphylococcus aureus*, de acordo com recomendações do kit, que detecta 10^3 a 10^7 organismos/ml, após incubação a 30°C por períodos pré-determinados.

*O material utilizado foi doado pela INPAL S.A. Indústrias Químicas.

3.5.4 Determinação de umidade e atividade de água

Para estas determinações, as amostras de ração foram trituradas em um moedor de café Braun Aromatic KSM 2R.

A umidade das amostras foi determinada por gravimetria, por secagem em estufa a 105 °C, até peso constante (LENKEIT & BACKER, 1956 *apud* SILVA, 1981).

A atividade de água foi determinada no higrômetro elétrico Novasina Aw-center, o qual realiza as medidas com temperatura controlada, em três sensores.

As determinações de umidade e atividade de água foram feitas em triplicata.

3.6 Análise estatística

Os resultados obtidos nos ensaios biológicos com três tratamentos foram submetidos à análise de variância e ao teste F, para verificar a existência de diferenças significativas entre médias. Quando diferentes, julgou-se o contraste entre médias pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância (PIMENTEL GOMES, 1970).

Para ensaios biológicos com dois tratamentos, verificou-se a igualdade das variâncias pelo teste F de Snedecor. As diferenças entre médias com variâncias iguais foram determinadas pelo teste "t" de Student, enquanto que as diferenças entre médias com variâncias diferentes, pelo teste "t" de Behrens-Fisher, ao nível de 5% de significância (DOWDY & WEARDEN, 1983).

Para alguns parâmetros foram traçadas curvas de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, e a significância do coeficiente de correlação, r , foi determinada de acordo com GRANER (1966).

TABELA 21. Formulação da mistura mineral utilizada na dieta AIN-76, segundo AOAC (1975).

Componente	% da mistura
Cloreto de sódio (NaCl)	13,93
Iodeto de potássio (KI)	0,079
Bifosfato de potássio (KH ₂ PO ₄)	38,90
Sulfato de magnésio (MgSO ₄)	5,73
Carbonato de cálcio (CaCO ₃)	38,14
Sulfato ferroso (FeSO ₄ .7H ₂ O)	2,70
Sulfato de manganês (MnSO ₄ .H ₂ O)	0,431
Sulfato de zinco (ZnSO ₄ .7H ₂ O)	0,0548
Sulfato de cobre (CuSO ₄ .5H ₂ O)	0,0477
Cloreto de cobalto (CoCl ₂ .6H ₂ O)	0,0023

TABELA 22. Formulação da mistura vitamínica utilizada na dieta AIN-76, segundo NUTRITIONAL BIOCHEMICALS CORPORATION (1977/1978).

Componente	% da mistura
Concentrado de vitamina A (200.000 UI/g)	2,948
Concentrado de vitamina D (400.000 UI/g)	0,163
Alfa-tocoferol	3,276
Ácido ascórbico	29,486
Inositol	3,276
Cloreto de colina	49,144
Menadiona	1,474
Ácido P-aminobenzóico	3,278
Niacina	2,948
Riboflavina	0,655
Hidrocloreto de piridoxina	0,655
Hidrocloreto de tiamina	0,655
Pantotenato de cálcio	1,965
Biotina	0,013
Ácido fólico	0,058
Vitamina B12	0,001

TABELA 23. Meios de cultura utilizados nas análises microbiológicas e procedências, de acordo com o "Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods" (SPECK, 1984)*.

Análises	Meios de Cultura	Procedência
Contagem padrão em placas de meiofílios	PCA (Plate Count Agar)	DIFCO e formulado no laboratório
Bolores e leveduras	PDA (Potato Dextrose Agar)	DIFCO e formulado no laboratório
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ágar Baird-Parker	DIFCO
	Caldo BHI (Brain Heart Infusion)	DIFCO
	Ágar DNA-azul de toluidina	Formulado no laboratório
Coliformes totais	Caldo LST (Lauryl Sulfate Tryptose)	DIFCO
	Caldo BGE (Brilliant Green Bile)	Formulado no laboratório
Coliformes fecais	Caldo EC	DIFCO
<i>Salmonella</i>		
Pré-enriquecimento	Caldo lactose	Formulado no laboratório
Enriquecimento seletivo	Caldo tetrationato	DIFCO
Isolamento	Ágar BG (Brilliant Green Agar)	DIFCO
	Ágar SS (<i>Salmonella-Shigella</i>)	DIFCO
Testes bioquímicos	Ágar TSI (Triple Sugar Iron)	DIFCO
	Ágar LI (LysineIron)	DIFCO
	Caldo uréia	Formulado no laboratório
Clostrídios sulfito-redutores	Ágar sulfito	Formulado no laboratório
	Ágar SPS (Sulfite Polymyxin Sulfadiazine)	Formulado no laboratório
<i>Bacillus cereus</i>	Ágar NYP (Mannitol Yolk Polymyxin)	DIFCO

*Exceto para ágar SPS (análise de clostrídios sulfito-redutores), para o qual se utilizou a metodologia de HARMON, KAUTIER & PERLER (1971).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Determinações químicas para avaliação da qualidade protéica

4.1.1 Proteína

O conteúdo de proteína bruta da dieta NUVILAB CR-1 autoclavável foi determinado em amostras tomadas em tempos e lotes distintos. Os resultados obtidos são apresentados na tabela 24 (p. 119) juntamente com valores encontrados para as dietas NUVITAL 18% vegetal e NUVITAL 22% vegetal.

Os valores encontrados para a dieta comercial NUVILAB CR-1 autoclavável estão de acordo com as especificações estabelecidas pelo fabricante, as quais indicam um conteúdo dietário mínimo de 22% (rótulo registrado na DIFISA sob nº 14942), concordando com os valores encontrados na maioria das dietas de ingredientes naturais adequadas para ratos e camundongos, que contêm 18-25% de proteína.

De acordo com COATES (1976) e BAKER (1979), o nível de 20% de proteína de fontes vegetais e animais têm sido considerado suficiente, desde que inclua uma proporção de proteína de boa qualidade como farinha de peixe, leite em pó ou farinha de soja.

Pode-se observar que os requerimentos do NRC são atendidos, os quais recomendam níveis de 15-20% para crescimento, gestação ou lactação de ratos alimentados com dietas de ingredientes naturais; para camundongos, o nível recomendado é de

12,5% de proteína (como caseína e aminoácidos) para crescimento, e 18% para reprodução quando alimentados com dietas de ingredientes naturais (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1978).

As dietas NUVITAL 18% vegetal e NUVITAL 22% vegetal não são dietas comercializadas. Foram produzidas exclusivamente para os ensaios deste trabalho e formuladas apenas com ingredientes de origem vegetal, na tentativa de eliminar o aporte protéico de origem animal para minimizar a contaminação microbiológica.

O resultado obtido para a dieta NUVITAL 18% vegetal indicou um conteúdo protéico inferior ao especificado pelo fabricante, com boa concordância no caso da dieta NUVITAL 22% vegetal. Os valores encontrados para estas dietas atendem aos requerimentos nutricionais para ratos e camundongos (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1978).

A dieta NUVILAB CR-1 autoclavável é uma dieta de ingredientes naturais de fórmula fechada. Assim, suas especificações incluem apenas uma lista de ingredientes que podem ser utilizados na formulação, juntamente com a garantia de concentrações máximas e/ou mínimas aceitáveis de alguns nutrientes, não permitindo o cálculo das concentrações dietárias de nutrientes.

4.1.2 Composição aminoacídica

Os resultados obtidos na determinação da composição aminoacídica das dietas de ingredientes de ingredientes naturais são apresentadas na tabela 25 (p. 119).

De acordo com NATIONAL RESEARCH COUNCIL (1978), os

requerimentos de aminoácidos são relacionados à concentração protéica da dieta. Os requerimentos para ratos são baseados em dietas que contém 12% de proteína (tabela 3, p. 70), enquanto que para camundongos, em dietas que contém 12,5% de proteína (tabela 4, p. 71). Em geral, o requerimento para um aminoácido tende a crescer com o aumento do conteúdo protéico quando expresso como porcentagem da dieta, mas pode permanecer constante ou decrescer levemente quando expresso como porcentagem da proteína. Desde que as dietas comerciais apresentam conteúdos protéicos superiores àqueles sobre os quais se baseiam os requerimentos aminoacídicos, os valores obtidos foram comparados aos requerimentos pela expressão em termos de porcentagem de proteína (tabela 26,p.120), e expressos também como porcentagem dos requerimentos para ratos e camundongos, a fim de obter informações sobre a limitação e o balanço de aminoácidos das proteínas dietárias (tabela 27,p.120).

A tabela 25 (p. 119) indica que quando os resultados da composição de aminoácidos são expressos em termos de porcentagem da dieta, de um modo geral o conteúdo de aminoácidos é superior na dieta NUVITAL 22% vegetal, sendo seguido pelo conteúdo da dieta NUVILAB CR-1 autoclavável e finalmente pelo conteúdo da dieta NUVITAL 18% vegetal. Entretanto, a expressão em porcentagem da proteína revela teor mais elevado das três dietas no conteúdo dos seguintes aminoácidos:

- NUVILAB CR-1 autoclavável: não ocorreu teor mais elevado;
- NUVITAL 18% vegetal: lisina, metionina+cisteína, triptofano e histidina;
- NUVITAL 22% vegetal: isoleucina, leucina, fenilalanina+ tirosina, valina, arginina e aminoácidos não essenciais.

Comparando-se os resultados da composição aminoacídica das dietas com os requerimentos para ratos e camundongos (tabelas 26 e 27, p. 120), verifica-se que os aminoácidos sulfurados (MET+CYS) são os mais deficientes, constituindo-se aminoácidos limitantes. Diversas fontes protéicas têm se mostrado limitantes nestes aminoácidos (SARWAR, PEACE & BOTTING, 1985), sendo característica comum a todas as sementes de leguminosas (EVANS & BAUER, 1978; SGARBIERI, 1980). Entretanto, a baixa concentração desses aminoácidos pode ser atribuída, em parte, à destruição durante a hidrólise ácida.

Deve-se notar que a nova dieta AIN-90 apresenta um conteúdo de aminoácidos sulfurados (4% da proteína) que representa 80% do valor encontrado na antiga AIN-76 (5% da proteína). Além disso, alguns pesquisadores têm sugerido que o requerimento do NRC para aminoácidos sulfurados é muito alto como o mínimo necessário para a síntese protéica, e têm sugerido valores em torno de 4% da proteína (SARWAR *et alii*, 1985).

Em relação aos aminoácidos essenciais, a dieta NUVILAB CR-1 autoclavável apresentou as menores quantidades. De acordo com MATSUNO *et alii* (1976) e BEDFORD & SUMMERS (1985), o suprimento dietário de aminoácidos essenciais na taxa de 55% em relação aos aminoácidos totais geram desempenho máximo de animais (frangos e ratos) em crescimento. As dietas experimentais utilizadas neste trabalho apresentaram taxas de 45% a 50% (tabela 26, p. 120). De acordo com esses autores, a utilização de taxas adequadas é de importância, desde que taxas inferiores (35%) representam deficiência de aminoácidos essenciais e gasto excedente de energia para excreção do excesso de nitrogênio.

devido ao excesso de aminoácidos não essenciais, enquanto que taxas muito elevadas (65%) causarão taxas de desaminação insuficientes para preencher os requerimentos para síntese de aminoácidos não essenciais, necessária para máximo desempenho animal.

As dietas, comparativamente aos requerimentos NRC, apresentaram as seguintes ordens de deficiências para ratos, com as porcentagens em relação aos requerimentos indicadas entre parênteses:

- NUVILAB CR-1 autoclavável: deficiente em metionina+cisteína (43,00%), lisina (84,91%), triptofano (86,40%), com valores bem próximos aos requerimentos para histidina (96,40%);
- NUVITAL 18% vegetal: deficiente em metionina+cisteína (57,00%);
- NUVITAL 22% vegetal: deficiente em metionina+cisteína (49,00%) e lisina (91,42%).*

Para camundongos, as dietas apresentaram deficiência apenas de aminoácidos sulfurados (metionina+cisteína), com 53,75%, 71,25% e 61,25% em relação aos requerimentos, para NUVILAB CR-1 autoclavável, NUVITAL 18% vegetal e NUVITAL 22% vegetal, respectivamente.

A análise das tabelas 26 e 27 (p. 120) revela que, para camundongos, as quantidades de aminoácidos, à exceção dos sulfurados, excedem largamente os valores recomendados,

*As mesmas dietas, comparativamente à dieta purificada AIN-90, cujo teor calculado de aminoácidos sulfurados na proteína está próximo de 4% e não 5% como o recomendado pelo NRC, apresentam então: 53,75%, 71,25% e 61,25% para NUVILAB CR-1 autoclavável, NUVITAL 18% vegetal e NUVITAL 22% vegetal, respectivamente.

confirmando o fato de que em geral as concentrações de nutrientes nas dietas de ingredientes naturais apresentam considerável excesso sobre os requerimentos estimados (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1978). A arginina é o aminoácido que mais excede em relação aos requerimentos, e esta observação é também válida para ratos. Este aminoácido está presente nas dietas experimentais em níveis que variam entre 130 a 144% em relação aos requerimentos de ratos, enquanto que para camundongos, 270 a 300%. Este aminoácido é essencial para o crescimento de ratos jovens, e possivelmente não é requerido para manutenção de ratos adultos (BAKER, 1979). Em relação a camundongos, este aminoácido parece não ser essencial. Os estudos de JOHN & BELL (1976) sobre requerimentos de camundongos em crescimento não demonstraram requerimento de arginina, desde que o mínimo nível do aminoácido oferecido aos animais não gerou efeitos adversos, confirmando estudos anteriores, os quais revelaram que a omissão de arginina não reduziu a taxa de crescimento de camundongos, demonstrando a capacidade de síntese do aminoácido por esses animais (BAUER & BERG, 1943b *apud* JOHN & BELL, 1976).

Outro importante fator a ser considerado é o balanço de aminoácidos, desde que o valor nutritivo de uma proteína depende não apenas do conteúdo, mas também da existência de proporções adequadas entre os seus aminoácidos, e a ingestão de dietas com quantidades desproporcionais de aminoácidos causa alterações nas respostas fisiológicas dos animais (PENG, 1979; TACKMAN *et alii*, 1990). De acordo com BEDFORD & SUMMERS (1985), as possibilidades de desbalanços são menores quando os aminoácidos essenciais estão presentes em proporções entre si semelhantes às existentes nos

requerimentos, possibilitando a utilização da proteína com máxima eficiência.

As dietas estudadas apresentam desbalanços, principalmente para camundongos, evidenciados pelos altos excessos e deficiências em relação aos requerimentos para estes animais (tabelas 26 e 27, p. 120). Para ratos, os desbalanços são pouco acentuados, desde que sejam corrigidas as deficiências, permitindo, provavelmente, uma adaptação metabólica às dietas, com sobrevivência e crescimento adequados (MERCER *et alii*, 1984; TACKMAN *et alii*, 1990).

É importante salientar que tais inadequações podem ser resultantes do fato de que as dietas geralmente são recomendadas para atender os requerimentos nutricionais de ratos e camundongos, nos diversos estágios da vida desses animais. Isto ocorre mesmo para as dietas recomendadas como dietas de referência (KNAPKA *et alii*, 1974; AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION, 1977). É notável, em alguns casos (LYS, PHE+TYR, ARG), a diferença existente entre requerimentos de ratos e camundongos (tabela 26, p. 120). Deve-se considerar que essas diferenças podem estar associadas ao fato de que os requerimentos para camundongos foram estabelecidos com base em estudos de JOHN & BELL (1976), enquanto que para os ratos, foram estabelecidos com base em estudos de diversos autores (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1978). Desde que para alguns nutrientes os requerimentos são divergentes entre as duas espécies e entre os diversos estágios da vida, o caminho mais adequado provavelmente seria no sentido de formulação de dietas específicas para cada espécie e estágios da vida nos quais os requerimentos se aproximassem. Visto que os

grandes centros de bioterismo empregam a mesma ração, é evidente que a viabilidade econômica se impõe sobre o crescimento ótimo, o que não inviabiliza a obtenção de animais saudáveis.

A tabela 28 (p. 121) apresenta a composição aminoacídica das dietas estudadas comparativamente às dietas recomendadas de ingredientes naturais, descritas e referendadas no item 2.2.3 deste trabalho.

Diversas observações podem ser feitas através da análise da tabela, que em geral indicam semelhanças ou mesmo teores mais elevados das dietas experimentais quando comparadas às recomendadas, à exceção dos aminoácidos sulfurados, que estão presentes em maiores quantidades nas dietas recomendadas. Entretanto, os valores indicados para as dietas recomendadas comparados aos requerimentos (tabela 26, p. 120) permitem notar a existência de deficiências de alguns aminoácidos nestas dietas.

A determinação da composição aminoacídica representou uma avaliação preliminar das dietas, especialmente das vegetais, visando verificar a viabilidade da eliminação do aporte protéico de origem animal. Os resultados obtidos indicaram que as dietas atendem os requerimentos do NRC, em relação ao conteúdo protéico, mas são inadequadas do ponto de composição aminoacídica, apresentando deficiências e desbalanços de aminoácidos.

Entretanto, as principais limitações da análise de aminoácidos em alimentos são a destruição dos aminoácidos durante a hidrólise ácida e a discrepância que pode ocorrer entre o conteúdo de aminoácidos e a disponibilidade nutricional (PELLETT, 1978). Assim, considerando-se que esta análise representa uma etapa do estudo e não define suficientemente a qualidade

nutricional das dietas, foram conduzidos ensaios biológicos com as dietas, exceptuando-se a NUVITAL 18% vegetal, porque a mesma não apresentou teor protéico compatível com as especificações do fabricante.

4.2 Avaliação biológica da qualidade nutricional das dietas

4.2.1 Avaliação da eficiência protéica operacional (EPop)

A avaliação da EPop é um método baseado no crescimento, expressando numericamente o valor promotor de crescimento de proteínas, pela relação do ganho de peso com a quantidade de proteína ingerida, como descrito por OSBORNE *et alii* (1919); o método original descrito por esses autores recomendava a avaliação de cada proteína em seu nível ótimo, isto é, com a máxima relação acima citada. Posteriormente, esta recomendação não foi adotada, estabelecendo-se, ao longo do tempo, condições experimentais padronizadas. O PER (Protein Efficiency Ratio), adotado como procedimento oficial de medida da qualidade protéica nos Estados Unidos e Canadá (JANSEN, 1978), representa a relação determinada sob condições experimentais padronizadas: ratos desmamados (21-28 dias), alimentados com dietas contendo 10% de proteína por um período teste de quatro semanas, e com resultados expressos em relação à dieta-controle de caseína (AOAC, 1980).

Neste trabalho, estas condições não foram integralmente adotadas, utilizando-se as dietas como são, desde que o interesse inicial foi o estudo do valor promotor de crescimento das

proteínas na composição dietária completa das dietas, bem como o estudo do valor promotor de crescimento da dieta como um todo, adotando-se o termo "eficiência protéica operacional (EPop)". Foram realizados cinco ensaios com lotes distintos abrangendo um período de 22 meses para avaliação da EPop. A tabela 29 (p. 121) identifica as dietas utilizadas em cada ensaio ao lado do respectivo conteúdo protéico.

Nos quatro primeiros ensaios, a dieta AIN-76 foi utilizada como dieta-controle. Esta dieta é indicada para ratos e camundongos e recomendada como dieta de referência (AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION, 1977). No quinto ensaio, foi utilizada a dieta AIN-90, a qual representa uma proposta de modificação da dieta AIN-76, visando aperfeiçoar a fórmula da mesma (KNAPKA, 1990, idem rodapé p. 54).

Este trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar a dieta NUVILAB CR-1 autoclavável, a qual tem sido utilizada para alimentação dos roedores do CEMIB. Entretanto, a viabilização do uso de dietas vegetais é de interesse, desde que seria favorável para a qualidade das dietas oferecidas aos animais de laboratório. Assim, no quarto ensaio de EPop, foi testada, juntamente com a dieta NUVILAB CR-1 autoclavável, a dieta NUVITAL 22% vegetal. As tabelas 30 a 34 (p. 121 e 122) apresentam os resultados obtidos nos cinco ensaios.

Em todos os ensaios, as dietas purificadas (AIN-76 ou AIN-90) apresentaram os melhores valores para CEA e EPop, indicando que estas dietas apresentam os melhores valores promotores de crescimento quando consideradas como um todo (CEA) ou quando consideradas suas proteínas (EPop), em relação às

dietas de ingredientes naturais utilizadas neste trabalho.

Considerando-se as definições dos índices "CEA=ganho de peso/consumo de dieta" (PELLETT & YOUNG, 1980) e "EPop=ganho de peso/proteína ingerida" (OSBORNE *et alii*, 1919), observa-se que os mesmos dependem dos valores obtidos para o numerador (ganho de peso) e para o denominador (consumo de dieta e proteína ingerida para CEA e EPop, respectivamente) da relação.

Essas situações foram variáveis para os diversos ensaios. No primeiro ensaio (tabela 30, p. 121), o ganho de peso foi acentuadamente superior para a dieta AIN-76, com consumo alimentar comparável entre as duas dietas. Entretanto, o maior conteúdo protéico da dieta NUVILAB CR-1 autoclavável proporcionou maior ingestão de proteína para esta dieta, que juntamente com o menor ganho de peso causou um valor de EPop para a dieta NUVILAB CR-1 autoclavável bem inferior ao da dieta AIN-76.

No segundo ensaio (tabela 31, p. 122), o ganho de peso foi levemente superior para a dieta AIN-76, sem entretanto diferir significativamente entre as dietas. Verifica-se que o grupo da dieta NUVILAB CR-1 autoclavável ingeriu maior quantidade de alimento e que o maior conteúdo protéico da dieta provocou uma ingesta protéica bem superior à da dieta AIN-76. Assim, observa-se que os animais compensaram a menor qualidade nutricional da dieta de ingredientes naturais com maior ingesta de alimento e protéica, alcançando ganho de peso comparável ao da dieta-controle.

Os resultados obtidos no terceiro ensaio (tabela 32, p. 122) permitem estabelecer comparações semelhantes às do primeiro ensaio, isto é, ganho de peso superior para a dieta AIN-76 e

consumo alimentar sem diferença significativa entre as duas dietas, embora superior para a dieta NUVILAB CR-1 autoclavável. Entretanto, a diferença entre o ganho de peso das duas dietas não foi tão acentuada quanto no primeiro ensaio, e os valores obtidos para os índices de qualidade nutricional se aproximam mais entre as dietas, preservando a superioridade nutricional na dieta-controle.

O quarto ensaio (tabela 33, p. 122) incluiu a dieta NUVITAL 22% vegetal. Verifica-se que os grupos alimentados com as dietas AIN-76 e NUVITAL 22% vegetal apresentaram ganho de peso bastante semelhantes, enquanto que a dieta NUVILAB CR-1 autoclavável proporcionou o menor ganho de peso; entretanto, as diferenças não foram estatisticamente significativas ao nível de 5%. O consumo alimentar diferiu entre as dietas, sendo superior para a NUVITAL 22% vegetal, intermediário para a NUVILAB CR-1 autoclavável e inferior para a AIN-76. A ingesta protéica obedeceu a mesma seqüência apresentada para o consumo alimentar. As dietas de ingredientes naturais foram comparáveis quanto ao CEA e EPop, apresentando valores acentuadamente semelhantes, os quais foram inferiores aos da dieta-controle. Assim, observa-se um efeito compensatório dos animais, os quais, através de maior ingesta, obtiveram ganho de peso comparável ao da dieta-controle.

No quinto ensaio (tabela 34, p. 122), a dieta AIN-90 foi utilizada como dieta-controle. O ganho de peso foi superior para o grupo da dieta-controle, mas a diferença não foi estatisticamente significativa. O consumo alimentar não diferiu entre as dietas, enquanto que a ingesta protéica foi superior para a NUVILAB CR-1 autoclavável.

Esses resultados também podem ser visualizados através das figuras 1, 2 e 3 (p. 126 a 128) que mostram graficamente o crescimento e o consumo alimentar dos animais para as quatro semanas de experimento.

A análise da figura 1 (p. 126) mostra que o consumo alimentar acumulado é uma função linear do tempo do experimento, existindo uma forte correlação linear positiva significativa entre essas duas variáveis, com $r > 0,9899^{**}$ ($p < 0,01$); o peso dos animais também mostrou forte correlação linear positiva significativa com o tempo do experimento, com $r > 0,9885^{**}$ ($p < 0,01$) (figura 2, p. 127). Observa-se que o peso dos animais variou linearmente com o consumo alimentar acumulado dos animais, mostrando uma forte correlação linear positiva significativa, com $r > 0,9896$ ($p < 0,01$) (figura 3, p. 128).

Essas observações foram válidas para todos os experimentos, considerando-se as diversas dietas estudadas.

No item 4.1 deste trabalho, a adequação nutricional das dietas foi discutida à luz dos requerimentos nutricionais, principalmente de proteína e aminoácidos. Uma outra aproximação sugerida é a verificação do ganho de peso periódico de animais em crescimento (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1979). De acordo com NATIONAL RESEARCH COUNCIL (1978), linhagens de crescimento lento (ex. Wistar) deveriam ganhar 5g/dia durante as três semanas pós-desmame, em situações de adequação nutricional. A tabela 35 (p. 123) apresenta o ganho de peso e o consumo dos animais para os cinco ensaios de avaliação da EPop, bem como o ganho de peso diário e CEA, obtidos nas três primeiras semanas dos experimentos.

Observa-se que a dieta-controle AIN-76 apresentou valores adequados e superiores ao indicado (5g/dia) em todos os ensaios. Os resultados relatados pelo AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION (1977) indicaram valores superiores para ganho de peso diário (6,7-7,0 gramas), o que poderia se justificar pela utilização de linhagens de ratos de crescimento rápido. De acordo com HURT *et alii* (1976), diferenças na linhagem genética podem explicar parcialmente as diferenças de resposta nos parâmetros de crescimento entre laboratórios; os valores de CEA foram mais variáveis, 0,627 e 0,454; assim, os valores encontrados neste trabalho para este índice se aproximam, em alguns ensaios, do menor valor citado.

HANCOCK, LEWIS & PEO (1989), adotando ratos de crescimento rápido em ensaios de 21 dias com a dieta AIN-76, obtiveram valores de ganho de peso diário e CEA superiores aos relatados na tabela 35 (p. 123).

A dieta-controle AIN-90 também se mostrou adequada, propiciando taxa de crescimento superior à indicada para esses animais, o que era esperado, devido às características nutricionais existentes nesta dieta, que representa uma proposta de modificação da dieta de referência AIN-76 (KNAPKA, 1990, *idem* rodapé p. 54).

Quando comparada à dieta AIN-76, verifica-se que a dieta AIN-90 apresentou ganho de peso diário comparável aos valores obtidos para a dieta AIN-76, à exceção do primeiro ensaio, para o qual a última dieta apresentou um valor inferior; para o CEA, os valores obtidos para a dieta AIN-76 foram superiores, com exceção também para o primeiro ensaio, onde os

valores obtidos para as duas dietas são próximos. Deve-se observar que o conteúdo protéico da dieta AIN-90 foi inferior ao da dieta AIN-76; assim, para um determinado consumo de proteína propiciando crescimento adequado, houve necessidade de um maior consumo alimentar, com diminuição do valor de CEA.

A dieta NUVILAB CR-1 autoclavável não apresentou adequação durante o primeiro ensaio, com valor levemente inferior no quinto ensaio. Nos demais, o ganho de peso diário se mostrou adequado e superior ao esperado para estes animais, embora inferior à dieta-controle.

O estudo da dieta de ingredientes naturais NIH-07, recomendada como dieta de referência (AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION, 1977), indicou ganhos diários de peso superiores aos encontrados para a dieta NUVILAB CR-1 autoclavável neste trabalho, com resultados bastante comparáveis para o CEA; deve-se entretanto observar as diferentes linhagens utilizadas e as deficiências verificadas na dieta sob estudo, indicadas no item 4.1.2 deste trabalho.

No quarto ensaio, verifica-se ganho de peso diário comparável entre as dietas AIN-76 e NUVITAL 22% vegetal, e portanto, adequado, notando-se também a superioridade da dieta NUVITAL 22% vegetal quando comparada à dieta NUVILAB CR-1 autoclavável.

A adequação de dietas formuladas com fontes protéicas exclusivamente vegetais tem sido verificada em estudos comparativos com dietas com fontes protéicas mistas ou animais. NEWMAN *et alii* (1988) estudaram comparativamente farinha de soja e farinha de peixe como suplementos protéicos em dietas baseadas

em milho, em ensaios de crescimento e balanço de nitrogênio e obtiveram resultados comparáveis entre as duas dietas. HANCOCK *et alii* (1989), em estudos de crescimento, utilizaram formulações contendo soja suplementada com metionina (0,3% da dieta) como fonte protéica, em nível comparável ao da dieta de caseína e obtiveram resultados comparáveis entre as formulações. FORSUM & HAMBRAEUS (1978) encontraram resultados comparáveis em estudos de crescimento utilizando dietas de caseína e dietas de farinha de soja, enquanto que os resultados encontrados para o ensaio de balanço de nitrogênio revelaram valor biológico e digestibilidade inferiores para a soja.

A análise global dos resultados revela que as respostas de crescimento dos animais às dietas foram satisfatórias. Entretanto, as dietas de ingredientes naturais se mostraram inferiores à dieta-padrão em termos de seus índices CEA e EPop, em decorrência de inadequações nutricionais, que devem ser corrigidas, a fim de se obter valores adequados e comparáveis às dietas consideradas de referência.

4.2.2 Balanço de nitrogênio

Neste trabalho foi realizado um ensaio de balanço de nitrogênio. Os resultados obtidos neste ensaio estão apresentados nas tabelas 36 e 37 (p. 123).

A tabela 36 (p. 123) contém os resultados médios obtidos quanto ao aumento de peso, consumo alimentar e coeficiente de eficiência alimentar (CEA). Verifica-se que o ganho de peso dos animais não diferiu entre as dietas; os animais

mantidos sob a dieta NUVILAB CR-1 autoclavável ingeriram significativamente uma maior quantidade de alimento, apresentando assim um menor CEA.

A análise da tabela 37 (p. 123) indica que o nitrogênio ingerido foi superior para a dieta NUVILAB CR-1 autoclavável, devido ao maior consumo alimentar deste grupo. Para a dieta AIN-76, a excreção urinária de nitrogênio foi superior à fecal, enquanto que para a NUVILAB CR-1 autoclavável, observa-se o contrário. A excreção fecal de nitrogênio apresentada pela dieta NUVILAB CR-1 autoclavável ($615,73 \pm 86,38$ mg) foi muito alta em comparação à da dieta AIN-76 ($81,21 \pm 23,57$ mg).

A combinação dos valores de nitrogênio ingerido e excretado para os dois grupos forneceu balanços de nitrogênio que não diferiram significativamente entre as duas dietas, isto é, em termos absolutos a quantidade de nitrogênio retido foi a mesma para as duas dietas.

A dieta AIN-76 apresentou maior digestibilidade aparente (96,35%), indicando que em relação ao nitrogênio ingerido maior quantidade de nitrogênio protéico foi digerida pelas enzimas digestivas. A dieta NUVILAB CR-1 autoclavável apresentou 76,47% de digestibilidade aparente. Deve-se levar em consideração o tratamento térmico ao qual a dieta de ingredientes naturais foi submetida. De acordo com BENDER (1972), o prejuízo protéico pela autoclavagem pode ser decorrente da modificação nas ligações entre aminoácidos, retardando sua liberação durante a digestão, da formação de ligações entre aminoácidos e outras substâncias, evitando a digestão das proteínas, com implicações diretas na digestibilidade das proteínas, o que neste trabalho

pode ser evidenciado pela grande perda de nitrogênio através das fezes, resultante da não digestão do material protéico.

O valor biológico aparente foi superior para a dieta NUVILAB CR-1 autoclavável (78,76%), indicando melhor utilização do nitrogênio absorvido para síntese protéica, em relação à dieta AIN-76 (70,06%). Entretanto, as diferenças não foram significativas ($p < 0,05$).

A dieta AIN-76 apresentou maior NPU aparente (67,5%), isto é, melhor retenção de nitrogênio em relação à quantidade ingerida de nitrogênio; o menor NPU aparente verificado para a dieta NUVILAB CR-1 autoclavável (60,28%) pode ser decorrente de modificações protéicas durante o processo de autoclavagem, resultando em liberação mais lenta de alguns aminoácidos no intestino e chegada retardada nos sítios de síntese de proteína no interior do corpo; pode também refletir a ingestão de resíduos de peptídeos não disponíveis (FORD, 1976). Além disso, a retenção de nitrogênio no organismo é função do padrão de aminoácidos (ALLISON, 1949), e a existência de deficiências e desbalanços na proteína dietária impede a utilização da proteína de maneira ótima (BEDFORD & SUMMERS, 1985), resultando em NPU aparente mais baixo. Entretanto, deve-se salientar que as diferenças entre o NPU aparente das duas dietas não foram estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

SGARBIERI, ANTUNES & JUNQUEIRA (1982) reportaram valores que demonstram melhor utilização da caseína para síntese protéica do que a encontrada neste trabalho, com valores de 84,0% para valor biológico aparente e 79,0% para NPU aparente. Entretanto, esses autores utilizaram uma concentração de proteína

na dieta de 10%, contra 22,97% apresentada pela dieta AIN-76 neste trabalho. A utilização da proteína cai conforme aumenta sua concentração na dieta. Neste trabalho, os índices foram obtidos com a utilização de dietas no seu nível protéico próprio. Assim, esses índices podem ser ditos "operacionais", medindo o valor protéico global da dieta em um nível particular de proteína, isto é, refletindo a qualidade e a menor utilização devido à concentração aumentada de proteína (PELLETT, 1978).

Assim, a dieta NUVILAB CR-1 autoclavável se mostrou comparável à dieta AIN-76 em termos de retenção de nitrogênio, além de proporcionar ganho de peso adequado, embora com maior consumo de dieta, indicando menor eficiência alimentar.

4.3 Avaliação microbiológica

A qualificação microbiológica da ração NUVILAB CR-1 autoclavável foi feita através de 5 coletas (em tempos e lotes distintos) de amostras da ração não autoclavada, autoclavada e retirada após 72 horas dos cochos dos animais.

As análises incluíram medidas de umidade, de atividade de água (a_w) e testes microbiológicos conduzidos pela utilização de metodologia tradicional e de kits de análise bacteriológica rápida.

A tabela 38 (p. 124) apresenta os valores obtidos nas determinações de umidade e atividade de água.

Os níveis de garantia especificados no rótulo da ração indicam um conteúdo máximo de umidade para a dieta NUVILAB CR-1 autoclavável de 12,50%. Os resultados obtidos indicaram níveis

adequados para a ração não autoclavada, dentro dos limites especificados. Em alguns casos, o teor de umidade se elevou na ração autoclavada, atingindo, durante a permanência nos cochos, níveis próximos aos anteriores à autoclavagem e portanto, adequados.

A atividade de água é um dos parâmetros mais importantes que influenciam o desenvolvimento de microorganismos em alimentos, e o seu valor indica a disponibilidade de água para o crescimento de microorganismos, assim como para a ocorrência de outras reações, com influência sobre o tempo de estocagem e integridade dos alimentos.

A ração NUVILAB CR-1 autoclavável na forma não autoclavada apresentou valores na faixa de 0,645-0,678. Após autoclavagem, a ração apresentou valores maiores, 0,722-0,752, à exceção da amostra da segunda coleta, com um valor de 0,590. Observa-se que para a ração coletada nos cochos dos animais houve um abaixamento para valores próximos aos anteriores à autoclavagem, à exceção da segunda coleta, que manteve o nível determinado para a dieta recém-autoclavada.

De acordo com UBOLDI EIROA (1981), a ração NUVILAB CR-1 autoclavável, do ponto de vista microbiológico, pode ser classificada quanto à atividade de água em alimento de atividade de água intermediária ($0,60 < a_w < 0,85$). Nesta faixa, o crescimento de microorganismos é limitado, com deterioração bacteriana restrita às bactérias halófilas (para alimentos salgados) e deterioração por bolores xerófilos ou leveduras osmófilas. De acordo com MOSSEL (1975), as faixas de atividade de água que permitem crescimento são de 0,80-0,75, 0,75-0,65 e 0,65-0,60 para

bactérias halófilas, bolores xerófilos e leveduras osmófilas, respectivamente. Nestes alimentos não há crescimento de bactérias patogênicas, que de um modo geral apresentam a faixa de atividade de água mínima para crescimento de 0,83-0,999 (TROLLER, 1973).

Para a ração NUVILAB CR-1 autoclavável a deterioração pode ser restrita a alguns bolores xerófilos, que apresentam um valor de atividade de água mínima para crescimento de 0,65. Entretanto, a maioria apresenta o valor de 0,80, e a faixa de 0,70-0,75 geralmente tem sido considerada como limite mínimo para o desenvolvimento destes microorganismos (UBOLDI EIROA, 1981).

O aumento de atividade de água observado na ração autoclavada provavelmente pode ser atribuído à migração de vapor úmido durante o processo de autoclavagem, desde que a mesma foi conduzida em recipientes perfurados, com exposição da ração ao ambiente de autoclavagem. Entretanto, o risco de deterioração da ração, decorrente da atividade de água mais elevada, pode ser não considerado, pois a ração não é armazenada por longos períodos nesta condição, sendo distribuída aos animais no mesmo dia da autoclavagem. Além disso, nota-se que a situação foi temporária, o que pode ser evidenciado pelo abaixamento de atividade de água verificado na ração para níveis próximos aos anteriores à autoclavagem.

Deve-se observar que a atividade de água da ração não autoclavada é decorrente principalmente das características da própria ração e das condições determinadas pelo fabricante, pois é mantida em embalagens que limitam a sua exposição às condições ambientais. Nos cochos dos animais, a ração está sujeita às condições de umidade do ambiente (sala) e do microambiente (caixa

dos animais). De acordo com dados fornecidos pelo biotério, a umidade relativa das salas atinge valores que se situam na faixa de 60 a 70%. Entretanto, em situações de maior umidade do ar externo, a umidade relativa pode atingir valores mais altos devido à inexistência de desumidificadores. O NRC recomenda a manutenção da umidade relativa em níveis de 40 a 70% (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1977). Deve-se considerar diferenças nas trocas de ar do microambiente, que podem causar umidades relativas mais elevadas do que as encontradas nas salas dos animais.

Os valores obtidos nas análises das amostras de ração autoclavada e retirada dos cochos dos animais referentes à segunda coleta revelaram uma situação anormal de atividade de água, com valores inferiores aos das demais coletas, provavelmente devido a diferenças no tratamento térmico ao qual a ração foi submetida. Alimentos com $a_w < 0,60$ são classificados como de baixa atividade de água, apresentando estabilidade microbiológica, isto é, não permitem a proliferação microbiana (MOSSEL, 1975; UBOLDI EIROA, 1981).

Neste trabalho foram conduzidos quatro ensaios microbiológicos para a qualificação microbiológica da ração NUVILAB CR-1 autoclavável e os resultados obtidos estão apresentados nas tabelas 39 a 41 (p. 124 e 125).

No primeiro e segundo ensaios foi utilizada a metodologia tradicional de análise microbiológica (tabela 39, p. 124); no terceiro, foram conduzidos testes com kits de análise bacteriológica rápida paralelamente à metodologia tradicional (tabela 40, p. 125), enquanto que no quarto, foram utilizadas apenas os kits de análise bacteriológica rápida (tabela 41, p.

A análise das tabelas indica que, de modo geral, os resultados obtidos nos ensaios microbiológicos realizados no intervalo de 13 meses foram semelhantes entre os ensaios, com diferenças mais evidentes nos resultados obtidos para a ração autoclavada nos testes de "contagem total em placas de mesófilos aeróbios" e de "bolores e leveduras". A semelhança encontrada pode ser explicada pela qualidade microbiológica estável apresentada pela ração não autoclavada no decorrer do tempo. Entretanto, pode-se notar uma exceção no segundo ensaio para o teste de *Bacillus cereus*, o qual indicou contagem superior deste microorganismo na ração não autoclavada, quando comparada às contagens do primeiro e do terceiro ensaios. Os resultados obtidos nos testes de contagem total e bolores e leveduras para a ração não autoclavada foram bastante semelhantes aos encontrados por FULLERTON *et alii* (1982) para a dieta de ingredientes naturais NIH-07, com níveis de $1,7 \times 10^5$ UFC/g e $6,0 \times 10^2$ UFC/g para contagem total e bolores, respectivamente.

A amostra de ração autoclavada referente ao segundo ensaio foi a que evidenciou maior redução na contagem de bactérias totais, quando comparada à amostra de ração não autoclavada. Entretanto, tal fato não pode ser explicado com base no tratamento térmico recebido, desde que o mesmo apresentou as condições mais brandas ($121^\circ\text{C}/10$ minutos), quando comparadas às dos demais tratamentos (tabela 38, p. 124). Assim, podem ter ocorrido diferenças quanto à coleta das amostras de ração.

De um modo geral, observa-se que a contaminação ocorrente após distribuição da ração aos animais foi baixa, com

manutenção, na maioria dos casos, dos níveis obtidos para a ração autoclavada.

Neste trabalho, para a enumeração de *S. aureus* foi utilizada a metodologia recomendada pelo ICMSF (1983), a qual utiliza inóculos de 0,1 ml; a presença deste microorganismo não foi detectada em nenhum dos ensaios; desde que a ração pode apresentar contaminação muito baixa, recomenda-se a utilização dos procedimentos descritos por TATINI *et alii* (1984), os quais permitem aumento da sensibilidade do método pela utilização de inóculos maiores (> 1ml).

Bactérias coliformes e coliformes fecais não foram detectadas na ração. No primeiro ensaio, obteve-se positividade na produção de gás no teste de coliformes totais para a ração não autoclavada; entretanto, o resultado foi referido como "presuntivo", desde que não foi realizado o teste confirmatório. A ausência de coliformes representa uma indicação de condições sanitárias adequadas (MISKIMIN *et alii*, 1976).

A análise das amostras revelou ausência de *Salmonella* em todos os ensaios.

Em relação ao teste de clostrídios sulfito-redutores, no primeiro e no segundo ensaios foi determinado o número de esporos de *Desulfotomaculum nigrificans*, microorganismo responsável pelo fenômeno de deterioração sulfídrica. As análises revelaram ausência de esporos nas diversas formas de ração. Esta determinação é aplicável principalmente para ingredientes a serem usados para produção de alimentos enlatados (SPECK & GRAVES, 1984). Assim, no terceiro ensaio adotou-se a metodologia para *Clostridium perfringens*, com a caracterização de clostrídios

sulfito-redutores feita pela incubação a 46 °C por 24 horas em anaerobiose (ABIA, 1989). Os resultados indicaram uma baixa contagem para a ração não autoclavada, sem detecção para as demais formas de ração.

Quanto à *Bacillus cereus*, não houve detecção na ração autoclavada, enquanto que a ração retirada dos cochos evidenciou crescimento apenas para o segundo ensaio, com resultados superiores também para a ração não autoclavada. A determinação de *Bacillus cereus* foi presuntiva, desde que não foram realizados testes confirmatórios necessários para estabelecer a identidade as colônias presuntivas, conforme descrito por HARMON & GOEPFERT (1984).

Os resultados obtidos pela utilização de kits de análise bacteriológica rápida (tabela 41, p. 125) indicam que em muitos casos a contaminação não foi detectável, desde que o teste apresenta o limite mínimo de detecção de 10^4 . Assim, em amostras onde a contaminação é inferior a esta concentração, o resultado é indicado por "< 10^4 ". No terceiro ensaio, estas análises foram conduzidas paralelamente às da metodologia tradicional, permitindo comparações entre ambas: nota-se que sempre que a contaminação foi detectável para as duas metodologias, os resultados obtidos pelo teste rápido foram superiores (1 a 2 log) aos da metodologia tradicional, o que pode ser observado nos testes de contagem total para todas as formas analisadas de ração e de bolores e leveduras para a ração não autoclavada; microorganismos não detectados ou detectados em níveis inferiores a 10^4 pela metodologia tradicional não mostraram evidência de crescimento nos kits de análise bacteriológica rápida, à exceção

de *S. aureus* que apresentou contagem de 10^5 na avaliação pelos kits de análise rápida, sem ocorrência de detecção quando analisada pela metodologia tradicional.

No quinto ensaio, foram utilizados apenas os kits de análise rápida. Os resultados indicaram que para contagem total e bolores e leveduras os níveis foram bastante próximos entre as diversas formas analisadas de ração, com pequena ou nenhuma redução na contagem após autoclavagem. Coliformes totais não foram detectados, enquanto que para *S. aureus* houve detecção apenas na ração retirada dos cochos; entretanto, este último resultado deve ser aceito com restrições, devido às comparações estabelecidas no terceiro ensaio com a análise pela metodologia tradicional.

A utilização de kits de análise bacteriológica rápida representa uma alternativa para a metodologia convencional, enquadrando-se no contexto do desenvolvimento de procedimentos e técnicas que forneçam resultados mais rápidos para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos e que possuam sensibilidade superior ou comparável à dos métodos convencionais (DZIEZAK, 1987).

Entretanto, os resultados encontrados neste trabalho foram controversos entre as duas metodologias e a decisão sobre a adequação dos kits na qualificação microbiológica da ração deve incluir mais análises paralelas às da metodologia tradicional.

Diante dos resultados obtidos, a qualificação microbiológica da ração exige a existência de padrões microbiológicos.

Padrões foram publicados para dietas de ingredientes

naturais não esterilizadas, estabelecendo tipos e níveis aceitáveis de microorganismos (CLARKE *et alii*, 1977), os quais já foram citados neste trabalho.

No Brasil, a legislação referente à alimentação animal é limitada e parcialmente desconhecida, e as indústrias têm aplicado procedimentos diversos para avaliação de rações e de matérias-primas utilizadas na alimentação animal.

De acordo com SILVA (1982), a DIFISA (Divisão de Fiscalização de Alimentos para Animais) do Ministério da Agricultura é o órgão competente para executar a fiscalização do setor de alimentos para animais em todo o território nacional, desde a produção até a comercialização, abrangendo os aspectos industrial, bromatológico e higiênico-sanitário. O autor descreve ainda sobre a inspeção e a fiscalização de alimentos para animais no Brasil, tendo como base a legislação vinculada ao setor.

Em 1988, foi publicada a Portaria nº 07, de 09 de novembro de 1988, da Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária, estabelecendo os padrões mínimos das diversas matérias-primas empregadas na alimentação animal (BRASIL, 1988). Microbiologicamente, os padrões preconizam a ausência de microorganismos patogênicos somente em produtos de origem animal. De acordo com informações recebidas no Departamento de Serviço de Análises de Ração da Coordenadoria de Assistência Técnica Integral (CATI), as análises de microorganismos patogênicos se referem a *Salmonella*, *E. coli* e fungos.

Em 1991, foi publicada a Portaria nº 108, de 04 de setembro de 1991, do Ministério da Agricultura e Reforma Agrária, aprovando os métodos analíticos para controle de alimentos para

uso animal, constituindo-se em métodos físicos, químicos e microbiológicos (BRASIL, 1991). Os métodos microbiológicos incluíram contagem de bolores e leveduras, contagem de *E. coli*, pesquisa de *Salmonella* e contagem de enterobactérias totais viáveis, sendo aplicados em produtos e sub-produtos de origem animal, rações e concentrados.

A inexistência de padrões microbiológicos no Brasil tem levado as indústrias a aplicarem procedimentos diversos, com utilização de padrões internos ou mesmo de padrões utilizados em outros países.

A indústria que fabrica a ração sob estudo (Nuvital Nutrientes Ltda.) nos informou que baseia suas recomendações técnicas nas normas microbiológicas para rações utilizadas na Holanda (tabela 42, p. 125) (GEMAEEL, 1990, comunicação pessoal).

O estabelecimento de comparações entre os valores encontrados neste trabalho (tabelas 39 e 40, p. 124 e 125) com os padrões exigidos para rações peletizadas (tabela 42, p. 125) indica que a ração NUVILAB CR-1 autoclavável não autoclavada atende os níveis requeridos.

Com relação à ração autoclavada, a exigência é de esterilidade, desde que o tratamento térmico objetivava a obtenção de tal condição. Diversas condições de aplicação de calor têm sido descritas na literatura (FOSTER *et alii*, 1964; WILLIAMS *et alii*, 1968; FORD, 1976; OLLER *et alii*, 1985). Neste trabalho, as condições de autoclavagem variaram no decorrer dos diversos ensaios (tabela 38, p. 124), de acordo com informações recebidas no biotério por ocasião do recebimento das amostras. Entretanto, fica evidente que a ração não foi esterilizada, o que

sugere a existência de falhas no processo de autoclavagem, podendo ter ocorrido também falhas na amostragem da ração, com influência sobre os resultados.

Assim, a ração na forma recebida se mostrou correta, dentro dos padrões utilizados pela firma produtora, embora com especificação microbiológica restrita, devido à inexistência de padrões mais amplos. Entretanto, a esterilidade da ração não foi alcançada, o que pode representar riscos para os animais alimentados com a mesma, sugerindo-se uma revisão nos processos de autoclavagem, assim como na amostragem da ração.

TABELA 24. Conteúdo protéico das dietas de ingredientes naturais.

Dietas	Conteúdo protéico ^a (%)
NUVILAB CR-1 autoclavável autoclavada	22,64 ± 0,66
	26,98 ± 1,13
	22,35 ± 5,19
	23,42 ± 0,08
	23,63 ± 0,07
	21,92 ± 0,36
	22,44 ± 0,35 ^b
Rações para ensaio produzidas por Nuvital Nutrientes Ltda.	
-NUVITAL 18% vegetal não autoclavada autoclavada ^b	17,14 ± 0,30
	16,46 ± 0,25
-NUVITAL 22% vegetal não autoclavada autoclavada ^b	21,95 ± 0,06
	21,69 ± 0,35

^a Média ± desvio-padrão.
^b 125 °C/20 minutos.

TABELA 25. Composição de aminoácidos das proteínas da dieta comercial "NUVILAB CR-1 autoclavável" e das rações para ensaio "NUVITAL 18% vegetal" e "NUVITAL 22% vegetal", em g/100 g de proteína (XP) ou em g/100 g de dieta (XD).

Aminoácidos ^a	NUVILAB CR-1 autoclavável ^b		NUVITAL 18% vegetal ^a		NUVITAL 22% vegetal ^a	
	XP	XD	XP	XD	XP	XD
ASP	12,26	2,75	12,79	2,10	14,34	3,14
THR	4,09	0,92	4,44	0,73	4,53	1,01
SER	4,56	1,02	5,34	0,88	5,21	1,14
GLU	22,48	5,04	22,26	3,66	23,30	5,10
PRO	6,61	1,48	7,44	1,22	6,68	1,46
GLY	6,08	1,37	5,02	0,83	5,28	1,16
ALA	5,59	1,26	5,75	0,95	5,79	1,27
CYS	0,61	0,14	0,88	0,14	0,87	0,19
VAL	5,18	1,16	5,26	0,86	5,78	1,26
MET	1,54	0,34	1,97	0,32	1,58	0,35
MET+CYS	2,15	0,48	2,85	0,46	2,45	0,54
ILE	4,17	0,94	4,79	0,79	5,11	1,12
LEU	6,73	1,51	8,39	1,38	8,42	1,84
TYR	2,85	0,64	3,45	0,57	3,14	0,69
PHE	4,49	1,01	4,79	0,79	5,17	1,13
PHE+TYR	7,34	1,65	8,24	1,36	8,31	1,82
LYS	4,95	1,11	5,54	1,08	5,33	1,17
HIS	2,41	0,54	2,88	0,47	2,86	0,63
ARG	6,66	1,50	6,50	1,07	7,21	1,58
TRP	1,06	0,24	1,52	0,25	1,30	0,28

^a Notação internacional
^b Teor protéico: (22,44 ± 0,35)%
^c Teor protéico: (16,45 ± 0,25)%
^d Teor protéico: (21,69 ± 0,35)%

TABELA 26. Composição de aminoácidos das proteínas da dieta comercial "NUVILAB CR-1 autoclavável (NV-CR-1)" e das reações para ensaio "NUVITAL 18% vegetal (NV-18%)" e "NUVITAL 22% vegetal (NV-22%)", comparativamente aos requerimentos para ratos e camundongos recomendados pelo NRC (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1978), expressos como porcentagem da proteína.

Aminoácidos	NV-CR-1	NV-18%	NV-22%	Requerimentos NRC	
				Rato	Camundongo
Essenciais					
ILE	4,17	4,79	5,11	4,17	3,20
LEU	6,73	8,39	8,42	6,25	5,60
LYS	4,95	6,54	5,93	5,83	3,20
PHE (+TYR)	7,34	8,24	8,31	6,67	3,20
MET (+CYS)	2,16	2,85	2,46	5,00	4,00
THR	4,09	4,44	4,63	4,17	3,20
TRP	1,08	1,52	1,30	1,25	0,80
VAL	5,18	5,25	5,78	5,00	4,00
HIS	2,41	2,88	2,86	2,50	1,60
ARG	6,66	6,50	7,21	5,00	2,40
Não essenciais					
ASP	12,26	12,79	14,34	3,33	-
GLU	22,48	22,26	23,30	33,30	-
PRO	8,61	7,44	6,68	3,33	-
GLY+ALA+SER	16,24	16,11	16,28	4,92	-
Total					
Essenciais	44,76	51,40	51,40	45,84	31,20
Não essenciais	57,59	58,60	60,60	44,88	-

TABELA 27. Adequação aminoacídica das rações: relação expressa em porcentagem entre o conteúdo dos aminoácidos nas proteínas das dietas experimentais e os requerimentos do NRC (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1978) para ratos (R) e camundongos (C).

Aminoácidos	NUVILAB CR-1 autoclavável	NUVITAL 18% vegetal	NUVITAL 22% vegetal
Essenciais			
ILE	R 100,00	114,87	122,54
	C 130,32	149,69	159,69
LEU	R 107,68	134,24	134,72
	C 120,18	149,82	150,36
LYS	R 84,91	112,18	91,42
	C 154,69	204,38	166,56
PHE (+TYR)	R 110,04	123,54	124,53
	C 229,38	257,50	259,89
MET (+CYS)	R 43,00	57,00	49,00
	C 53,75	71,25	61,25
THR	R 98,08	106,47	111,03
	C 127,82	138,75	144,69
TRP	R 86,40	121,60	104,00
	C 135,00	190,00	162,50
VAL	R 103,60	106,00	115,60
	C 129,60	131,25	144,50
HIS	R 96,40	115,20	114,40
	C 150,63	180,00	178,75
ARG	R 133,20	130,00	144,20
	C 277,50	270,83	300,42
Não essenciais			
ASP	R 368,17	384,08	430,63
	C 67,51	66,85	59,97
GLU	R 198,50	223,42	200,60
	C 330,08	327,44	330,89
GLY+ALA+SER	R -	-	-
	C -	-	-

TABELA 28. Composição de aminoácidos das proteínas das dietas experimentais "NUVILAB CR-1 autoclavável (NV-CR-1)", "NUVITAL 18% vegetal (NV-18%)", e "NUVITAL 22% vegetal (NV-22%)", comparativamente às dietas recomendadas NIH-07, NIH-42 e NIH-autoclavável (NIH-aut), expressa como porcentagem da proteína.

Aminoácidos	NV-CR-1 (22,44) ^b	NV-18% (16,45)	NV-22% (21,86)	NIH-07 ^a (23,97)	NIH-42 ^a (18,04)	NIH-aut ^a (17,9)
ARG	8,88	6,50	7,21	5,42	4,76	5,03
LYS	4,95	6,54	5,33	5,34	4,17	4,75
MET	1,54	1,97	1,58	2,21	2,27	1,96
CYS	0,61	0,88	0,57	1,54	1,62	1,40
MET+CYS	2,15	2,85	2,45	3,75	3,89	3,36
TRP	1,08	1,52	1,30	1,24	1,11	1,12
GLY	6,09	5,02	5,28	4,84	4,32	5,31
HIS	2,41	2,88	2,86	2,25	2,48	2,12
LEU	6,73	8,39	8,42	8,18	10,30	7,82
ILE	4,17	4,79	5,11	4,71	5,23	5,31
PHE	4,49	4,78	5,17	4,67	5,69	4,75
TYR	2,85	3,45	3,14	-	-	3,36
PHE+TYR	7,34	8,24	8,31	-	-	8,10
THR	4,09	4,44	4,63	4,09	3,84	3,83
VAL	5,18	5,25	5,78	5,17	5,70	5,03

^a NIH-07: de acordo com Knapka et alii (1974) e AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION (1977). (1990, idem rodapé p. 54).
^b NIH-42: de acordo com Knapka (1990, idem rodapé p. 54).

NIH-autoclavável: de acordo com Knapka (1990, idem rodapé p. 54).
 Os valores entre parênteses indicam o conteúdo protéico das dietas expressos em porcentagem.

TABELA 29. Dietas utilizadas nos ensaios para avaliação da EPop e seus respectivos conteúdos de proteína.

Ensaio	Conteúdo de proteína (% da dieta)
Primeiro ensaio	
AIN-76	19,67 ± 0,48
NUVILAB CR-1 autoclavável	22,64 ± 0,68
Segundo ensaio	
AIN-76	22,19 ± 0,38
NUVILAB CR-1 autoclavável	25,98 ± 1,13
Terceiro ensaio	
AIN-76	20,88 ± 0,08
NUVILAB CR-1 autoclavável	22,36 ± 5,19
Quarto ensaio	
AIN-76	24,95 ± 0,41
NUVILAB CR-1 autoclavável	23,42 ± 0,08
NUVITAL 22% vegetal	23,58 ± 0,17
Quinto ensaio	
AIN-90	17,78 ± 0,06
NUVILAB CR-1 autoclavável	23,53 ± 0,07

TABELA 30. Valores obtidos no primeiro ensaio biológico para avaliação da EPop, realizado com ratos Wistar recém-desmamados, submetidos às dietas por um período de 28 dias: peso inicial, peso final, ganho de peso, consumo alimentar, coeficiente de eficiência alimentar (CEA), proteína ingerida e EPop.

	AIN-76	NUVILAB CR-1 autoclavável
Peso inicial (g)	62,9 ± 3,8	69,9 ± 4,8
Peso final (g)	212,5 ± 21,2	177,5 ± 20,9
Ganho de peso (g)	149,6 ± 18,5 ^a	107,6 ± 23,5 ^b
Consumo alimentar (g)	444,50 ± 42,93 ^a	459,04 ± 38,95 ^a
CEA	0,34 ± 0,03 ^a	0,23 ± 0,04 ^b
Proteína ingerida (g)	89,25 ± 8,63 ^a	103,93 ± 8,82 ^b
EPop	1,66 ± 0,13 ^a	1,03 ± 0,20 ^b

^a Média ± desvio-padrão para 10 e 8 animais para as dietas AIN-76 e NUVILAB CR-1 autoclavável, respectivamente.
^{a,b} Valores em uma mesma linha seguidos por letras sobrescritas diferentes diferem significativamente (p<0,05).

TABELA 31. Valores* obtidos no segundo ensaio biológico para avaliação da EPop, realizado com ratos Wistar recém-desmamados, submetidos às dietas por um período de 28 dias: peso inicial, peso final, ganho de peso, consumo alimentar, coeficiente de eficiência alimentar (CEA), proteína ingerida e EPop.

	AIN-76	NUVILAB CR-1 autoclavável
Peso inicial (g)	51,4 ± 3,8	50,3 ± 2,2
Peso final (g)	217,2 ± 20,5	204,9 ± 11,5
Ganho de peso (g)	165,8 ± 18,8 ^a	154,6 ± 10,9 ^a
Consumo alimentar (g)	403,92 ± 37,35 ^a	505,47 ± 42,85 ^b
CEA	0,41 ± 0,01 ^a	0,31 ± 0,01 ^b
Proteína ingerida (g)	89,63 ± 8,29 ^a	131,32 ± 11,13 ^b
EPop	1,85 ± 0,06 ^a	1,18 ± 0,05 ^b

* Média ± desvio-padrão para 10 e 8 animais para as dietas AIN-76 e NUVILAB CR-1 autoclavável, respectivamente.
^{a,b} Valores em uma mesma linha seguidos por letras sobrescritas diferentes diferem significativamente (p<0,05).

TABELA 32. Valores* obtidos no terceiro ensaio biológico para avaliação da EPop, realizado com ratos Wistar recém-desmamados, submetidos às dietas por um período de 28 dias: peso inicial, peso final, ganho de peso, consumo alimentar, coeficiente de eficiência alimentar (CEA), proteína ingerida e EPop.

	AIN-76	NUVILAB CR-1 autoclavável
Peso inicial (g)	52,0 ± 7,8	51,8 ± 11,2
Peso final (g)	213,0 ± 8,7	191,0 ± 22,1
Ganho de peso (g)	161,0 ± 8,5 ^a	139,2 ± 17,1 ^b
Consumo alimentar (g)	439,58 ± 25,77 ^a	450,98 ± 52,77 ^a
CEA	0,37 ± 0,03 ^a	0,30 ± 0,03 ^b
Proteína ingerida (g)	92,33 ± 5,41 ^a	103,03 ± 11,80 ^b
EPop	1,75 ± 0,13 ^a	1,35 ± 0,11 ^b

* Média ± desvio-padrão para grupos de 10 animais.
^{a,b} Valores em uma mesma linha seguidos por letras sobrescritas diferentes diferem significativamente (p<0,05).

TABELA 33. Valores* obtidos no quarto ensaio biológico para avaliação da EPop, realizado com ratos Wistar recém-desmamados, submetidos às dietas por um período de 28 dias: peso inicial (PI), peso final (PF), ganho de peso (GP), consumo alimentar (CA), coeficiente de eficiência alimentar (CEA), proteína ingerida (PRIN) e EPop.

	AIN-76	NUVILAB CR-1 autoclavável	NUVITAL 22% vegetal
PI (g)	60,5 ± 5,2	60,9 ± 8,2	59,8 ± 7,9
PF (g)	218,5 ± 17,4	198,2 ± 22,9	215,5 ± 24,4
GP (g)	158,0 ± 18,5 ^a	137,3 ± 26,4 ^a	155,7 ± 22,7 ^a
CA (g)	421,27 ± 38,33 ^a	521,23 ± 42,74 ^b	580,81 ± 55,18 ^c
CEA	0,38 ± 0,03 ^a	0,28 ± 0,04 ^b	0,27 ± 0,02 ^b
PRIN (g)	105,11 ± 9,06 ^a	122,07 ± 10,01 ^b	136,31 ± 13,01 ^c
EPop	1,50 ± 0,10 ^a	1,12 ± 0,15 ^b	1,13 ± 0,08 ^b

* Média ± desvio-padrão para grupos de 10 animais.
^{a,b,c} Valores em uma mesma linha seguidos por letras sobrescritas diferentes diferem significativamente (p<0,05).

TABELA 34. Valores* obtidos no quinto ensaio biológico para avaliação da EPop, realizado com ratos Wistar recém-desmamados, submetidos às dietas por um período de 28 dias: peso inicial, peso final, ganho de peso, consumo alimentar, coeficiente de eficiência alimentar (CEA), proteína ingerida e EPop.

	AIN-90	NUVILAB CR-1 autoclavável
Peso inicial (g)	82,9 ± 9,1	81,05 ± 12,4
Peso final (g)	228,7 ± 41,8	199,1 ± 41,4
Ganho de peso (g)	145,8 ± 34,6 ^a	118,0 ± 38,9 ^a
Consumo alimentar (g)	491,84 ± 28,89 ^a	526,83 ± 129,11 ^a
CEA	0,30 ± 0,07 ^a	0,23 ± 0,07 ^b
Proteína ingerida (g)	87,35 ± 5,13 ^a	124,49 ± 30,51 ^b
EPop	1,66 ± 0,37 ^a	0,99 ± 0,30 ^b

* Média ± desvio-padrão para grupos de 10 animais.
^{a,b} Valores em uma mesma linha seguidos por letras sobrescritas diferentes diferem significativamente (p<0,05).

TABELA 35. Crescimento e eficiência alimentar de ratos Wistar machos em ensaios para avaliação da EEP, obtidos nas três primeiras semanas dos experimentos.

Ensaios / dietas	Ganho de peso (g)	Ganho de peso diário(g)	Consumo (g)	CEA
Primeiro ensaio				
AIN-76	107,45	5,12	307,84	0,35
NUVILAB CR-1 autoclavável	87,88	3,23	307,88	0,22
Segundo ensaio				
AIN-76	124,60	5,93	275,35	0,45
NUVILAB CR-1 autoclavável	114,90	5,47	335,33	0,34
Terceiro ensaio				
AIN-76	120,10	5,72	298,84	0,40
NUVILAB CR-1 autoclavável	108,70	5,22	304,72	0,36
Quarto ensaio				
AIN-76	126,67	6,03	308,33	0,41
NUVILAB CR-1 autoclavável	118,48	5,64	398,80	0,30
NUVITAL 22% vegetal	132,28	6,30	432,28	0,31
Quinto ensaio				
AIN-90	122,00	6,81	354,91	0,34
NUVILAB CR-1 autoclavável	95,63	4,55	399,80	0,24

TABELA 36. Valores* obtidos no ensaio de balanço de nitrogênio de cinco dias, após adaptação de 6 dias, com ratos Wistar recém-desmamados: peso inicial, peso final, ganho de peso, consumo alimentar e coeficiente de eficiência alimentar (CEA).

	AIN-76	NUVILAB CR-1 autoclavável
Peso inicial (g)	73,56 ± 6,26	73,88 ± 5,44
Peso final (g)	100,65 ± 8,11	102,30 ± 8,20
Ganho de peso (g)	27,08 ± 2,55 ^a	28,42 ± 3,33 ^a
Consumo alimentar (g)	61,48 ± 4,08 ^a	74,31 ± 6,08 ^b
CEA	0,44 ± 0,04 ^a	0,38 ± 0,02 ^b

* Média ± desvio-padrão para grupos de 6 animais.
a,b Valores em uma mesma linha seguidos por letras sobrescritas diferentes diferem significativamente (p<0,05).

TABELA 37. Valores* obtidos no ensaio de balanço de nitrogênio de cinco dias, após adaptação de 6 dias, com ratos Wistar recém-desmamados: nitrogênio ingerido, nitrogênio fecal, nitrogênio urinário, balanço de nitrogênio (BN), digestibilidade aparente (DA), valor biológico aparente (VBA) e utilização líquida aparente da proteína (NFUA).

	AIN-76	NUVILAB CR-1 autoclavável
Nitrogênio ingerido (mg)	2.214,28 ± 146,38	2.606,54 ± 213,16
Nitrogênio fecal (mg)	81,21 ± 23,57	615,73 ± 85,38
Nitrogênio urinário (mg)	843,67 ± 216,08	426,41 ± 152,97
BN (mg)	1.489,40 ± 163,25 ^a	1.564,40 ± 126,17 ^a
DA (%)	96,35 ± 0,93 ^a	76,47 ± 1,50 ^b
VBA (%)	70,06 ± 8,87 ^a	78,76 ± 6,92 ^a
NFUA (%)	67,51 ± 6,62 ^a	80,28 ± 5,10 ^a

* Média ± desvio-padrão para grupos de 6 animais.
a,b Valores em uma mesma linha seguidos por letras sobrescritas diferentes diferem significativamente (p<0,05).

TABELA 38. Unidade e atividade de água (aw) da ração comercial NUVILAB CR-1 autoclavável.^a

Coletas ^b	Ração não autoclavada	Ração autoclavada ^c	Ração retirada dos cochos após 72 horas
Unidade			
Primeira	9,98±0,17	11,89±0,06	10,58±0,26
Segunda	11,50±0,32	10,39±0,12	10,46±0,11
Tercera	12,34±0,32	14,55±0,40	12,46±0,40
Quarta	12,13±0,07	14,42±0,08	11,42±0,03
Quinta	10,96±0,03	11,77±0,06	10,82±0,01
Aw			
Primeira	0,678±0,010	0,752±0,008	0,659±0,004
Segunda	0,648±0,003	0,590±0,002	0,593±0,002
Tercera	0,645±0,008	0,743±0,001	0,633±0,001
Quarta	0,654±0,008	0,748±0,008	0,639±0,008
Quinta	0,652±0,002	0,722±0,002	0,682±0,007

^aMédia ± desvio-padrão para análises em triplicata, com exceção para a quinta coleta, onde as amostras foram analisadas em duplicata.

^bColetas: Primeira (22/01/90); segunda (02/04/90); terceira (14/05/90); quarta (27/08/90); quinta (07/05/91).

^cCondições de autoclavagem: primeira coleta: 125 °C/10 minutos, secagem: 20 minutos; segunda coleta: 127 °C/10 minutos, secagem: 20 minutos; terceira coleta: 121 °C/10 minutos, secagem: 30 minutos; quarta coleta: 125 °C/20 minutos, secagem: 30 minutos; quinta coleta: 125 °C/30 minutos, secagem: 30 minutos.

TABELA 39. Qualificação microbiológica da ração NUVILAB CR-1 autoclavável. Primeiro e segundo ensaios.

Testes	Ração não autoclavada	Ração autoclavada	Ração retirada dos cochos após 72 horas
Contagem total em placas de meios filosa aeróbica (UFC/g)	3,0x10 ⁴ 1,7x10 ⁵	6,8x10 ³ 2,5x10 ¹ Est	1,4x10 ⁴ 1,6x10 ³
Bolores e leveduras (UFC/g)	2,8x10 ² 3,5x10 ² Est	2,0x10 ² 4,0x10 ¹ Est	<1,0x10 ¹ Est 6,5x10 ¹ Est
<i>Staphylococcus aureus</i> (colônias/g)	<1,0x10 ² Est <1,0x10 ² Est	<1,0x10 ² Est <1,0x10 ² Est	<1,0x10 ² Est <1,0x10 ² Est
Coliformes totais (NMP/g)	5 ^d <3	<3 <3	<3 <3
Coliformes fecais (NMP/g)	<3 <3	<3 <3	<3 <3
<i>Salmonella</i> (em 25 gramas)	ausente ausente	ausente ausente	ausente ausente
Clostrídios sulfito-redutores (esporos/10g)	ausente ausente	ausente ausente	ausente ausente
<i>Bacillus cereus</i> (colônias/g) ^a	5,5x10 ² Est 4,0x10 ⁴ Est	<1,0x10 ² Est <1,0x10 ² Est	<1,0x10 ² Est 4,5x10 ² Est

^aLinhas superiores: primeiro ensaio; linhas inferiores: segundo ensaio.

^bUFC, unidades formadoras de colônias.

^cNMP, número mais provável.

^dDeterminação presumtiva.

TABELA 40. Qualificação microbiológica da ração NUVILAB CR-1 autoclavável. Terceiro ensaio.

Testes	Ração não autoclavada	Ração autoclavada	Ração retirada dos cochos após 72 horas
Contagem total em placas de meios aeróbios (UFC/g)	6,9x10 ⁴	3,1x10 ²	5,1x10 ³
Bolores e leveduras (UFC/g)	1,3x10 ²	<1,0x10 ¹ Est	5,5x10 ¹ Est
<i>Staphylococcus aureus</i> (colônias/g)	<1,0x10 ² Est	<1,0x10 ² Est	<1,0x10 ² Est
Coliformes totais (NMP/g)	<3	<3	<3
Coliformes fecais (NMP/g)	<3	<3	<3
<i>Salmonella</i> (em 25 gramas)	ausente	ausente	ausente
Clostrídios sulfito-redutores (colônias/g) ^a	9,0x10 ¹ Est	<1,0x10 ¹ Est	<1,0x10 ¹ Est
<i>Bacillus cereus</i> (colônias/g) ^a	1,4x10 ²	<1,0x10 ² Est	<1,0x10 ² Est

^aUFC, unidades formadoras de colônias.
^bNMP, número mais provável.
^cDeterminação presumitiva.

TABELA 41. Qualificação microbiológica da ração NUVILAB CR-1 autoclavável com kits de análise bacteriológica rápida. Terceiro e quarto ensaios.

Testes	Ração não autoclavada	Ração autoclavada	Ração retirada dos cochos após 72 horas
Contagem total (colônias/g)	<10 ⁵ <10 ⁶	10 ⁴ 10 ⁶	10 ⁵ 10 ⁶ -10 ⁸
Bolores e leveduras (colônias/g)	10 ⁴ 10 ⁴ -10 ⁶	<10 ⁴ 10 ⁴ -10 ⁶	<10 ⁴ 10 ⁵
Coliformes totais (colônias/g)	<10 ⁴ <10 ⁴	<10 ⁴ <10 ⁴	<10 ⁴ <10 ⁴
<i>Staphylococcus aureus</i> (colônias/g)	10 ⁵ <10 ⁴	<10 ⁴ <10 ⁴	<10 ⁴ 10 ⁶

^aLinhas superiores: terceiro ensaio.
^bLinhas inferiores: quarto ensaio.

TABELA 42. Normas microbiológicas para rações utilizadas na Holanda (GEMEL, 1990, comunicação pessoal).

Microorganismo	Nível de qualidade	
	Bom	Inaceitável
Rações extrusadas		
Contagem total/g	<10 ⁶	10 ⁶ -10 ⁷
Enterobactérias/g	<10 ¹	10 ¹ -10 ⁴
Fungos/g	<10 ³	10 ³ -10 ⁴
<i>E. coli</i> em 0,1g	ausente	presente
<i>Salmonella</i> em 25g	ausente	ausente
Rações peletizadas		
Contagem total/g	<10 ⁶	10 ⁶ -10 ⁷
Enterobactérias/g	<10 ²	10 ² -10 ⁴
Fungos/g	<10 ³	10 ³ -10 ⁴
<i>E. coli</i> em 0,1g	ausente	presente
<i>Salmonella</i> em 25g	ausente	ausente
Rações farejadas		
Contagem total/g	<10 ⁶	10 ⁷
Enterobactérias/g	<10 ⁴	10 ⁴ -10 ⁵
Fungos/g	<10 ⁴	10 ⁴ -10 ⁶
<i>E. coli</i> em 0,1g	ausente	presente
<i>Salmonella</i> em 25g	ausente	ausente

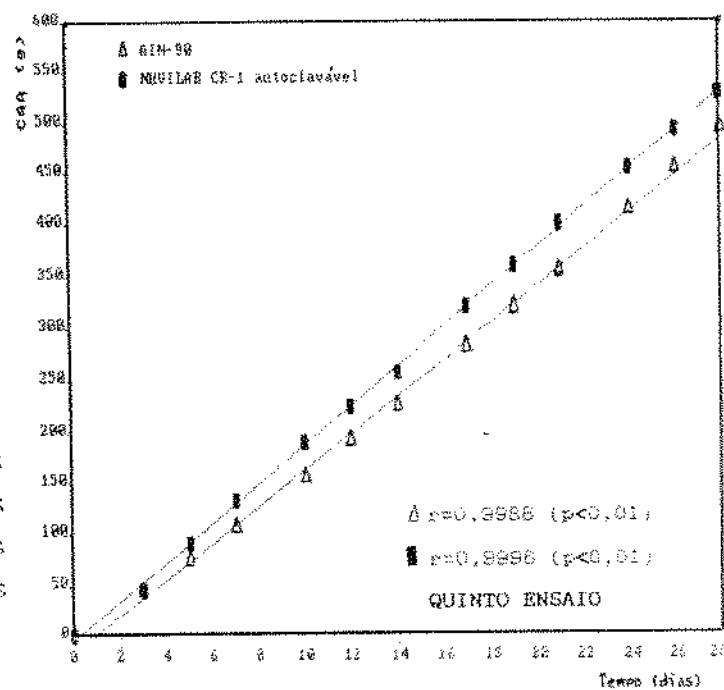
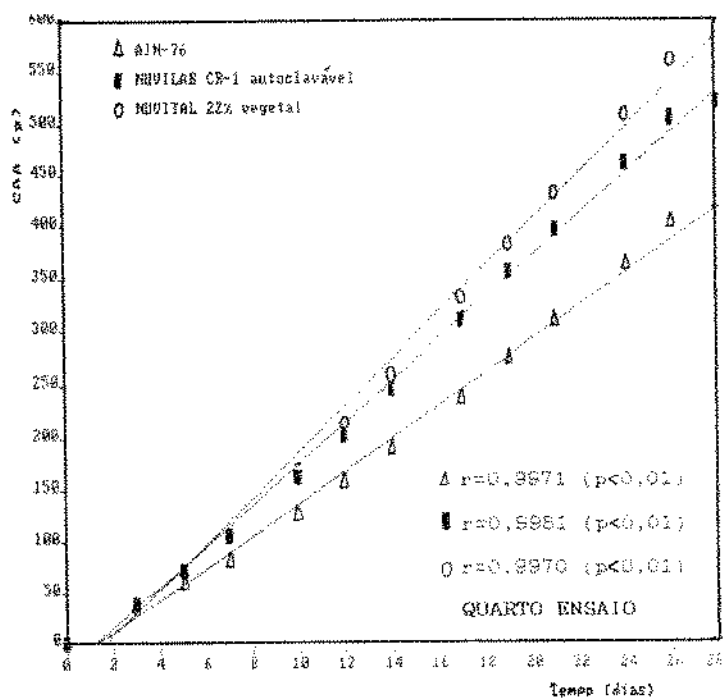
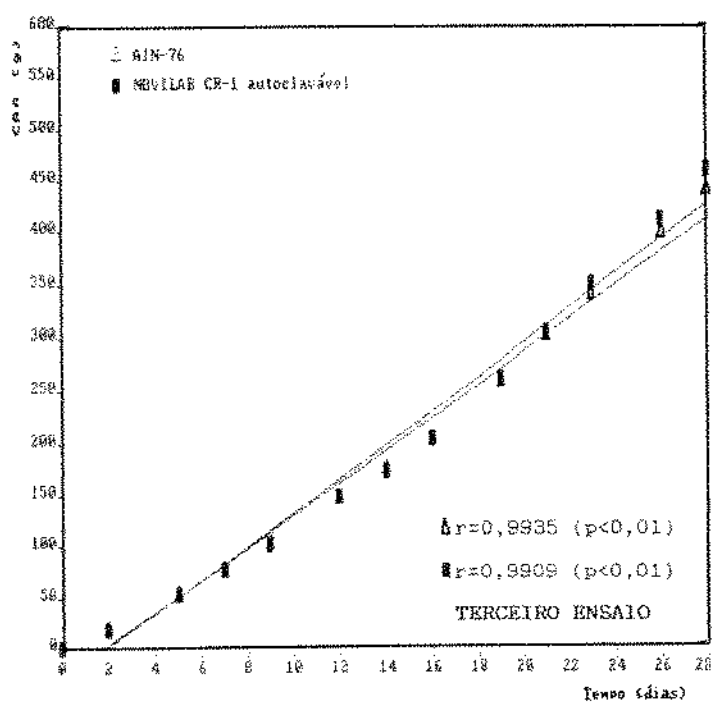
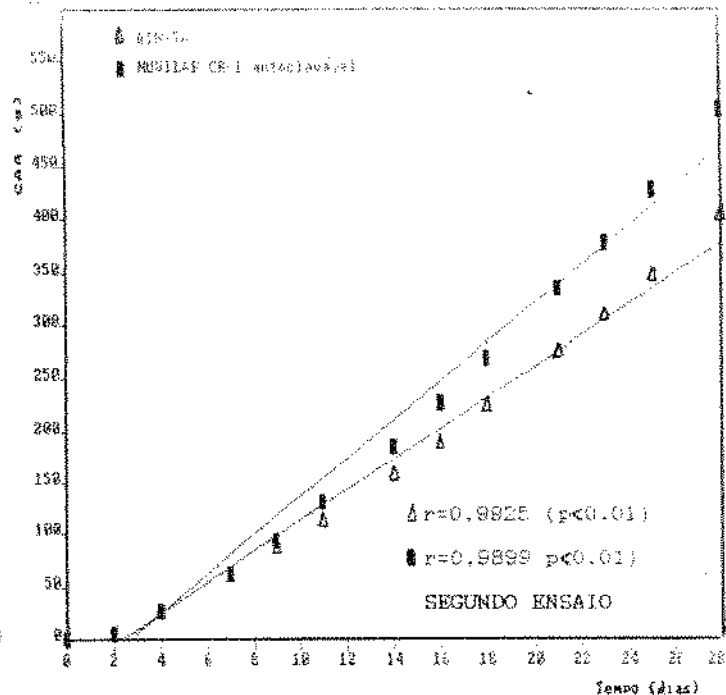
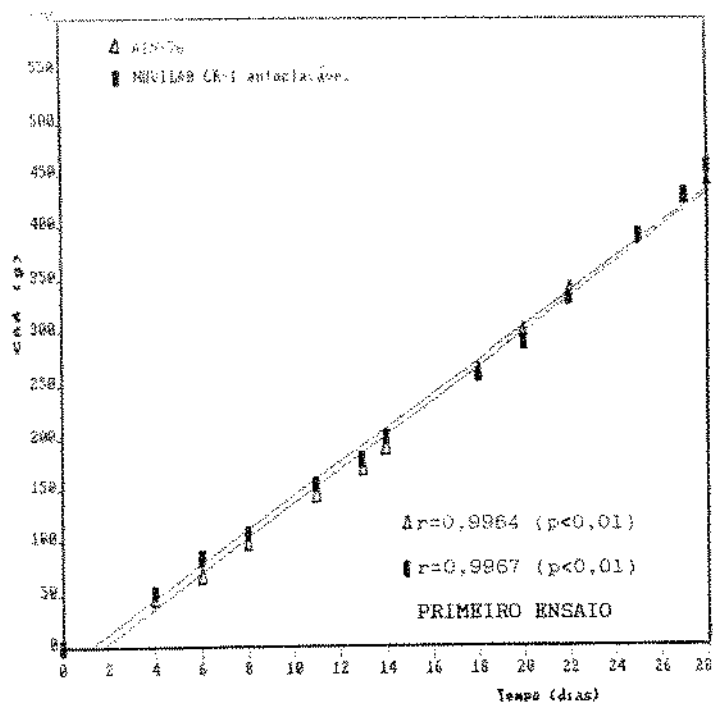


FIGURA 1. REGRESSÃO LINEAR OBTIDA PARA PARA CONSUMO ALIMENTAR ACUMULADO (CAA) EM FUNÇÃO DO TEMPO DE EXPERIMENTO, PARA RATOS WISTAR MACHOS ALIMENTADOS COM AS DIETAS DISCRIMINADAS NOS RESPECTIVOS ENSAIOS PARA AVALIAÇÃO DA EPOP.

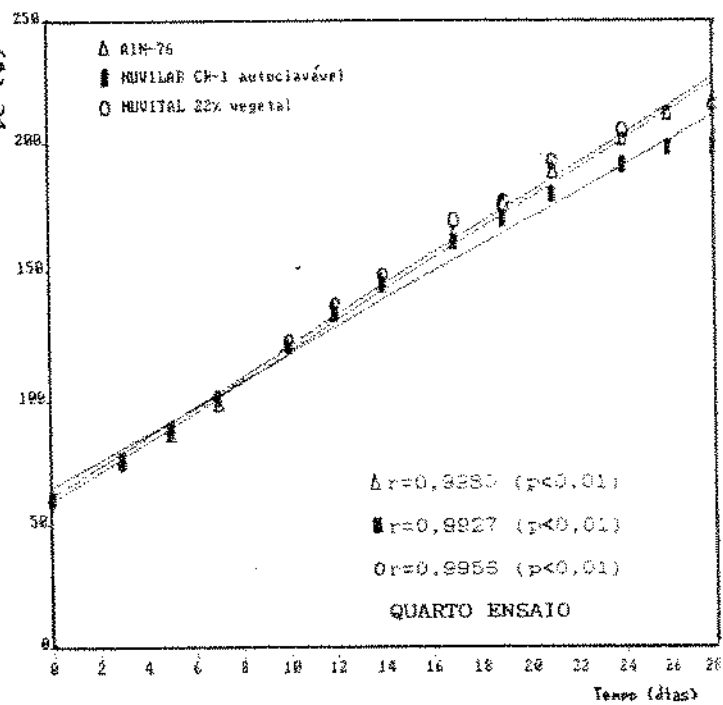
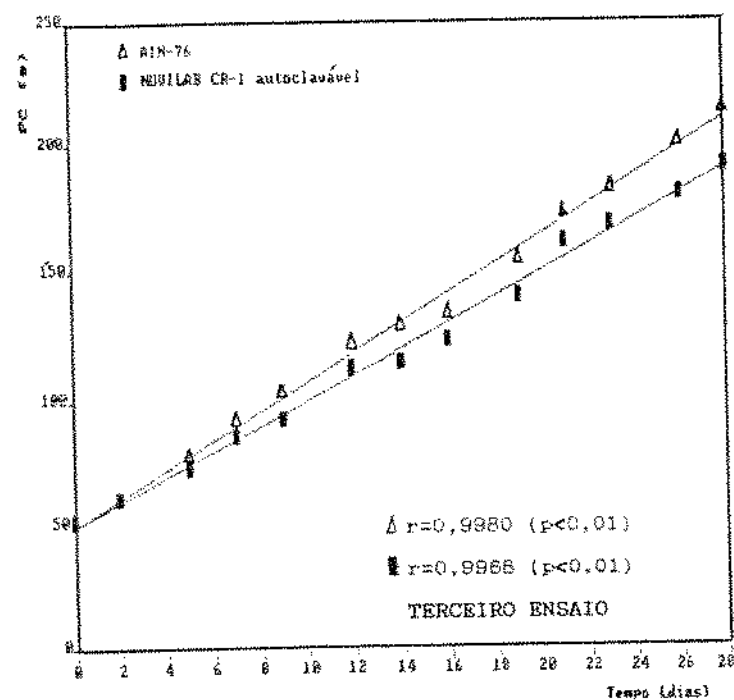
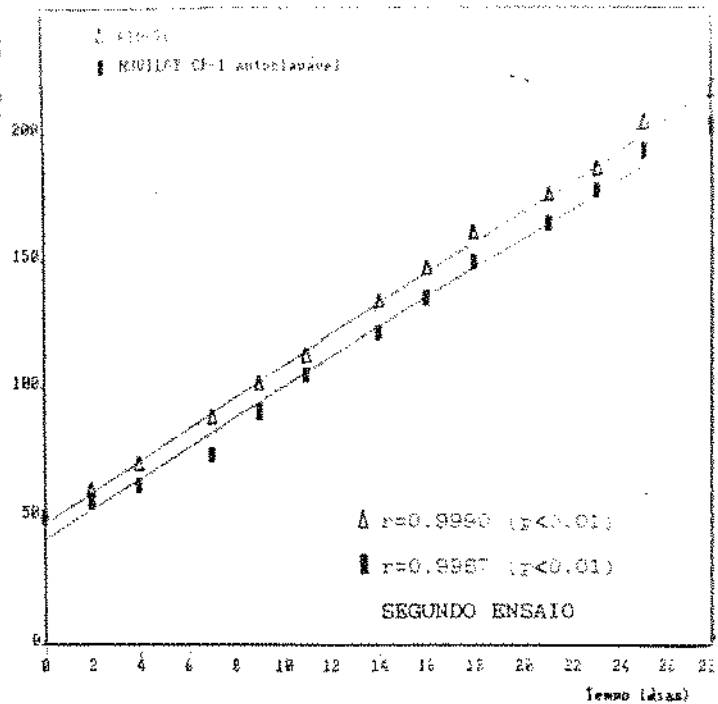
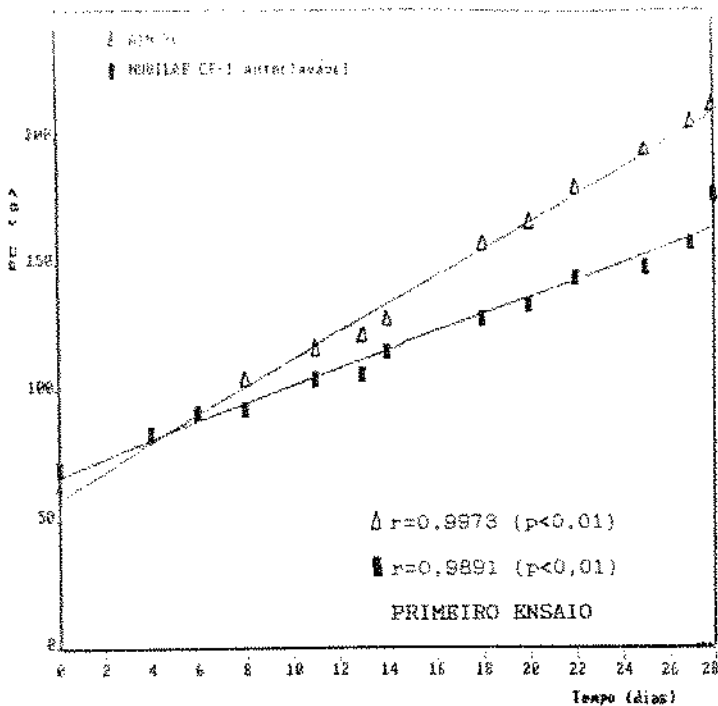
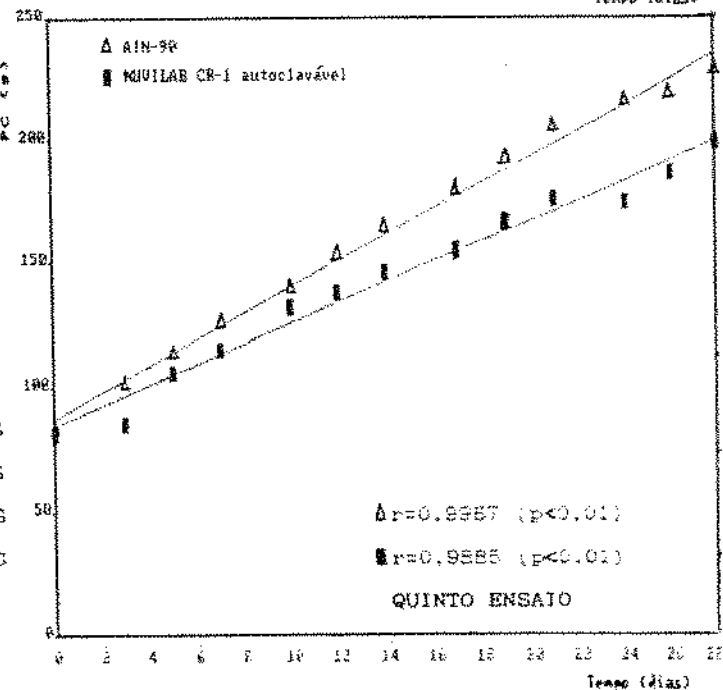


FIGURA 2. REGRESSÃO LINEAR
 OBTIDA PARA PESO CORPORAL
 (PC) EM FUNÇÃO DO TEMPO DE
 EXPERIMENTO, PARA RATOS
 WISTAR MACHOS ALIMENTADOS
 COM AS DIETAS DISCRIMINADAS
 NOS RESPECTIVOS ENSAIOS
 PARA AVALIAÇÃO DA EPOP.



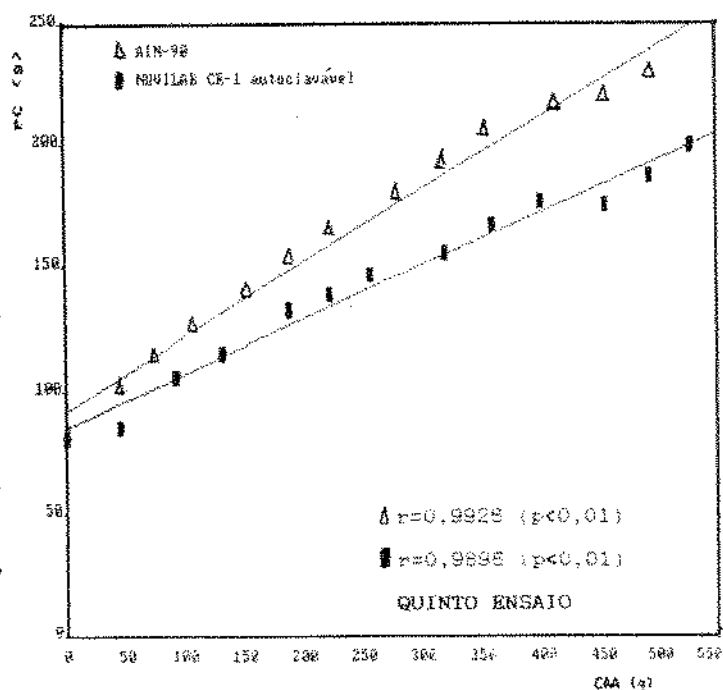
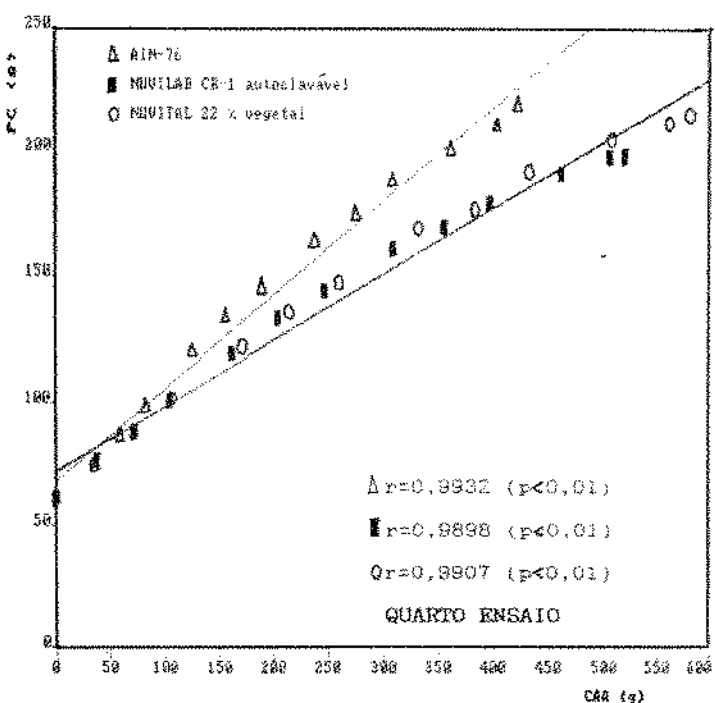
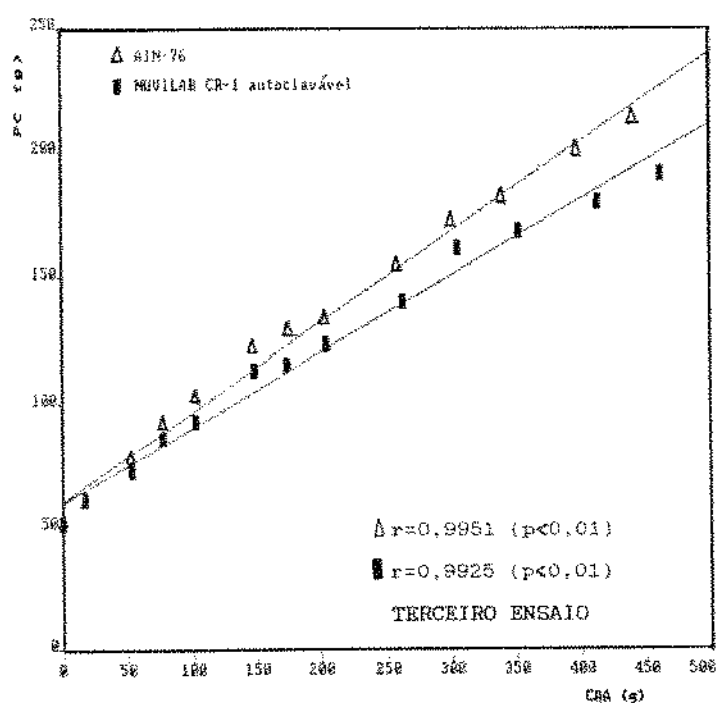
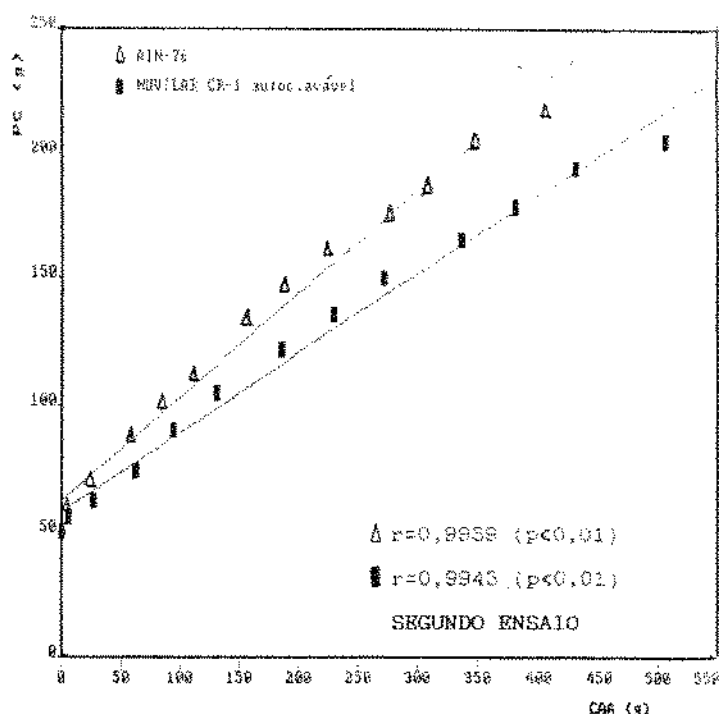
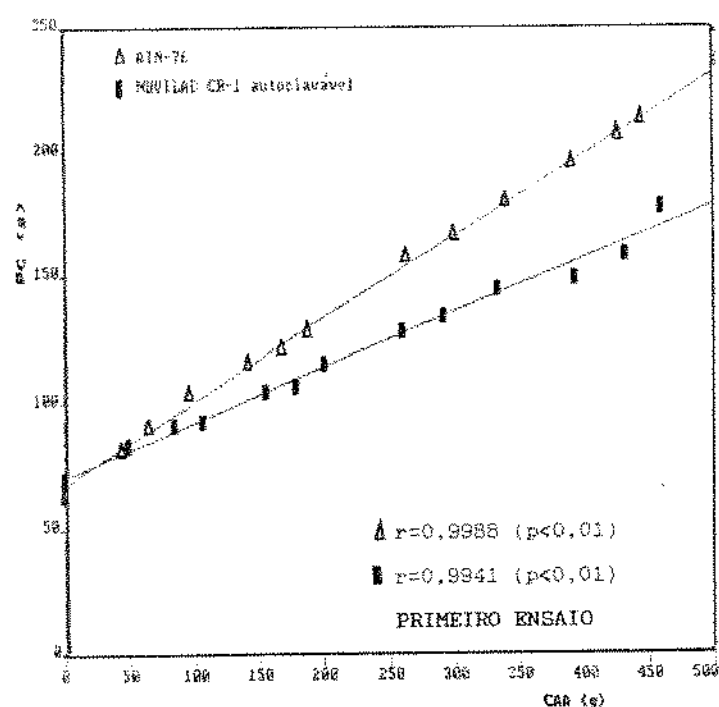


FIGURA 3. REGRESSÃO LINEAR OBTIDA PARA PESO CORPORAL (PC) EM FUNÇÃO DO CONSUMO ALIMENTAR ACUMULADO (CAA), PARA RATOS WISTAR MACHOS ALIMENTADOS COM AS DIETAS DISCRIMINADAS NOS CINCO ENSAIOS PARA AVALIAÇÃO DA EPOP.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram obter as seguintes conclusões:

1. A dieta NUVILAB CR-1 autoclavável atendeu os requerimentos estabelecidos pelo NATIONAL RESEARCH COUNCIL (1978) para ratos e camundongos, bem como as especificações estabelecidas pelo fabricante, quanto ao teor protéico total.

2. Quanto à composição aminoacídica, a dieta "NUVILAB CR-1 autoclavável", na amostra analisada, demonstrou-se deficiente na quantidade de metionina e cisteína, fornecendo, com relação ao NRC, apenas 43,00% do requerido para ratos e 53,75% do requerido para camundongos. Se considerado em relação ao teor da dieta-controle AIN-90, esta deficiência está em 53,75% para ratos. A lisina e o triptofano estão um pouco abaixo do requerido para ratos, 84,91% e 86,40%, respectivamente.

A composição aminoacídica da "NUVITAL 18% vegetal" demonstrou-se deficiente apenas em metionina e cisteína, atendendo 57,00% do requerido para ratos e 71,25% do requerido para camundongos. Da mesma forma, em relação à AIN-90, a NUVITAL 18% vegetal atenderia 71,25% para ratos.

A composição aminoacídica da "NUVITAL 22% vegetal" demonstrou-se deficiente também em metionina e cisteína, atendendo 49,00% do requerido para ratos e 61,25% do requerido para camundongos. Da mesma forma, em relação à dieta AIN-90, a NUVITAL 22% vegetal atenderia 61,25% para ratos. Nesta dieta, a

lisina atendeu 91,42% do requerido para ratos.

Portanto, para as três dietas em estudo, a metionina e a cisteína, com as devidas ressalvas metodológicas, são deficientes e a lisina tende a ser o segundo fator de deficiência. Com respeito a qualificação das duas dietas experimentais, os resultados apontam que tanto NUVITAL 18% vegetal como NUVITAL 22% vegetal, uma vez corrigidos os déficits apontados, seriam aceitáveis do ponto de vista de composição aminoacídica. É interessante destacar que, no total, os aminoácidos essenciais, nas três amostras analisadas, estão em quantidade adequada em relação aos requerimentos do NATIONAL RESEARCH COUNCIL (1978).

3. As respostas de crescimento dos animais às dietas foram satisfatórias e dentro das taxas esperadas. Quanto à qualidade nutricional, a dieta NUVILAB CR-1 autoclavável demonstrou-se, como é esperado, inferior à dieta-padrão, apresentando menor eficiência alimentar e protéica, o que pode ser atribuído à deficiência de aminoácidos sulfurados. Quanto ao balanço de nitrogênio, a dieta NUVILAB CR-1 autoclavável apresentou valor comparável à dieta-padrão AIN-76, à exceção da digestibilidade aparente que foi superior para a dieta-padrão.

4. A dieta experimental com aporte protéico de origem vegetal NUVITAL 22% vegetal foi comparável à dieta NUVILAB CR-1 autoclavável quanto à eficiência alimentar e protéica. O consumo alimentar foi entretanto superior, proporcionando ganho ponderal comparável ao da dieta-padrão, o que indica a validade da dieta.

5. A dieta NUVILAB CR-1 autoclavável não autoclavada apresentou qualidade microbiológica estável no decorrer do tempo, compatível com padrões microbiológicos utilizados pela firma produtora. As amostras autoclavadas demonstraram ausência de esterilidade. Os resultados indicaram que a contaminação da área de manutenção dos animais era baixa.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABIA (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ALIMENTAÇÃO).
Compêndio da legislação de alimentos: consolidação das
normas e padrões de alimentos. São Paulo, ABIA, 1989.
357 pp.
2. ALLISON, J.B. Biological evaluation of proteins. In:
ANSON, M.L. & EDSALL, J.T. Protein chemistry, vol. V.
New York, Academic Press Inc. Publ., 1949. p. 155-196.
3. AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION. Ad Hoc Committee on
Standards for Nutritional Studies. Report of the AIN Ad
Hoc Committee on Standards for Nutritional Studies. The
Journal of Nutrition 107: 1340-1348, 1977.
4. AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION. Ad Hoc Committee on
Standards for Nutritional Studies. Second Report of the
Ad Hoc Committee on Standards for Nutritional Studies.
The Journal of Nutrition 110: 1726, 1980.
5. AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION. Experimental Animal
Nutrition Committee. Guidelines for describing diets
for experimental animals. The Journal of Nutrition
114: 15-16, 1984.

6. ANVER, M.R. & COHEN, B.J. Lesions associated with aging.
In: BAKER, H.J.; LINDSEY, J.R.; WEISBROTH, S.H., ed.
The laboratory rat vol. I. Biology and disease.
Orlando, Academic Press, Inc., 1979. P.377-399.
7. AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS).
Official methods of analysis, edited by W. HORWITZ. 12.
ed. Washington, D.C., 1975. p. 857.
8. AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS).
Official methods of analysis, edited by W. HORWITZ. 13.
ed. Washington, D.C., 1980. p. 774-775.
9. BAKER, D.E.J. Reproduction and breeding. In: BAKER, H.J;
LINDSEY, J.R. & WEISBROTH, S.H., ed. The laboratory rat
vol. I. Biology and diseases. Orlando, Academy Press,
Inc., 1979. p. 153-168.
10. BAKER, H.J.; LINDSEY, J.R. & WEISBROTH, S.H. Housing to
control research variables. In: BAKER, H.J.; LINDSEY,
J.R. & WEISBROTH, S.H., ed. The laboratory rat vol. I.
Biology and diseases. Orlando, Academy Press, Inc.,
1979. p. 169-192.
11. BEALL, J.R.; TORNING, F.E. & RUNKLE, R.S. A laminar flow
system for animal maintenance. Laboratory Animal
Science 21: 206-212, 1971.

12. BECKMAN INSTRUMENTS, INC. Beckman 118/119 BL, 118/119 CL amino acid analysers. Instruction manual. Palo Alto, 1977.
13. BEDFORD, M.R. & SUMMERS, J.D. Influence of the ratio of essential to non essential amino acids on performance and carcass composition of the broiler chick. *British Poultry Science* 26: 483-491, 1985.
14. BENDER, A.E. Processing damage to protein food. A review. *Journal of Food Technology* 7 :239-250, 1972.
15. BENDER, A.E. & DOELL, B.H. Biological evaluation of proteins: a new aspect. *The British Journal of Nutrition* 11: 140-148, 1957.
16. BIERI, J.G. Letters to the editor. *The Journal of Nutrition* 109: 925-926, 1979.
17. BLÁHA, J.; JICINSKA, E.; VESELY, D. & JELINEK, R. The effect of moulds on the nutritional value of wheat. *Animal Feed Science and Technology* 28: 315-324, 1990.

18. BLEBY, J. The training of laboratory animal specialists.
In: Regional / International Scientific Meeting.
Laboratory animal science: laboratory animal studies in
the quest of health and knowledge. Aguas de Lindóia,
1986. Proceedings. Ribeirão Preto, ICLAS, CEMIB, FESBE,
Sociedade Brasileira de Genética, 1987. p. 86-93.
19. BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária.
Portaria nº 108, de 04 de setembro de 1991. Diário
Oficial da União, Brasília, 17 set. 1991. Seção I. p.
19813-19842.
20. BRASIL. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária.
Portaria nº 07, de 09 de novembro de 1988. Diário
Oficial da União, Brasília, 14 nov. 1988. Seção I. p.
21968-21974.
21. BURNETTE, M.A. & RUSOFF, I.I. GMA test protocol for
protein quality assays. Food Technology 32 (12): 66-
68, 1978.
22. BUSTA, F.F.; PETERSON, E.H.; ADAMS, D.M. & JOHNSON, M.G.
Colony count methods. In: SPECK, M.L., ed. Compendium
of methods for the microbiological examination of foods.
2. ed. Washington, D.C., American Public Health
Association, 1984. p. 62-83.

23. CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE. Guide to the care and use of experimental animals vol.2. Ottawa, CCAC, 1984. 208 pp.
24. CIESLAK, D.G. & BENEVENGA, N.J. The effect of amino acid excess on utilization by the rat of the limiting amino acid - lysine. The Journal of Nutrition 114: 1863-1870, 1984a.
25. CIESLAK, D.G. & BENEVENGA, N.J. The effect of amino acid excess on utilization by the rat of the limiting amino acid - threonine. The Journal of Nutrition 114: 1871-1877, 1984b.
26. CIESLAK, D.G. & BENEVENGA, N.J. The effect of amino acid excess on utilization by the rat of the limiting amino acid - lysine and threonine at equalized food intakes. The Journal of Nutrition 114: 1878-1883, 1984c.
27. CLARKE, H.E.; COATES, M.E.; EVA, J.K.; FORD, D.J.; MILNER, C.K.; O'DONOGHUE, P.N.; SCOTT, P.P. & WARD, R.J. Dietary standards for laboratory animals: report of the Laboratory Animals Centre Diets Advisory Committee. Laboratory Animals 11: 1-28, 1977.

28. CLOUGH, G. & GAMBLE, M.R. Laboratory animal houses: a guide to the design and planning of animal facilities. LAC Manual Series n. 4. Carshalton, Surrey, MRC/LAC, 1976. 44 pp.
29. COATES, M.E. The influence of the diet of laboratory animals on experimental results. In: Regional/International Scientific Meeting. Laboratory animal science: laboratory animal studies in the quest of health and knowledge. Aguas de Lindóia, 1986. Proceedings. Ribeirão Preto, ICLAS, CEMIB, FESBE, Sociedade Brasileira de Genética, 1987. p. 13-21.
30. COATES, M.E. The nutrition of laboratory animals. In: HUME, C.W. The UFAW handbook on the care and management of laboratory animals. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1976. p. 27-47.
31. COHEN, B.J. & RINGLER, D.H. Training in laboratory animal medicine for the 1990s. In: Regional/International Scientific Meeting. Laboratory animal science: laboratory animal studies in the quest of health and knowledge. Aguas de Lindóia, 1986. Proceedings. Ribeirão Preto, ICLAS, CEMIB, FESBE, Sociedade Brasileira de Genética, 1987. p. 79-85.

32. CONTRERAS GUZMAN, E. & LAPA GUIMARÃES, J. das G.
Determinação rápida de triptófano por reação com
antrona. In: XII Congresso Brasileiro de Ciência e
Tecnologia de Alimentos. Livro de Resumos. Rio de
Janeiro, 1989. p. 100.
33. DILLEHAY, D.L.; LEHNER, N.D.M. & HUERKAMP, M.J. The
effectiveness of a microisolator cage system and
sentinel mice for controlling and detecting MHV and
Sendai virus infections. *Laboratory Animal Science*:
40: 367-370, 1990.
34. DOWDY, S. & WEARDEN, S. *Statistics for research*. New
York, John Wiley & Sons, Inc., 1983. 537 pp.
35. DZIEZAK, D. Rapid methods for microbiological analysis of
foods. *Food Technology* 41 (7): 53-73, 1987.
36. EGGUM, B.O.; THORBEC, G.; BEAMES, R.M.; CHWALIBOG, A. &
HENCKEL, S. Influence of diet and microbial activity in
the digestive tract on digestibility, and nitrogen and
energy metabolism in rats and pigs. *The British Journal
of Nutrition* 48: 161-175, 1982.
37. EVANS, R.J. & BAUER, D.H. Studies of the poor utilization
by the rat of methionine and cystine in heated dry bean
seed (*Phaseolus vulgaris*). *Journal of Agricultural and
Food Chemistry* 26: 779-784, 1978.

38. EVANS, E. & WITTY, R. An assessment of methods used to determine protein quality. *World Review of Nutrition and Dietetics* 32: 1-26, 1978.
39. FAU, D.; PERET, J. & HADJIISKY, P. Effects of ingestion of high protein or excess methionine diets by rats for two years. *The Journal of Nutrition* 118: 128-133, 1988.
40. FESTING, M.F.W., ed. International index of laboratory animals: giving sources of animals used in laboratories throughout the world. 5. ed. England, Laboratory Animals LTD, 1987. 119 pp.
41. FINKELSTEIN, A. & BENEVENGA, N. J. The effect of methanethiol and methionine toxicity on the activities of cytochrome c oxidase and enzymes involved in protection from peroxidative damage. *The Journal of Nutrition* 116: 204-215, 1986.
42. FLOWERS, F.H. Research animal care in Canada - Its control and regulation. In: Regional/International Scientific Meeting. Laboratory animal science: laboratory animal studies in the quest of health and knowledge. Aguas de Lindóia, 1986. Proceedings. Ribeirão Preto, ICLAS, CEMIB, FESBE, Sociedade Brasileira de Genética, 1987. p. 129-138.

43. FORD, D.J. The effect of methods of sterilization on the nutritive value of protein in a commercial rat diet. *The British Journal of Nutrition* 35: 267-275, 1976.
44. FORSUM, E. & HAMBRAEUS, L. Effects of proteins and their corresponding amino acid mixtures on nitrogen balance and body composition in the growing rat. *The Journal of Nutrition* 108: 1518-1526, 1978.
45. FOSTER, H.L. Gnotobiology. In: BAKER, H.J.; LINDSEY, J.R. & WEISBROTH, S.H., ed. *The laboratory rat vol. II. Research applications*. Orlando, Academy Press, Inc., 1980. p. 43-57.
46. FOSTER, H.L.; BLACK, C.L. & PFAU, E.S. A pasteurization process for pelleted diets. *Laboratory Animal Care* 14: 373-381, 1964.
47. FRIEDMAN, M.; GUMBHANN, M.R. & ZIDERMAN, I.I. Nutritional value and safety in mice of proteins and their admixtures with carbohydrates and vitamin C after heating. *The Journal of Nutrition* 117: 508-518, 1987.
48. FULLERTON, F.R.; GREENMAN, D.L. & KENDALL, D.C. Effects of storage conditions on nutritional qualities of semipurified (AIN-76) and natural ingredient (NIH-07) diets. *The Journal of Nutrition* 112: 567-573, 1982.

49. GAMERMAN L.C.; ROSENKRANZ, A.; SCHOR, N.; GHIRALDINI, M.A.; JURKIEWICZ, A.; AJZEN, H. & RAMOS, O.L. Characteristics of spontaneously hypertensive, Wistar Kyoto and Munich Wistar rats bred in Brazil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 18: 513-518, 1985.
50. GHIRINGHELLI, C.G. & LÓPEZ, A.V. Energy: protein ratio for active growth of weanling laboratory rats. In: *Regional/International Scientific Meeting. Laboratory animal science: laboratory animal studies in the quest of health and knowledge. Aguas de Lindóia, 1986. Proceedings. Ribeirão Preto, ICLAS, CEMIB, FESBE, Sociedade Brasileira de Genética, 1987. p. 48-59.*
51. GRANER, E. A. *Estatística*. 2. ed. São Paulo, Edições Melhoramentos, 1966. 184 pp.
52. GURR, M.I. *Role of fats in food and nutrition*. London, Elsevier Applied Science Publishers Ltd., 1986. 170 pp.
53. HACKLER, L.R. An overview of the AACC/ASTM collaborative study on protein quality evaluation. *Food Technology* 32 (12): 62-64, 1978.
54. HAMM, T.E., JR.; RAYNOR, T. & CAVISTON, T. Unsuitability of the AIN-76A diet for male F-344 and CD rats and improvement by substituting starch for sucrose. *Laboratory Animal Science* 32: 414-415, 1982.

55. HANCOCK, J.D.; LEWIS, A.J. & PEO, E.R. Effects of ethanol extraction on the utilization of soybean protein by growing rats. *Nutrition Reports International* 39: 813-821, 1989.
56. HARMON, S.M. & GOEPFERT, J.M. *Bacillus cereus*. In: SPECK, M.L., ed. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 2. ed. Washington, D.C., American Public Health Association, 1984. p. 458-467.
57. HARMON, S.M.; KAUTTER, D.A. & PEELER, J.T. Comparison of media for the enumeration of *Clostridium perfringens*. *Applied Microbiology* 21: 922-927, 1971.
58. HARPER, A.E. "Nonessential" amino acids. *The Journal of Nutrition* 104: 965-967, 1974.
59. HEGER, J. Non-essential nitrogen and protein utilization in the growing rat. *The British Journal of Nutrition* 64: 653-661, 1990.
60. HEGER, J. & FRYDRYCH, Z. Estimation of optimum supplements of essential amino acids to a wheat and barley-based diet in rats using a nitrogen balance technique. *Animal Feed Science and Technology* 15: 21-31, 1986.

61. HELD, J.R. Laboratory animal studies in the quest for health and knowledge. In: Regional/International Scientific Meeting. Laboratory animal science: laboratory animal studies in the quest of health and knowledge. Aguas de Lindóia, 1986. Proceedings. Ribeirão Preto, ICLAS, CEMIB, FESBE, Sociedade Brasileira de Genética, 1987. p. 311-319.
62. HURT, H.D.; FORSYTHE, R.H. & KRIEGER, C.H. Factors which influence the biological evaluation of protein quality by the protein efficiency ratio method. In: FRIEDMAN, M., ed. Protein nutritional quality of foods and feeds, 1. Assay methods-biological, biochemical and chemical. New York, Marcel Dekker, 1976. p. 87-112.
63. ICMSF (The International Commission on Microbiological Specifications for Foods). Micro-organismos de los alimentos, 1. Técnicas de análisis microbiológico. [Microorganisms in foods, 1. Their significance and methods of enumeration]. 2. ed. Zaragoza (España), Editorial ACRIBIA, 1983. p. 221-231.
64. JANSEN, G.R. Biological evaluation of protein quality. Food Technology 32 (12): 52-56, 1978.
65. JOHN, A-M. & BELL, J.M. Amino acid requirements of the growing mouse. The Journal of Nutrition 106: 1361-1367, 1976.

66. KNAPKA, J.J. Diet selection and formulation. In: Regional/International Scientific Meeting. Laboratory animal science: laboratory animal studies in the quest of health and knowledge. Aguas de Lindóia, 1986. Proceedings. Ribeirão Preto, ICLAS , CEMIB , FESBE , Sociedade Brasileira de Genética, 1987. p. 3-12.
67. KNAPKA, J.J. & MORIN, L.M. Open formula natural ingredient diets. In: HAYES, K.C., ed. Primates in nutritional research. New York, Academic Press, 1979. p. 121-138.
68. KNAPKA, J.J.; SMITH, K.P. & JUDGE, F.J. Effect of crude fat and crude protein on reproduction and weanling growth in four strains of inbred mice. The Journal of Nutrition 107: 61-69, 1977.
69. KNAPKA, J.J.; SMITH, K.P. & JUDGE, F.J. Effect of open and closed formula rations on the performance of three strains of laboratory mice. Laboratory Animal Science 24: 480-487, 1974.
70. KOBURGER, J.A. & MARTH, E.H. Yeasts and molds. In: SPECK, M.L., ed. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 2. ed. Washington , D.C. , American Public Health Association, 1984. p. 197-201.

71. KRATZER, F.H.; BERSCH, S.; VOHRA, P. & ERNST, R.A.
Chemical and biological evaluation of soya-bean flakes autoclaved for different durations. *Animal Feed Science and Technology* 31: 247-259, 1990.
72. LAPA, M.A.G.; ZUCAS, S.M.; BION, F.M.; BARROS, S.R.A.; LAGO, E.S. & VARELA, R.M. Influência de aflatoxina B₁ sobre o crescimento de ratos submetidos a diferentes condições nutricionais. *Archivos Latino Americanos de Nutricion* 38: 323-329, 1988.
73. LINDSEY, J.R. Historical foundations. In: BAKER, H.J.; LINDSEY, J.R. & WEISBROTH, S.H., ed. *The laboratory rat vol. I. Biology and diseases*. Orlando, Academy Press, Inc., 1979. p. 1-36.
74. MAERKI, U.; ROSSBACH, W. & LEUENBERGER, J. Consistency of laboratory animal food following incubation prior to autoclaving. *Laboratory Animals* 23: 319-323, 1989.
75. MATSUNO, N.; YAMAGUCHI, M.; SAIKI, R. & TAMURA, E. Body weight change and nitrogen efficiencies in growing and adult rats fed diets containing various proportions of essential amino acids to total amino acids. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 22: 321-331, 1976.

76. MCLAUGHLAN, J.M. Evaluation of standard rat assays. In: AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION. Nutrients in processed foods-proteins. Massachusetts, Publishing Sciences Group, Inc., 1974. p. 69-76.
77. MEHLMAN, I.J. Coliforms, fecal coliforms, *Escherichia coli* and enteropathogenic *E. coli*. In: SPECK, M.L., ed. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 2. ed. Washington, D.C., American Public Health Association, 1984. p. 265-285.
78. MENENDEZ, R. C. Animales de laboratorio en las investigaciones biomedicas. Cuba, La Habana Editorial Ciencias Medicas, 1985. 203 pp.
79. MERCER, L.P.; GUSTAFSON, J.M.; HIGBEE, P.T.; GENO, C.E.; SCHWEISTHAL, M.R. & COLE, T.B. Control of physiological response in the rat by dietary nutrient concentration. *The Journal of Nutrition* 114: 144-152, 1984.
80. MERCER, L.P.; MAY, H.E. & DODDS, S.J. The determination of nutritional requirements in rats: mathematical modeling of sigmoidal inhibited nutrient - response curves. *The Journal of Nutrition* 119: 1465-1471, 1989.

81. MISKIMIN, D.K.; BERKOWITZ, K.A.; SOLBERG, M.; RIHA, W.E., JR.; FRANKE, W.C.; BUCHANAN, R.L. & O'LEARY, V. Relationships between indicator organisms and specific pathogens in potentially hazardous foods. *Journal of Food Science* 41: 1001-1006, 1976.
82. MITCHELL, H.H. A method of determining the biological value of protein. *The Journal of Biological Chemistry* 58: 873-903, 1923-1924.
83. MITCHELL, H.H. The supplementary relations among proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 58: 923-929, 1924.
84. MONTES, A.L. *Bromatologia*. Buenos Aires, Universitária, 1966. p. 10.
85. MOSSEL, D.A.A. Water and micro-organisms in foods - a synthesis. In: DUCKWORTH, R.B., ed. *Water relation of foods*. London, Academy Press Inc. (London) Ltd., 1975. p. 347-361.
86. MULLEN, B.J. & MARTIN, R.J. Macronutrient selection in rats: effect of fat type and level. *The Journal of Nutrition* 120: 1418-1425, 1990.

87. MURDOCK, D.S.; DONALDSON, M.L., & GUBLER, C.J. Studies on the mechanism of the "thiamin-sparing" effect on ascorbic acid in rats. *The American Journal of Clinical Nutrition* 27: 696-699, 1974.
88. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Committee on Laboratory Animal Diets. Control of diets in laboratory animal experimentation. *Nutrition Abstracts & Reviews*, B 49: 413-419, 1979.
89. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Committee on Rodents. Laboratory animal management: rodents. *ILAR News* 20 (3): L1-L15, 1977.
90. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition. *Nutrient requirements of laboratory animals* n. 10. 2. ed. Washington, D.C., National Academy of Sciences, 1972. 117 pp.
91. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition. *Nutrient requirements of laboratory animals* n. 10. 3. ed. Washington, D.C., National Academy of Sciences, 1978. 96 pp.
92. NEWBERNE, P.M.; FOX, J.G. Nutritional adequacy and quality control of rodent diets. *Laboratory Animal Science* 30: 352-365, 1980.

93. NEWMAN, C.W.; ROTH, N.J.; HUSBY, F.M.; HARROLD, R.L. & CALVERT, C.C. A comparison of alaskan fish meals to soybean meal as protein supplements for weanling rats. *Nutrition Reports International* 38: 1173-1183, 1988.
94. NGUYEN, H.T. Nephrocalcinosis induced by AIN-76 semi-purified diet in rats: a nutritional and ultrastructural study. *Laboratory Animal Science* 32: 415, 1982.
95. NUTRITIONAL BIOCHEMICALS CORPORATION. ICN Diet Catalog. Cleveland, ICN Life Sciences Group, 1977/1978. p. 24.
96. OLLER, W.L.; GREENMAN, D.L. & SUBER, R. Quality changes in animal feed resulting from extended storage. *Laboratory Animal Science* 35: 646-650, 1985.
97. OSBORNE, T.B.; MENDEL, L.B.; FERRY, E.L. A method of expressing numerically the growth-promoting value of proteins. *Journal of Biological Chemistry* 37: 223-229, 1919.
98. PELLETT, P.L. Protein quality evaluation revisited. *Food Technology* 32 (5): 60-79, 1978.
99. PELLETT, P.L. & YOUNG, V.R., ed. Nutritional evaluation of protein foods. Tokyo, The United Nations University, 1980. 154 pp.

100. PENG, Y.-S. Studies on the severity of various amino acid imbalances in the young male rat. *The Journal of Nutrition* 109: 1916-1924, 1979.
101. PIMENTEL GOMES, F. *Curso de estatística experimental*. 4. ed. Piracicaba, USP/ESALQ, 1970. 430 pp.
102. POELMA, P.L.; ANDREWS, W.H. & SILLIKER, J.H. *Salmonella*. In: SPECK, M.L., ed. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 2. ed. Washington, D.C., American Public Health Association, 1984. p. 286-326.
103. RAO, G.N. Dietary considerations in toxicology studies. In: Regional / International Scientific Meeting. Laboratory animal science: laboratory animal studies in the quest of health and knowledge. Aguas de Lindóia, 1986. *Proceedings*. Ribeirão Preto, ICLAS, CEMIB, FESBE, Sociedade Brasileira de Genética, 1987. p. 39-47.
104. REEVES, P. G. AIN-76 diet: should we change the formulation?. *The Journal of Nutrition* 119: 1081-1082, 1989.

105. RIDDELL, R.J. & BALLS, M. British legislation for laboratory animal protection: old and new. In: Regional/International Scientific Meeting. Laboratory animal science: laboratory animal studies in the quest of health and knowledge. Aguas de Lindóia, 1986. Proceedings. Ribeirão Preto, ICLAS, CEMIB, FESBE, Sociedade Brasileira de Genética, 1987. p. 139-145.
106. ROEBUCK, B.D. Letter to the Editor. The Journal of Nutrition 109: 924-925, 1979.
107. ROGERS, A.E. Nutrition. In: BAKER, H.J.; LINDSEY, J.R. & WEISBROTH, S.H., ed. The laboratory rat vol. I. Biology and diseases. Orlando, Academy Press, Inc., 1979. p. 123-152.
108. ROSENKRANZ, A; JURKIEWICZ, A. & CORRADO, A. Situação dos biotérios brasileiros: fator limitante de estudos farmacodinâmicos e toxicológicos de produtos naturais. Ciência e Cultura 32 (supl): 156-163, 1980.
109. ROTHCHILD, H.A., ed. Manual para técnicos de biotério. São Paulo, EPM, FINEP, 1990. 220 pp.

110. ROTHSCILD, H.A.; ROSENKRANZ, A. & MOURA DUARTE, F.A., ed.
Regional/International Scientific Meeting. Laboratory
animal science: laboratory animal studies in the quest
of health and knowledge, Aguas de Lindóia, 1986.
Proceedings. Ribeirão Preto , ICLAS , CEMIB , FESBE ,
Sociedade Brasileira de Genética, 1987. 354 pp.
111. ROWSELL, H. C. The animal in research. Ethical
perspectives: an international overview. In:
Regional/International Scientific Meeting. Laboratory
animal science: laboratory animal studies in the quest
of health and knowledge, Aguas de Lindóia, 1986.
Proceedings. Ribeirão Preto , ICLAS , CEMIB , FESBE,
Sociedade Brasileira de Genética, 1987. p. 103-113.
112. SARWAR, G. & MCDONOUGH, F.E. Evaluation of protein
digestibility-corrected amino acid score method for
assessing protein quality of foods. *Journal of
Association of Official Analytical Chemists* 73: 347-
356, 1990.
113. SARWAR, G.; PEACE, R.W. & BOTTING, H.G. Corrected relative
net protein ratio (CRNPR) method based on differences in
rat and human requirements for sulfur amino acids.
Journal of Association of Official Analytical Chemists
68: 689-693, 1985.

114. SARWAR, G.; PEACE, R.W. & BOTTING, H.G. Differences in protein digestibility and quality of liquid concentrate and powder forms of milk-based infant formulas fed to rats. *American Journal of Clinical Nutrition* 49: 806-813, 1989.
115. SELIGSON, F.H. & MACKEY, L.N. Variable predictions of protein quality by chemical score due to amino acid analysis and reference pattern. *The Journal of Nutrition* 114: 682-691, 1984.
116. SGARBIERI, V.C. *Alimentação e nutrição: fator de saúde e desenvolvimento*. Campinas, Editora da UNICAMP; São Paulo: Almed, 1987. 387 pp.
117. SGARBIERI, V.C. Estudo do conteúdo e de algumas características das proteínas em sementes de plantas da família *Leguminosae*. *Ciência e Cultura* 32: 78-84, 1980.
118. SGARBIERI, V.C.; ANTUNES, P.L. & JUNQUEIRA, R.G. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 2: 1-20, 1982.
119. SGARBIERI, V.C. & GARRUTI, R.S. A review of some factors affecting the availability and the nutritional and technological quality of common dry beans, a dietary staple in Brazil. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal* 19: 202-209, 1986.

120. SILVA, D.I. Conceitos gerais sobre análise de alimentos e determinação de matéria seca. In: SILVA, D.I. Análise de Alimentos (Métodos Químicos e Biológicos). Viçosa, UFV, Imprensa Universitária, 1981. p. 1-11.
121. SILVA, S. Inspeção e fiscalização de alimentos para animais no Brasil. Brasília, MA/SNAD/SEFIS/DIFISA, 1982. 27 pp. (Boletim Técnico Série Estudos, 1).
122. SOUZA, N. & DUTRA DE OLIVEIRA, J.E. Estudo experimental sobre o valor nutritivo de misturas de arroz e feijão. Revista Brasileira de Pesquisas Médicas e Biológicas 2: 175-180, 1969.
123. SPECK, M. L. , ed. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 2. ed. Washington, D.C., American Public Health Association, 1984. 914 pp.
124. SPECK, R.V. & GRAVES, R.R. Sulfide spoilage sporeformers (*Desulfotomaculum nigrificans*) In: SPECK, M.L., ed. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 2. ed. Washington, D.C., American Public Health Association, 1984. p. 258-264.
125. STAUB, H.W. Problems in evaluating the protein nutritive quality of complex foods. Food Technology 32 (12): 57-61, 1978.

126. STRAIN, J.J. & LYNCH, S.M. Excess dietary methionine decreases indices of copper status in the rat. *Annals of Nutrition & Metabolism* 34: 93-97, 1990.
127. TACKMAN, J. M.; TEWS, J. K. & HARPER, A. E. Dietary disproportions of amino acids in the rat: effects on food intake, plasma and brain amino acids and brain serotonin. *The Journal of Nutrition* 120: 521-533, 1990.
128. TAGLE, M.A. *Nutrição*. São Paulo, Artes Médicas Ltda., 1981. 234 pp.
129. TATINI, S.R.; HOOVER, D.G. & LACHICA, R.V.F. Methods for the isolation and enumeration of *Staphylococcus aureus*. In: SPECK, M.L., ed. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 2. ed. Washington, D.C., American Public Health Association, 1984. p. 411-427.
130. TEMLER, R.S.; DORMOND, CH.A. & FINOT, P.A. Biological assessment of proteins from different sources by protein efficiency ratio (PER) and by nitrogen retention. *Nutrition Reports International* 28: 267-276, 1983.
131. TROLLER, J.A. The water relations of food-borne bacterial pathogens. *Journal of Milk and Food Technology* 36: 276-288, 1973.

132. TURNER, N.D.; SCHELLING, G.T.; HARMS, P.G.; GREENE, L.W. & BYERS, F.M. A comparison of the protein requirements for growth and reproduction in the rat. *Nutrition Reports International* 36: 73-88, 1987.
133. UBOLDI EIROA, M.N. Atividade de água: influência sobre o desenvolvimento de microrganismos e métodos de determinação em alimentos. *Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos* 18: 353-383, 1981.
134. WADDELL, C.A. & DESAI, I.D. The use of laboratory animals in nutrition research. *World Review of Nutrition and Dietetics* 36: 206-222, 1981.
135. WHITTINGHAM, D. G. Embryo banks in the future of developmental genetics. *Genetics* 78:395-402, 1974.
136. WILLIAMS, F.P.; CHRISTIE, R.J.; JOHNSON, D.J. & WHITNEY, R.A., JR. A new autoclave system for sterilizing vitamin-fortified commercial rodent diets with lower nutrient loss. *Laboratory Animal Care* 18: 195-199, 1968.
137. WILLIAMS, P.C. The use of titanium dioxide as a catalyst for large-scale Kjeldahl determination of the total nitrogen content of cereal grains. *Journal of Science of Food and Agriculture, Oxford*. 24: 343-348, 1973.

138. WISE, A. The standard stock diet - fact or fiction.
Nutrition Reports International 23: 287-293, 1981.
139. ZATARI, I.M. & SELL, J.L. Effects of pelleting diets
containing sunflower meal on the performance of broiler
chickens. Animal Feed Science and Technology 30: 121-
129, 1990.