



Semina: Ciências Agrárias

ISSN: 1676-546X

semina.agrarias@uel.br

Universidade Estadual de Londrina
Brasil

Bueno Ribeiro, Leonir; Martins Varela de Arruda, Alex; Sales Pereira, Elzânia;
Konieczniak, Paula; Tonello, Cleiton Luiz
Técnica de indicador de oxidação de aminoácidos
Semina: Ciências Agrárias, vol. 29, núm. 4, octubre-diciembre, 2008, pp. 973-981
Universidade Estadual de Londrina
Londrina, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=445744090026>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal

Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

Técnica de indicador de oxidação de aminoácidos

Technique of indicator amino acid oxidation

Leonir Bueno Ribeiro^{1*}; Alex Martins Varela de Arruda²;
Elzânia Sales Pereira³; Paula Konieczniak⁴; Cleiton Luiz Tonello⁵

Resumo

Objetivou-se nesta revisão reunir informações sobre a técnica de indicador de oxidação de aminoácido desenvolvida para determinação de exigências em aminoácidos limitantes em animais não-ruminantes e possibilitar a avaliação da disponibilidade metabólica verdadeira de aminoácido contido nos alimentos, de forma rápida e eficiente, sem necessidade de corrigir a digestibilidade ileal e as perdas endógenas de aminoácidos. A técnica por não causar problemas de bem estar animal e não ser uma análise destrutiva tem-se apresentado como uma boa alternativa de determinação de exigência de aminoácido, sendo uma boa alternativa quando se envolvem animais de elevado valor comercial.

Palavras-chave: Aminoácidos, exigências, não ruminantes, nutrição

Abstract

The objective of this revision was collected the information and showed the actual adaptation of the indicator amino acid oxidation technique developed for determination of nutritional limited amino acids requirements to non – ruminants animals, and making possible the determination of true metabolic availability of amino acids in the foods, fast and efficient form, without necessity to correct the ileal digestibility of amino acids and endogenous losses. Due the technique do not carried problems with animal welfare and not be a destructive analysis, it can be suggest that technique will be a good alternative to determination of amino acids requirement, being in accordance to the use of animal species with raised commercial values.

Key words: Amino acids, non ruminants, nutrition, requirements

¹ Aluno do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Estadual de Maringá – UEM. E-mail: leonirbueno@hotmail.com.

² Professor Doutor, Departamento Ciências Animais, Universidade Federal Rural do Semi-Árido / UFRSA. Mossoró – RN.

³ Professor Doutor, Departamento Zootecnia, Universidade Federal do Ceará / UFC. Fortaleza – CE.

⁴ Zootecnista, Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE.

⁵ Aluno do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Estadual de Maringá – UEM.

* Autor para correspondência

Introdução

A proteína é um componente estrutural e funcional de ordem prioritária ao corpo, por exemplo, enzimas e hormônios, receptores e transportadores celulares, musculatura esquelética e articulações, composição da epiderme, entre outros componentes e funções orgânicas vitais. Desta forma, os aminoácidos são as unidades básicas que constituem estas proteínas, de modo que fontes dietéticas adequadas são essenciais para manter integridade e funções celulares, conseqüentemente, a saúde e a produção animal. O aspecto mais relevante das proteínas correlaciona-se com sua composição em aminoácidos, a qual define sua estrutura e função orgânica, e em termos nutricionais, digestibilidade e metabolizabilidade (NELSON; COX; LEHNINGER, 1995; SWENSON; REECE, 1996).

O nível protéico ideal em uma ração é definido como o nível mínimo de aminoácidos necessário para o máximo desenvolvimento e desempenho dos animais. Comumente encontramos formulações dietéticas com níveis de proteína muito altos, excesso no fornecimento de proteína, com custo adicional nas formulações, aumento da excreção de nitrogênio, podendo aumentar a incidência de distúrbios digestivos e problemas sanitários. Em especial, no caso de equinos, a avaliação dos alimentos e das exigências nutricionais permite aos nutricionistas formularem rações com adequados níveis protéicos (LEWIS, 2000). Assim, o conhecimento das exigências em aminoácidos tem implicações importantes como na formulação de dietas com um risco menor de erros, avaliação do impacto econômico dos programas de alimentação e evitar alterações metabólicas devido ao fornecimento de aminoácidos acima ou abaixo da exigência média de um plantel ou rebanho.

As buscas por novas técnicas e alternativas de determinação das exigências de aminoácidos, que não sejam destrutivas e invasivas aos animais e que tragam resultados satisfatórios e precisos têm sido buscadas constantemente, surgindo desta forma, o

interesse pela técnica de indicador de oxidação dos aminoácidos (KIM; MCMILLAN; BAYLEY, 1983; KIM; ELLIOTT; BAYLEY, 1983; BRUNTON; BALL; PENCHARZ, 1998). Portanto, quando se trabalha cientificamente com animais valiosos comercialmente, como são os equinos, e procura-se satisfazer determinados parâmetros de bem estar animal, a perspectiva do uso da técnica de oxidação de aminoácidos parece ser bastante oportuna, em termos de coleta de amostras para mensurações e quantificação dos aminoácidos plasmáticos.

Digestão, Absorção e Metabolismo de Aminoácidos

Após a ingestão, as proteínas são desnaturadas pelo ácido clorídrico presente no estômago, onde são divididos também em peptídeos menores pela ação da pepsina. As proteínas e os peptídeos passam então pelo intestino delgado, onde as ligações peptídicas são hidrolisadas por enzimas, secretadas pelo pâncreas (tripsina, quimiotripsina, elastase e carboxipeptidases). A mistura resultante de aminoácidos livres e peptídeos menores é transportada pela mucosa intestinal, e após absorção, os peptídeos sofrem hidrólise intracelular e os aminoácidos livres são transportados na circulação entero-hepática. Os aminoácidos absorvidos passam pelo fígado, onde uma parcela é usada, e o restante através da circulação sistêmica, é utilizado pelos tecidos extra-hepáticos ou periféricos.

Outra parcela significativa referem-se as perdas fecais de nitrogênio representadas pela fixação bacteriana e certos compostos nitrogenados, como amônia, uréia e proteínas diversas secretadas no lúmen intestinal (FRAPE, 1992; BERGNER; SCHWANDT; KRUGER, 1990; GAUSSERÈS et al. 1997). Considerando o ciclo de nitrogênio, a formação de compostos nitrogenados a partir da conversão em amônia pela microflora intestinal e sua reabsorção (JACKSON, 1989) foi proposta e confirmada pela demonstração da disponibilidade de

aminoácidos essenciais sintetizados pela microflora intestinal (METGES et al., 1999a, 1999b).

Durante a síntese e degradação normais das proteínas celulares (renovação das proteínas) alguns dos aminoácidos liberados sofrem degradação oxidativa, caso não sejam necessários para a síntese de novas proteínas; o mesmo ocorre devido a uma dieta rica em proteínas ou quando há ingestão excessiva de aminoácidos em relação às necessidades de biossíntese de proteínas. O excedente de aminoácidos é catabolizado, devido ao organismo não poder armazenar estes na forma livre, ou tanto no jejum severo quanto no diabetes melitus, pois respectivamente, os carboidratos estão inacessíveis para produção de energia ou não são utilizados adequadamente, assim, as proteínas corporais são utilizadas para atender as exigências energéticas, através da mobilização metabólica de aminoácidos glicogênicos e/ou cetogênicos (NELSON; COX; LEHNINGER, 1995; SWENSON; REECE, 1996).

Em todas essas circunstâncias metabólicas, os aminoácidos perdem seus grupos amino e os α -cetoácidos formados sofrem oxidação até CO_2 e H_2O . Os esqueletos carbônicos dos aminoácidos fornecem unidades de carbono, que são convertidas em glicose ou corpos cetônicos, para suprir as necessidades energéticas do cérebro, dos músculos e outros tecidos. As vias de degradação dos aminoácidos são similares na maioria dos organismos. Os esqueletos carbônicos dos aminoácidos, em geral, encaminham-se para o ciclo de ácido cítrico denominado metabolismo intermediário (NELSON; COX; LEHNINGER, 1995). O evento significativo refere-se ao aumento dos níveis plasmáticos de aminoácidos, similarmente ao que ocorre após a ingestão de dieta protéica (MARCHINI et al., 1998).

Os animais não possuem capacidade de sintetizar certos grupos de aminoácidos, apenas os convertem, remanejando grupos amino e cetoácidos, além disso, existem aminoácidos que os animais não conseguem sintetizar em quantidades

necessárias a sua exigência, sendo denominados de aminoácidos essenciais. Mesmo que todos os aminoácidos essenciais estejam presentes na dieta, em quantidades adequadas, a síntese protéica será realizada até o nível daquele presente em menor quantidade, enquanto que o excesso dos demais serão desaminados e oxidados, situação metabólica que resulta no conceito de aminoácido limitante. Os aminoácidos não essenciais são sintetizados no organismo a partir da conversão de outros aminoácidos, de tal modo que o aporte suficiente de aminoácidos não essenciais evita a síntese a partir dos indispensáveis, diminuindo a necessidade de suplementação de aminoácidos essenciais (NELSON; COX; LEHNINGER, 1995; SWENSON; REECE, 1996; RAGUSO; PEREIRA; YOUNG, 1999).

Técnica de Indicador de Oxidação de Aminoácido

A técnica de indicador de oxidação de aminoácido é baseada no princípio de que todo aminoácido essencial entre em oxidação ou que a síntese de proteínas seja sensível ao “pool” e “turn over” de aminoácidos limitantes. Quando um aminoácido essencial está limitado na dieta para a síntese de proteínas, outros aminoácidos que estão em excesso devem conseqüentemente ser oxidados (ZELLO et al., 1995). Quando a ingestão de um aminoácido limitante aumenta, a oxidação de aminoácidos essenciais diminui, correspondendo a um aumento da síntese de proteína. No entanto, se a ingestão de aminoácido limitante aumenta além da sua exigência, não haverá mudanças na oxidação dos indicadores, ou seja, ele se torna estável a partir do momento que atingiu a sua exigência. Esta diminuição na oxidação de aminoácidos essenciais ocorre até que as exigências sejam atendidas, de forma que a adição de mais aminoácido limitante (aminoácido teste) não terá nenhum efeito no uso de outro aminoácido essencial (indicador) sobre o anabolismo ou catabolismo de proteínas corporais

(KIM; MCMILLAN; BAYLEY, 1983; KIM; ELLIOTT; BAYLEY, 1983; BALL; BAYLEY, 1984). Assim, a técnica do indicador de oxidação de aminoácido supera o problema do uso de níveis maiores de aminoácido teste, o qual conduz a uma super estimação das exigências, quando utilizada a técnica de abate comparativo, por exemplo. Com a técnica do indicador de oxidação de aminoácido, nem o nível do aminoácido indicador na dieta nem sua relação com o nível de aminoácido teste na dieta influenciam significativamente a estimativa da exigência (ZELLO et al., 1995; BRUNTON; BALL; PENCHARZ, 1998).

No grupo de aminoácidos essenciais, somente fenilalanina, lisina, leucina, isoleucina e valina, tem átomos de carbono com cadeia carboxila que possa ser oxidado e eliminado na através da fosforilação oxidativa de forma irreversível. Conseqüentemente, a técnica direta de oxidação pode somente ser usada para estimar exigências destes aminoácidos essenciais, entretanto, a exigência de um aminoácido essencial pode ser estimada se um indicador de aminoácido apropriado for selecionado (BROSS, et al. 1997). O indicador de oxidação de aminoácido, também conhecido pela sigla (IAAO – *Indicator Amino Acid Oxidation*) é baseado na suposição que o nível do aminoácido limitante sinaliza o direcionamento do aminoácido essencial entre degradação e síntese de proteínas, assim, quando um aminoácido essencial limitar a síntese de proteínas, os outros aminoácidos serão oxidados (porque estão em relativo excesso). Como o nível dietético do aminoácido limitante aumenta o aproveitamento dos outros aminoácidos essenciais, a síntese de proteína aumentará também, diminuindo sua oxidação. Isto ocorrerá até que a exigência para o aminoácido limitante (aminoácido teste) seja alcançado, pois acima do nível exigido para o aminoácido teste não haverá nenhum efeito significativo na absorção e metabolismo de outros aminoácidos essenciais (BALL, 1984; KIM; ELLIOTT; BAYLEY, 1983).

O método de indicador de oxidação de aminoácido originou-se com o intuito de determinar as exigências

de aminoácido para leitões (KIM; MCMILLAN; BAYLEY, 1983). Embora o método de indicador de oxidação de aminoácido seja baseado na estimativa da oxidação de aminoácidos, na verdade, refere-se ao catabolismo do carbono de um aminoácido indicador como um análogo do carbono de mesmo peso do nitrogênio L[1-¹⁴C], a saber, fenilalanina como radioisótopo estável. Um único aminoácido essencial é fornecido abaixo de sua exigência, e age como a única limitação preliminar à habilidade de reter outros aminoácidos não limitantes na proteína do corpo, e estes aminoácidos, incluindo o aminoácido indicador, estarão em excesso e serão oxidados (KIM; MCMILLAN; BAYLEY, 1983; KIM; ELLIOTT; BAYLEY, 1983). Quando o consumo de aminoácido teste for zero, então a síntese da proteína é mínima e a oxidação do indicador é máxima. Com o aumento no fornecimento do aminoácido teste na dieta, o aumento da retenção de proteína e a queda da oxidação do aminoácido do indicador, ocorrerão até o nível da exigência do aminoácido do teste, devido oxidação do indicador se tornar constante, de tal modo que os dados analisados permitem estimativas quantitativas precisas através de pontos de interseção em uma predição ou “linear response plateau” (ZELLO et al., 1995). A vantagem é que as limitações metabólicas da liberação do dióxido de carbono se aplicam somente ao aminoácido indicador, pois o “pool” do aminoácido indicador não muda radicalmente enquanto varia-se o fornecimento do aminoácido teste (BRUNTON; BALL; PENCHARZ, 1998). A escolha do aminoácido como indicador é ainda alvo de estudos, de modo que os dados obtidos com o método sejam dependentes da suposição e da aplicabilidade do indicador. Acredita-se que a fenilalanina seja o melhor indicador quando a lisina for o primeiro aminoácido limitante, sendo o caso específico de equinos, suínos e humanos (NATIONAL ACADEMIES PRESS – NAP, 2005; NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC, 1998).

Disponibilidade Metabólica dos Aminoácidos

O método de indicador de oxidação de aminoácido (IAAO) é baseado no fato que, por não haver um armazenamento significativo dos aminoácidos no corpo (HOLT JUNIOR; HALAC; KADJI, 1962), os aminoácidos consumidos são divididos entre a síntese ou a oxidação metabólica (ZELLO et al., 1995).

Partindo do pressuposto que um aminoácido dietético limite a síntese protéica, então os demais aminoácidos estarão em excesso e serão oxidados. A fenilalanina foi escolhida como indicador pela sinalização fidedigna da redistribuição entre a oxidação e a síntese protéica. Assim, quando a lisina dietética é deficiente, a fenilalanina não pode ser utilizada para nova síntese protéica e o excesso deve ser oxidado, porém, se a lisina dietética for aumentada, mais fenilalanina será incorporada na proteína corporal e menos será oxidado (BERTOLO et al., 2001).

Uma vez que a lisina fornecida é aumentada na dieta acima de sua exigência, então torna-se constante a oxidação da fenilalanina, porque as quantidades crescentes de lisina não conduzem aos aumentos na síntese protéica. O nível de lisina dietética em que a oxidação da fenilalanina muda de platô para outro, tornado-se constante, é equivalente à exigência de lisina. A figura 01 demonstra como ocorre a mudança na síntese de proteína e a oxidação dos aminoácidos, assim como o ponto de interseção das retas, o qual estima a exigência nutricional dos aminoácidos estudados. Assim, a oxidação do fenilalanina reflete a lisina disponível no metabolismo e não requer nenhuma suposição nem requer cálculo indireto a respeito da digestibilidade ou perdas endógenas específicas devido a dieta. Assim, pode-se calcular a lisina metabólica disponível através da oxidação da fenilalanina.

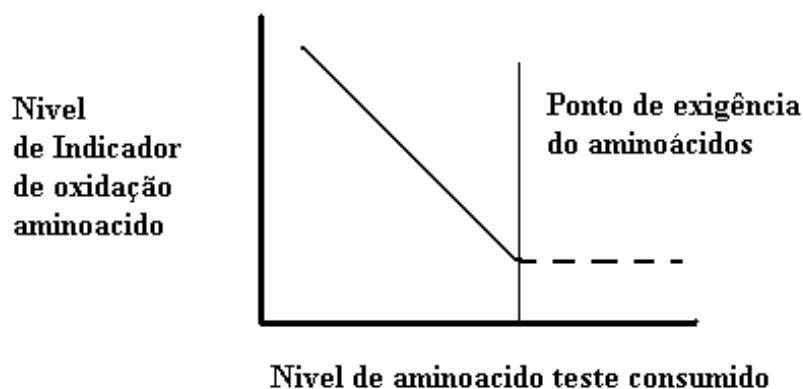


Figura 1. Representação do ponto de intersecção responsável pela determinação do nível de exigência do aminoácido (linear response plateau).

A aplicação de um tempo eficiente e necessário para que os animais realizem mudanças na síntese da proteína em resposta às mudanças na dieta, está relacionado ao tempo de adaptação de cada espécie. Segundo Moehn et al. (2004), suínos se adaptaram dentro de dois dias a uma mudança nos níveis de lisina. Em porcas não gestantes, uma diminuição da proteína fez com que a oxidação do fenilalanina

respondesse dentro de 18 horas. O curto período de adaptação mantém a taxa de síntese da proteína corporal, o qual difere entre animais jovens e adultos (HOLT JUNIOR; HALAC; KADJI, 1962; BRUNTON; BALL; PENCHARZ, 1998) e conseqüentemente os aminoácidos excedentes são canalizados rapidamente ao catabolismo, sendo assim determinado que dois dias são suficientes para

adequado uso da técnica do aminoácido indicador de oxidação biológica (BINGHAM; CUMMINGS, 1985).

A resposta da oxidação do indicador (fenilalanina) a uma dieta que contém lisina sintética (100% disponível) contra uma fonte de proteína (lisina não está totalmente disponível) é proporcional à disponibilidade metabólica. Há três características a serem atendidas para que o indicador de oxidação de aminoácidos seja aplicado à disponibilidade metabólica dos aminoácidos. Primeiramente, o aminoácido testado (lisina) deve ser o primeiro aminoácido limitante, ou seja, todos os aminoácidos, exceto a lisina, estão em excesso relativo e não limitariam a síntese protéica. Em segundo lugar, o índice de oxidação da fenilalanina deve ser constante para todas as dietas empregadas, o que assegura a mudança na oxidação da fenilalanina esteja relacionada com as mudanças na síntese protéica e não devido a entrada de fenilalanina. Em terceiro lugar, a resposta da oxidação da fenilalanina a uma mudança no nível dietético da lisina deve ser conhecida, pois, diversas outras circunstâncias podem influenciar a mensuração da disponibilidade do aminoácido (BOS; GAUDICHON; TOMÉ, 2002). Testar alimentos usando indicador de oxidação de aminoácidos pode ser conseguido de forma similar, como a determinação da digestibilidade pelo método da subtração ou diferença. Uma dieta basal é formulada com certo nível de lisina, outra dieta com determinada porcentagem de um ingrediente, e outra contendo lisina sintética (L-lisina-HCl). Assim, em relação a dieta basal, toda a mudança na oxidação relativa à dieta deve-se ao resultado da lisina dos alimentos comparativamente ao aminoácido “livre”.

Exigências em Aminoácidos para Animais Individualmente

Nos experimentos de desempenho com animais utilizam-se mensurações agrupadas ou medias de um conjunto de observações para calcular a exigência de

um aminoácido, e os valores obtidos são extrapolados para uma estimativa de desempenho médio de um rebanho ou plantel, no entanto, diferenças podem ser observadas quando se determina a exigência em um aminoácido de forma individual, demonstrado em estudos com seres humanos (PENCHARZ; BALL, 2003), suínos neonatais (HOUSE; PENCHARZ; BALL, 1998) e suínos em crescimento (MOEHN; BERTOLO; BALL, 2001). O método de indicador de oxidação de aminoácidos pode determinar a exigência de um aminoácido a partir de indivíduo, pois, a técnica permite que medidas múltiplas sejam executadas em um único animal sucessivamente e de forma rápida, sem alteração de seu estado fisiológico ou categoria produtiva durante o período experimental. Desta maneira, o conhecimento das exigências em aminoácidos a partir de mensurações individuais pode reduzir o custo econômico e biológico das pesquisas, destacando-se uma implicação importante, a possibilidade de obter boa exatidão nos valores usados na formulação de dietas ao fornecer aminoácidos dentro de uma amplitude aceitável com as recomendações nutricionais a partir da exigência média de um rebanho, bem como a validação do impacto econômico dos regimes de alimentação. Portanto, o desenvolvimento e a validação dos ensaios de metabolismo para determinar a disponibilidade de aminoácidos requerem vários experimentos para determinação precisa da exigência, conforme o consumo de alimento e categoria animal, digestibilidade e desempenho para níveis de lisina dietéticos, por exemplo, como constatado em suínos, o que demonstra a viabilidade e rapidez da técnica do aminoácido indicador de oxidação para determinar a exigência de lisina para suínos individualmente (MOEHN; BERTOLO; BALL, 2001).

Protocolo Experimental

Para realização da técnica de indicador de oxidação de aminoácido, torna-se necessário a formulação de uma dieta basal a ser usada durante o experimento,

sendo tal ração deficiente no aminoácido que pretende ser estudado ou usar o nível provável de deficiência do aminoácido seguindo recomendações de tabelas de exigências nutricionais. As amostras da ração basal devem ser submetidas a análise do perfil de aminoácido. Nas dietas elaboradas a partir da ração basal deve-se adicionar de diferentes níveis do aminoácido limitante para compor os tratamentos. Os animais devem ser padronizados para diminuir a variação entre eles, e o número de repetições ou unidades experimentais deve atender um número mínimo para que os dados médios sejam estatisticamente confiáveis. Assim, o fornecimento [1-C¹⁴] fenilalanina em 0,01 N (radioisótopo estável) deve ser por infusão intravenosa, permitindo que nos cálculos a produção líquida de radioisótopo ¹⁴CO₂ em um período de 5 horas em intervalos de 30 minutos, possam ser mensurados no plasma através de coleta de sangue, o que possibilitara um escalonamento ou pontos de oxidação dos aminoácidos através de equações de regressão (BOS; GAUDICHON; TOMÉ, 2002). Durante este tempo, os animais devem ser alimentados com dietas que forneçam cerca de 200% da exigência de manutenção diária para aminoácido indicador (fenilalanina).

Todos os animais são alimentados duas vezes ao dia, à exceção dos dias da infusão, quando recebem a metade da ração diária dividida em oito refeições de hora em hora, permitindo assim um constante fornecimento de fenilalanina. O consumo de ração deve ser monitorado em base de matéria seca diariamente. Toda a sobra de ração devem ser coletadas, secas e pesadas, permitindo ajuste do consumo de aminoácido. No procedimento experimental preconizado com suínos em crescimento, as dietas utilizadas são isoprotéicas e isoenergéticas, fornecendo todos os nutrientes, exceto a lisina que deve estar em deficiência, para realizar-se os níveis de inclusão. Os níveis devem ser determinados abaixo e acima das recomendações para a espécie, e um número mínimo de sete rações

(tratamentos) devem ser obedecidos para realização da análise de regressão, a saber, “linear response plateau” (LRP). Os níveis de minerais e de vitaminas devem exceder as recomendações em pelo menos 20% (BOS; GAUDICHON; TOMÉ, 2002).

Os pontos de regressão e os platôs da mensuração do [1-C¹⁴] fenilalanina são definidos de acordo com os níveis do aminoácido teste consumidos, efeito similar a dose-resposta. A oxidação da fenilalanina deve ser expressa como porcentagem da dose de infusão oxidada durante os períodos, onde [1-C¹⁴] fenilalanina (radioisótopo estável) é obtido em função do aminoácido testado. Assim temos, para cada nível de aminoácido teste (lisina) consumido, um nível ou taxa de concentração do radioisótopo estável responsável pela taxa de oxidação do aminoácido em questão (BOS; GAUDICHON; TOMÉ, 2002). Os efeitos da adaptação são determinados através da regressão linear e seu platô constante em relação ao tratamento dietético, sendo a adaptação aninhada no tratamento dietético como variáveis independentes, enquanto os animais devem ser considerados no modelo estatístico como um efeito aleatório. Por sua vez, a repetibilidade das observações de oxidação do aminoácido pode ser avaliada através do coeficiente de variação das medidas realizadas dentro de animais e de tratamentos.

Conclusão

A técnica do indicador de oxidação de aminoácidos oportuniza determinar a exigência de um aminoácido a partir de sua utilização metabólica pelo animal, através da análise da dieta e do sangue em um curto período experimental, não necessitando sacrificar animais e suprimindo as aproximações.

Referências

- BALL, R. O., *Protein and amino acid requirements of the young pig determined by the oxidation of an indicator amino acid Ph.D.* 1984. Dissertation – University of Guelph, Guelph, Canada.
- BALL, R. O.; BAYLEY, H. S. Tryptophan requirement of the 2.5-kg piglet determined by the oxidation of an indicator amino acid. *Journal of Nutrition*, Philadelphia, v. 114, p. 1741–1746. 1984.
- BERGNER, H.; SCHWANDT, H.; KRUGER, U. Determination of a prececal N-absorption from natural feed by ¹⁵N-labeled laboratory rats using the isotope dilution method. *Archiv für Tierernährung*, German, v. 40, p. 569–582, 1990.
- BERTOLO, R. F. P.; MÖHN, S.; PENCHARZ, P. B.; BALL, R. O. Development of rapid method to determine lysine requirement in individual pigs. *Advances in Pork Production*, Edmonton, v. 12, p., 2001
- BINGHAM, S. A.; CUMMINGS, J. H. Urine nitrogen as an independent validatory measure of dietary intake: a study of nitrogen balance in individuals consuming their normal diet. *Animal Journal Clinic Nutrition*, Local, v. 42, p. 1276-1289, 1985.
- BOS, C.; GAUDICHON, C.; TOMÉ, D. Isotopic studies of protein and amino acid requirements. *Curry Opine Clinic Nutrition Metabolism Care*, Local, v. 5, p. 55-61, 2002.
- BROSS, R.; BALL, R. O.; CLARKE, J. T. R.; PENCHARZ, P. B. Tyrosine requirements in PKU determined by indicator amino acid oxidation. *The FASEB Journal*, Bethesda, v. 11, p. A437, 1997.
- BRUNTON, J. A.; BALL, R. O.; PENCHARZ, P. B. Determination of amino acid requirements by indicator amino acid oxidation: Applications in health and disease. *Curry Opine Clinic Nutrition Metabolism Care*, Local, v. 1, p. 449–453, 1998.
- FRAPE, D. *Nutricion y alimentacion de caballo*. Zaragoza: Acribia, 1992.
- GAUSSERÈS, N.; MAHÉ, S.; BENAMOUZIG, R.; LUENGO, C.; FERRIERE, F.; RAUTUREAU, J.; TOMÉ, D. [¹⁵N]-Labeled pea flour protein nitrogen exhibits good ileal digestibility and postprandial retention in humans. *Journal of Nutrition*, Philadelphia, v. 127, p. 1160-1165, 1997.
- HOLT JUNIOR, L. E.; HALAC, E.; KADJI, C. N. The concept of protein stores and its implications in diet. *Journal Animal Medicine Associate*, Local, v. 181, p. 699-705, 1962.
- HOUSE, J. D.; PENCHARZ, P. B.; BALL, R. O. Lysine requirement of neonatal piglets receiving total parenteral nutrition as determined by oxidation of the indicator amino acid L-[1-¹⁴C] phenylalanine. *Animal Journal Clinic Nutrition*, Local, v. 67, p. 67-73, 1998.
- JACKSON, A. A. Optimizing amino acid and protein supply and utilization in the newborn. *Production Nutrition Society*, Local, v. 48, p. 293–301, 1989.
- KIM, K. I.; MCMILLAN, I.; BAYLEY, H. S. Determination of amino acid requirements of young pigs using an indicator amino acid. *Journal of Nutrition*, Philadelphia, v. 50, p. 369–382, 1983.
- KIM, K. I.; ELLIOTT, J. I.; BAYLEY, H. S. Oxidation of an indicator amino acid by young pigs receiving diets with varying levels of lysine or threonine, and an assessment of amino acid requirements. *Journal of Nutrition*, Philadelphia, v. 50, p. 391–399, 1983.
- NELSON, D. L.; COX, M. M.; LEHNINGER, A. L. *Princípios de bioquímica*. 3.ed. São Paulo: Sarvier, 1995.
- LEWIS, L. D. *Nutrição clínica equina: alimentação e cuidados*. São Paulo: Roca, 2000.
- MARCHINI, J. S.; MORIGUTI, J. C.; PADOVAN, G. J.; NONINO, C. B.; VIANNA, S. M. L. E.; OLIVEIRA, J. E. D. Métodos atuais de investigação do metabolismo protéico: aspectos básicos e estudos experimentais e clínicos. IN: SIMPÓSIO DE NUTRIÇÃO QUÍMICA, Ribeirão Preto, 1998. *Anais...* Ribeirão Preto: editora, 1998. p.
- METGES, C. C.; EL-KHOURY, A. E.; HENNEMAN, L.; PETZKE, K. J.; GRANT, I.; BEDRI, S.; PEREIRA, P. P.; AJAMI, A. M.; FULLER, M. F.; YOUNG, V. R. Availability of intestinal microbial lysine for whole body lysine homeostasis in human subjects. *Animal Journal Physiologic*, Local, v. 277, p. 597–607, 1999a.
- METGES, C. C.; PETZKE, K. J.; EL-KHOURY, A. E.; HENNEMAN, L.; GRANT, I.; BEDRI, S.; REGAN, M. M.; FULLER, M. F.; YOUNG, V. R. Incorporation of urea and ammonia nitrogen into ileal and fecal microbial proteins and plasma free amino acids in normal men and ileostomates. *Animal Journal Clinic Nutrition*, Local, v.70, p.1046–1058, 1999b.
- MOEHN, S.; BERTOLO, R. F. P.; BALL, R. O. A method to measure the amino acid requirement of individual pigs. *Journal of Animal Science*, Champaign, v. 79, Suppl.1, p. 66, 2001.

MOEHN, S.; BERTOLO, R. F. P.; PENCHARZ, P. B.; BALL, R. O. Indicator amino acid oxidation responds rapidly to changes in lysine or protein intake in growing and adult pigs. *Journal of Nutrition*, Philadelphia, v. 134, p. 836-841, 2004.

NATIONAL ACADEMIES PRESS – NAP. *Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids (Macronutrients)*. Washington: NAP, 2005.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. *Nutrient requirements of swine*. Washington: National Academic Press, 1998.

PENCHARZ, P. B.; BALL, R. O. Different approaches to define individual amino acid requirements. *Annual Review of Nutrition*, Palo Alto, v. 23, p. 101-116, 2003.

RAGUSO, C. A.; PEREIRA, P.; YOUNG, V. R. A tracer investigation of obligatory oxidative amino acids losses in healthy, young adults. *Animal Journal Clinic Nutrition, Local*, v. 70, p. 474–483, 1999.

SWENSON, M. J.; REECE, W. O. *Dukes: Fisiologia dos animais domésticos*. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

ZELLO, G. A.; WYKES, L. J.; BALL, R. O.; PENCHARZ, P. B. Recent advances in methods of assessing dietary amino acid requirements for adult humans. *Journal of Nutrition*, Philadelphia, v. 125, p. 2907–2915, 1995.