

FERNANDA ALVARES DA SILVA

**EFEITOS DE NÍVEIS DO ÁCIDO L-GLUTÂMICO E DA VITAMINA D₃ NO
DESEMPENHO E ANOMALIAS ÓSSEAS DE PINTOS DE CORTE**

**Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Zootecnia, para
obtenção do título de *Doctor
Scientiae*.**

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2000**

Ao meu pai Lauro (*in memoriam*) e minha mãe Yvone,
Ao meu esposo Josias,
Aos meus filhos Bruno e Mariana,
Aos meus irmãos.

AGRADECIMENTO

À Universidade Federal de Viçosa, por ter-me proporcionado condições de realizar o Curso de Pós-Graduação em Zootecnia.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

À ROCHE, pela doação das misturas vitamínicas utilizadas nas dietas.

Ao professor do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, George Henrique Kling de Moraes, pelo apoio, pela orientação e pelo compartilhamento do conhecimento.

Aos professores do Departamento de Zootecnia, Luiz Fernando Teixeira Albino e Horácio Santiago Rostagno, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Maria Goreti de Almeida Oliveira, e do Departamento de Veterinária, Cláudio César Fonseca, pela contribuição para a realização do projeto de pesquisa.

À Silvânia Lages Garcia, pela colaboração na análise estatística dos dados.

Aos funcionários do Aviário, em especial, Adriano, Elísio e Tiãozinho, pela colaboração na montagem do experimento.

Ao funcionário do Departamento de Veterinária, Adão Cardoso, pela confecção das lâminas histológicas.

Ao funcionário do Laboratório de Bioquímica Animal Jefferson, pela amizade e pela colaboração nas análises de laboratório.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular Eduardo, Solange, Sr. Geraldo, Sr. Henrique, pela amizade.

Aos colegas da pós-graduação Ana Cláudia, Flávia, Heloísa, Sandra, Sandra Roseli, pela amizade.

À estudante de graduação Cibele Minafra, pelo apoio no Laboratório de Bioquímica Animal.

Ao meu esposo Josias, pelo carinho e pela compreensão, e aos meus filhos Bruno e Mariana, pela ternura e alegria.

A todos, não citados, que participaram e compartilharam da minha vida acadêmica e contribuíram para a realização desse trabalho.

BIOGRAFIA

FERNANDA ALVARES DA SILVA, filha de Lauro Augusto Alvares da Silva e Yvone Loures Alvares da Silva, nasceu em 25 de março de 1968, em Alvinópolis, Minas Gerais.

Em janeiro de 1986, ingressou no Curso de Bacharelado e Licenciatura em Ciências Biológicas, na Universidade Federal de Viçosa, concluindo-o em janeiro de 1991.

Em dezembro de 1994, concluiu o Curso de Mestrado em Agroquímica na Universidade Federal de Viçosa, UFV.

Em agosto de 1995, iniciou o Curso de Doutorado em Zootecnia na UFV, defendendo tese em 28 de abril de 2000.

CONTEÚDO

	Página
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
CAPÍTULO 1 – EFEITOS DO ÁCIDO L-GLUTÂMICO E DA VITAMINA D ₃ NO DESEMPENHO E ANOMALIAS ÓSSEAS	9
1. INTRODUÇÃO	9
2. MATERIAL E MÉTODOS	12
2.1. Procedimentos gerais	12
2.2. Avaliação da incidência de problemas de pernas	15
2.3. Análise estatística	16
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
3.1. Ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar.....	17
3.2. Problemas de pernas.....	23
4. RESUMO E CONCLUSÕES	25
CAPÍTULO 2 – EFEITOS DO ÁCIDO L-GLUTÂMICO E DA VITAMINA D ₃ NOS PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS DE TIBIOTARSOS E FÊMURES DE PINTOS DE CORTE	27
1. INTRODUÇÃO	27

2. MATERIAL E MÉTODOS	29
2.1. Procedimentos gerais.....	29
2.2. Determinação dos parâmetros físicos	32
2.3. Determinação de minerais nas cinzas	32
2.4. Análise estatística	33
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
3.1. Comprimento, diâmetro e resistência à quebra de fêmures e tibiotarsos	34
3.2. Porcentagem de cinza óssea do tibiotarso e fêmur	42
3.3. Concentrações de cálcio, fósforo, magnésio e relação Ca:P dos tibiotarsos e fêmures	45
4. RESUMO E CONCLUSÕES	55
CAPÍTULO 3 – EFEITOS DO ÁCIDO L-GLUTÂMICO E DA VITAMINA D ₃ NOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DOS OSSOS E SORO SANGUÍNEO DE PINTOS DE CORTE	
	57
1. INTRODUÇÃO	57
2. MATERIAL E MÉTODOS	60
2.1. Procedimentos gerais	60
2.2. Análise bioquímica nos ossos.....	63
2.3. Obtenção do sangue e fígado.....	64
2.4. Análise estatística.....	64
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
3.1. Proteínas colagenosas (PC), proteínas não colagenosas (PNC e proteínas totais (PT) de tibiotarsos e fêmures.....	65
3.2. Cálcio total, cálcio iônico, fósforo e fosfatase alcalina no soro sanguíneo	72
3.3. Proteína total, albumina e globulina no soro sanguíneo, e proteína total no fígado	79
4. RESUMO E CONCLUSÕES	85
CAPÍTULO 4 – ANÁLISE HISTOLÓGICA DE TIBIOTARSOS E FÊMURES DE PINTOS DE CORTE DE 1 A 14 DIAS DE IDADE.....	
	87

1. INTRODUÇÃO	87
2. MATERIAL E MÉTODOS	89
2.1. Procedimentos gerais.....	89
2.2. Preparo das lâminas.....	90
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	93
3.1. Espessura e organização do disco epifisário de tibiotarso	93
3.2. Diâmetro do canal medular e espessura do osso compacto da diáfise do tibiotarso.....	97
3.3. Diâmetro do canal medular e espessura do osso compacto da diáfise do fêmur.....	97
4. RESUMO E CONCLUSÕES	100
RESUMO E CONCLUSÕES GERAIS	102
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106
APÊNDICES	114
APÊNDICE A	115
APÊNDICE B	123

RESUMO

SILVA, Fernanda Alvares da, D.S., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2000. **Efeitos de níveis do ácido L-glutâmico e da vitamina D₃ no desempenho e anomalias ósseas de pintos de corte.** Orientador: George Henrique Kling de Moraes. Conselheiros: Luiz Fernando Teixeira Albino e Horácio Santiago Rostagno.

Um experimento foi conduzido com objetivo de estudar os efeitos do ácido L-glutâmico (L-Glu) e da vitamina D₃ (VD) da dieta em pintos de corte, de um dia, machos, Hubbard, criados em baterias aquecidas, recebendo dieta básica purificada, contendo todos os L-aminoácidos essenciais, minerais e vitaminas (exceto vitamina D₃), suplementada com 5, 10 e 15% de L-Glu combinados com 0, 5.000, 10.000 e 15.000 UI de VD. O ganho de peso máximo (192,61 g) aumentou até o nível máximo estimado de 8,56% de L-Glu e 15.000 UI de VD. A melhor taxa de conversão alimentar (1,58) foi verificada com nível estimado de 8,40% de L-Glu. O maior consumo estimado (320,24 g) foi obtido com 8,48% de L-Glu e 15.000 UI de VD. Houve redução na incidência de problemas de pernas com 10% de L-Glu e 15.000 UI de VD. Observou-se comprimentos máximos (37,61 mm e 50,36 mm), com 9,51% de L-Glu e 15.000 UI de VD, e 9,99% de L-Glu e 15.000 UI de VD, para o fêmur e tibiotarso, respectivamente. O diâmetro do fêmur (3,62 mm) e tibiotarso (3,17 mm) aumentou até o nível máximo estimado de 10,49% de L-Glu e 15.000 UI de VD, e 11,04% de L-Glu e 15.000 UI de VD, respectivamente. A resistência máxima

estimada para o fêmur ($52,47 \text{ kgf/cm}^2$) foi determinada com 7,57% de L-Glu e 8.978 UI, e 6,24% de L-Glu e 12.591UI de VD para o tibiotarso ($43,35 \text{ kgf/cm}^2$). A maior porcentagem de cinza óssea do fêmur (44,37%) foi obtida com 15% de L-Glu e 8.503 UI de VD, e 15% de L-Glu e 15.000 UI de VD para o tibiotarso (40,73%). Não houve efeito de tratamento para as concentrações de cálcio no tibiotarso (37,01%). Não houve efeito de tratamento nas concentrações de fósforo (20,55%) nas cinzas do tibiotarso. A relação Ca:P no tibiotarso foi constante e igual a 1,80. No fêmur, a melhor relação Ca:P (1,95) foi obtida com 5% de L-Glu e 15.000 UI de VD. No fêmur, houve decréscimo nas concentrações de magnésio com a suplementação de L-Glu e de VD. No tibiotarso, a maior concentração de magnésio (1,2%) foi obtida com 5% de L-Glu e 5.000 UI de VD. Não foi observado efeito de tratamento ($P > 0,05$) nas concentrações de proteínas colagenosas no fêmur, que foi constante e igual a 23,44 mg/100g. As menores concentrações de proteínas não colagenosas (2,5 mg/100g e 2,15 mg/100g) foram obtidas com 9,32% e 9,73% de L-Glu, no fêmur e tibiotarso, respectivamente. As maiores concentrações de proteínas totais (30,04 mg/100g e 30,03 mg/100g) foram obtidas com 15% de L-Glu e 10.000 UI de VD, 5% de L-Glu e 5.000 UI de VD, respectivamente no fêmur e tibiotarso. As concentrações máximas de cálcio no soro (9,61 mg/dL) foram obtidas com 15% de L-Glu e 14.181 UI de VD; 7,33 mg/dL de cálcio iônico com 15% de L-Glu e 15.664 UI de VD; 7,20 mg/dL de fósforo com 10% de L-Glu e 10.863 UI de VD. Os maiores valores de atividade de fosfatase alcalina no soro foram obtidos com 10% de L-Glu e na deficiência de VD. Houve aumento significativo nas concentrações de proteínas totais, albumina e globulina no soro, com a suplementação de VD e L-Glu. Com 10% de L-Glu e 15.000 UI de VD melhorou o crescimento e desenvolvimento ósseo; organização e comprimento médio do disco epifisário do tibiotarso; espessura do osso compacto da diáfise e diâmetro do canal medular. Em geral, as aves alimentadas com 10% de L-Glu e 15.000 UI de VD apresentaram melhor desempenho, melhor desenvolvimento dos ossos, baixas concentrações ósseas de proteínas não colagenosas e menor incidência de problemas de pernas.

ABSTRACT

SILVA, Fernanda Alvares da, D.S., Federal University of Viçosa, April 2000.
Effects of L-glutamic acid and vitamin D₃ on performance and incidence of leg problems of broiler chicks. Adviser: George Henrique Kling de Moraes. Committee Members: Luiz Fernando Teixeira Albino and Horácio Santiago Rostagno.

An experiment was conducted to study the effects of L-glutamic acid (L-Glu) and vitamin D₃ (VD) on performance of one-day-old male Hubbard broiler chicks, reared in heated batteries, fed with a purified basal diet containing all essential L-aminoacids, minerals, and vitamins (except Vitamin D₃) and were supplemented with three levels of L-Glu (5, 10 and 15%) and with four levels of vitamin D₃ (0, 5,000, 10,000 and 15,000 IU). The weight gains increased up to 192,61 g an estimated level of 8,56% of L-Glu and 15,000 IU of VD. The highest feed intake (320,24 g) was obtained at an estimated level of 8,48% of L-Glu and 15,000 IU of VD. The better feed:gain was obtained at an estimated level of 8,40% of L-Glu. There was a reduction of leg problems in chicks with 10% of L-Glu and 15,000 IU of VD. The length of bones increased up to an estimated level of 9,51% of L-Glu and 15,000 IU of VD, and 9,99% of L-Glu and 15,000 IU of VD, for femur (37,61 mm) and tibiotarsus (50,36 mm), respectively. The femur (3,62 mm) and tibiotarsus (3,17 mm) diameter increased up an estimated level of 10,49% of L-Glu and 15,000 IU of VD, and 11,04% of L-Glu and 15,000 IU of VD, respectively. The maximum breaking strength for femur (52,47

kgf/cm²) and tibiotarsus (43,35 kgf/cm²) was obtained with 8,978 IU and 12,591 IU, respectively. The highest content of femur ash (44,37%) and tibiotarsus ash (40,73%) was obtained with, respectively, 15% of L-Glu and 8,503 IU of VD and 15% of L-Glu and 15,000 IU of VD. There was no significant effect on calcium content of tibiotarsus ash (37,01%). There was no significant effect on phosphorus contents of tibiotarsus ash (20,55%). The better Ca:P relationship on tibiotarsus was equal 1,80. On femur, the better Ca:P relationship (1,95) was obtained with 5% of L-Glu and 15,000 IU of VD. On femur, there was a reduction on magnesium contents with L-Glu and VD supplementation. On tibiotarsus, the highest magnesium content (1,2%) was obtained with 5% of L-Glu and 5,000 IU of VD. No significant ($P > 0,05$) treatment effects were observed on femur contents of collagenous proteins (23,44 mg/100g). The smallest contents of non collagenous proteins (2,5 mg/100g and 2,15 mg/100g) were obtained with 9,32% and 9,73% of L-Glu, on femur and tibiotarsus, respectively. The highest contents of total protein (30,04 mg/100g and 30,03 mg/100g) were obtained with 15% L-Glu and 10,000 IU VD, and 5% of L-Glu and 5,000 IU of VD, on femur and tibiotarsus, respectively. The blood calcium increased up (9,61mg/dL) to an estimated level of 15% of L-Glu and 14,181 IU of VD, 7,33 mg/dL of ionized calcium was obtained with 15% of L-Glu and 15.664 of VD. The highest blood phosphorus (7,20 mg/dL) was obtained at an estimated level of 10% of L-Glu and 10,863 IU of VD. The highest blood alkaline phosphatase was obtained at level of 10% of L-Glu and vitamin D deficiency. There was a significant increase on contents of blood total protein, albumin and globulin with VD and L-Glu supplementation. The lower length of epiphyseal growth plate and better growth plate organization level were observed with chicks fed 10% of L-Glu and 15,000 IU of VD. Birds fed 10% L-Glu and 15,000 IU VD had better performance, good development of bones, longer length of compact bone, longer diameter of medullar channel, lower bone non collagenous contents and a lower incidence of leg problems.

INTRODUÇÃO

A ciência avícola tem evoluído consideravelmente em todos os seus aspectos, transformando a atividade de produção de carne e ovos em uma grande indústria de alimentos (HONMA, 1992). Essa evolução se deve aos avanços científicos e tecnológicos no melhoramento genético, nutrição e controle sanitário que tem possibilitado obter resultados técnicos e econômicos continuamente melhorados.

A qualidade genética das aves usadas para a produção de carne e ovos tem sido melhorada ao longo dos anos. Segundo estimativas de firmas comerciais produtoras de matrizes para corte, o melhoramento genético das aves deverá resultar na redução da idade de abate de 49 para 38 dias, tendo o frango de corte o mesmo peso médio, 1.820 gramas.

Desde 1930, inúmeras causas das deformidades do esqueleto em aves têm sido identificadas. Nutrientes (toxidez, deficiência e desequilíbrio), genética, micotoxinas e práticas de manejo afetam diretamente o crescimento e desenvolvimento do esqueleto (COOK, 2000)

Os primeiros problemas das pernas ou síndrome das pernas tortas apareceram na década de sessenta nos aviários de perus para produção de carne. Na década de setenta o problema aumentou consideravelmente e tem se tornado crescente, atingindo as explorações comerciais de frangos de corte. Há uma concordância generalizada de que os problemas locomotores causam perdas econômicas significativas para a avicultura de corte (TARDIN, 1995).

As perdas nas explorações comerciais devido a fragilidade do tecido ósseo podem ocorrer desde o período inicial de criação. Os frangos sofrem de “fraqueza” e deformidades ósseas, que podem causar quebra dos ossos durante a captura e transporte, criando problemas durante o processamento das carcaças (RATH et al., 2000)

A locomoção das aves é vital para um bom desempenho e não deve ser afetada por disfunções estruturais. A seleção para características como ganho de peso corporal acelerado e massa muscular localizada (peito e coxa) com pouca gordura tem colocado demandas crescentes de peso corporal sobre o sistema ósseo (ALBERS, 1994).

Atualmente, problemas nas pernas resultantes de deficiências de vitaminas e minerais são relativamente raros e, geralmente, resultantes de erros na formulação e/ou preparo das rações. Um ponto de vista muito comum na indústria é que o frango de corte moderno cresce tão rapidamente que o sistema esquelético não se desenvolve com a rapidez suficiente para suportar o peso das aves (LILBURN, 1994).

Utilizando dietas a base de milho e farelo de soja para frangos de corte de 1 a 56 dias de idade, LOFTON e SOARES (1986) verificaram que níveis inferiores a 200 UI de vitamina D/kg de dieta reduziram o ganho de peso e consumo e aumentaram a incidência de problemas de pernas. Observaram que níveis de 400 a 8.000 UI de vitamina D/kg de dieta não afetaram o desempenho dos animais e a resistência das tíbias.

Tem sido demonstrado que aves submetidas a dietas purificadas com baixos níveis de aminoácidos não essenciais (5% de L-glutâmico ou misturas isonitrógenas de L-glutâmico, L-alanina e L-prolina, L-glutâmico, L-alanina, L-aspartico) por um período de duas semanas apresentaram diversos tipos de deformações nas pernas (GUIMARÃES, 1993a e b; RIBEIRO, 1995; RODRIGUES, 1995; PERINI, 1993; SILVA, 1995; CORNÉLIO, 1995). Verificou-se que as aves com alta incidência de problemas de pernas apresentavam altos teores de proteínas não colagenosas nos tibiotarsos e fêmures e foi necessário 12,5% de L-glutâmico para reduzir a incidência de problemas de pernas.

Considerando que o ácido L-glutâmico e a vitamina D têm sido indicados como fundamentais no desenvolvimento do tecido ósseo, torna-se

necessário verificar os níveis desses nutrientes para reduzir as anomalias ósseas e esclarecer as suas origens.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O Tecido Ósseo

A locomoção das aves é vital para um bom desempenho e não deve ser afetada por disfunções estruturais. A seleção para características como ganho de peso corporal acelerado e massa muscular localizada (peito e coxa) com pouca gordura tem colocado demandas crescentes de peso corporal sobre o sistema ósseo (ALBERS, 1994). Segundo HESTER (1994), os problemas de pernas podem resultar em uma perda de 0,5% a 5% do plantel durante o período de crescimento e no processamento das carcaças.

O tecido ósseo é um tecido metabolicamente ativo, multifuncional, compreendendo populações de células como condrócitos, células endoteliais, osteoblastos etc. Esse complexo meio de células produz uma variedade de reguladores biológicos que controlam o metabolismo ósseo. Hormônios como paratormônio, estrógenos e diidroxicolecalciferol coordenam as principais atividades do metabolismo ósseo com vistas ao seu aumento em diâmetro e comprimento durante o crescimento das aves. Além de meio de sustentação, o tecido ósseo atua como reservatório de minerais tais como cálcio, fósforo, sódio, potássio, cujo metabolismo e distribuição são homeostaticamente regulados por vários hormônios, como calcitonina, paratormônio e vitamina D (SMITH et al., 1988).

Vários nutrientes afetam o crescimento, desenvolvimento e manutenção do sistema ósseo das aves, podendo destacar a vitamina D.

2.2. Vitamina D

O osso é o maior sítio fisiológico para a ação da vitamina D. Esse hormônio esteróide regula os principais eventos associados com a formação e reabsorção óssea. Os componentes anabólicos e catabólicos da homeostase óssea são mediados pelos efeitos de $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ no osteoblasto (BREEN et al., 1994).

O receptor para vitamina D é uma proteína de 48 kDa (humanos) a 60 kDa (aves), com alta homologia com outros membros da superfamília de hormônios esteróides (DESAI et al., 1995).

A nível molecular, uma mutação em uma única base no DNA que codifica o receptor nuclear para vitamina D poderá levar a produção de um VDR (receptor para vitamina D) bioquimicamente não funcional, resultando no aparecimento das manifestações clínicas de deficiência de vitamina D, como por exemplo o raquitismo (NORMAN, 1994).

A vitamina D_3 (colecalfiferol) é absorvida na presença de sais biliares no jejuno, transportada por uma proteína específica que a protege da oxidação e inativação. Sofre duas hidroxilações, uma no fígado e outra nos rins, produzindo a forma $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$, reconhecidamente a mais ativa e potente forma da vitamina D. (WIDEMAN, 1987).

A $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ por si só não funciona no processo de mineralização, mas tem funções importantes no osteoblasto, onde estimula a produção de proteínas e permite a mobilização do osso pelo hormônio da tireóide. Também inicia a ativação do osteoclasto, que é o primeiro passo no processo de remodelação do osso, que é requerido para a manutenção normal do osso (De LUCA, 1993).

Outra relação a ser observada é entre vitamina D e fosfatase alcalina do osso devido à aparente associação dessa enzima com o aumento da atividade anabólica do osteoblasto. Essa enzima poderia estar envolvida na mineralização pelo aumento local na concentração do

ion fosfato e/ou pela hidrólise dos inibidores da cristalização tal como pirofosfato (SPIESS et al.,1986).

A deficiência de vitamina D aumenta a matriz óssea não mineralizada, que resulta em raquitismo. A administração de vitamina D para animais deficientes em vitamina D estimula a reabsorção óssea. A 1,25-(OH)₂D₃ promove a mineralização do osso diretamente ou atua na mineralização indiretamente pelo fornecimento de cálcio e fósforo suficiente para a nova matriz óssea formada (SUDA et al., 1990).

O maior defeito na mineralização óssea quando há deficiência de cálcio e fósforo parece ser uma falta de suprimento de cálcio e fósforo para os centros de mineralização (De LUCA e SCHNOES, 1983).

Deficiência de vitamina D em frangos de corte jovens e perus está comumente associada com decréscimos no cálcio sanguíneo, alargamento da zona proliferativa do disco epifisário, e uma falha para mineralizar efetivamente o osso em desenvolvimento. Os efeitos da deficiência de vitamina D podem ser revertidos pelo tratamento com colecalciferol dietético ou doses fisiológicas de 1,25-(OH)₂D₃ (VAIANO et al., 1994; EL MITCHELL et al., 1978; 1997) relacionaram a incidência de anomalias em frangos de corte com uma desordem da matriz orgânica do osso, uma vez que não estava relacionada com nenhuma desordem nutricional clássica do tecido ósseo.

EDWARDS et al.(1992) utilizando dietas a base de milho e farelo de soja para pintos de corte de 1 a 16 dias de idade verificaram que, somente com níveis de vitamina D bem acima do recomendado, houve redução significativa de problemas de pernas.

ELLIOT e EDWARDS (1994) observaram que há diferenças entre linhagens quanto a incidência de problemas de pernas. Peterson x Hubbard apresentaram alta incidência de discondroplasia tibial e altos teores de 1,25-(OH)₂D₃ no plasma.

2.3. Proteínas Não Colagenosas

VETTER et al. (1991) observaram que as mudanças nas concentrações de proteínas não colagenosas podem contribuir para a fragilidade do osso por interferência com a completa mineralização e/ou arquitetura normal.

As proteínas não colagenosas contribuem para uma variedade de funções no osso, tais como estabilização da matriz, calcificação e outras atividades regulatórias metabólicas (RATH et al., 2000).

Segundo MORAES et al. (1984), os problemas de pernas podem aparecer por uma deficiência de nitrogênio não específico. O ácido L-glutâmico (L-Glu) fornecido em alto nível na dieta tem sido considerado uma eficiente fonte de nitrogênio não específico para promover o desenvolvimento dos pintos e para reduzir a incidência de anomalias de pernas. Vários genes relacionados aos osteoblastos, que incluem a osteocalcina, são modulados a nível transcricional pela ação da vitamina D

Tem sido demonstrado que a elevação do nível de nitrogênio não específico melhora o desempenho (ganho de peso corporal e conversão alimentar) e reduz a incidência de problemas de pernas (CORNÉLIO, 1995; GUIMARÃES et al., 1993a e b).

RODRIGUES et al. (1996) observaram que pintos alimentados com 12,5% de L-Glu apresentaram melhor crescimento ósseo que aqueles recebendo 5,0%, confirmando que o nível de nitrogênio não específico de dietas purificadas é fundamental para o desenvolvimento de pintos, conforme observações feitas por FEATHERSTON (1976), MARUYAMA et al. (1976) e MORAES et al. (1987).

CORNÉLIO (1995) verificou ausência completa de anomalias em pintos alimentados com dieta contendo 12,5% de L-Glu e relação cálcio e fósforo (Ca:P) igual a 3:1. Neste caso, o desempenho dos animais foi inferior àqueles que receberam dieta com o mesmo nível de L-Glu e relação cálcio e fósforo.

RODRIGUES et al. (1996) observaram que a elevação do nível de L-Glu de 5,0% para 12,5% aumentou a fração de proteínas colagenosas e diminuiu a fração de proteínas não colagenosas ósseas. Isso poderia explicar a redução da incidência de problemas de pernas observada por

RODRIGUES e MORAES (1995) em pintos de corte alimentados com 12,5%, em relação àqueles que foram submetidos às dietas com 5,0% de L-Glu.

Essa relação entre os teores de proteínas não colagenosas e a incidência de problemas de pernas é explicável, considerando que o aumento de Gla-proteínas (componentes das proteínas não colagenosas) não somente inibe a mineralização óssea como, também pode estimular o aumento da liberação de cálcio do osso (PRICE et al., 1980).

CAPÍTULO 1

EFEITOS DO ÁCIDO L-GLUTÂMICO E DA VITAMINA D₃ NO DESEMPENHO E ANOMALIAS ÓSSEAS

1. INTRODUÇÃO

Seleção genética constante e melhoria na nutrição tem proporcionado às linhagens modernas de frangos de corte rápida taxa de crescimento. Segundo ZUBAIR e LEESON (1996), o tempo requerido para o frango alcançar dois quilos de peso corporal decresceu aproximadamente 1 dia por ano.

Dados dos últimos 20 anos mostram que o peso corporal de frangos comerciais a 56 dias de idade dobrou de 1.600 g para 3.000 g. Durante o mesmo período, o crescimento do músculo *Pectoralis major* aumentou numa velocidade maior que o peso corporal (LILBURN, 1994).

Essa rápida taxa de crescimento é acompanhada por numerosos problemas - aumento da deposição de gordura corporal, alta incidência de doenças metabólicas, alta taxa de mortalidade e alta incidência de anomalias ósseas (SULLIVAN et al., 1994).

A seleção para aumento de músculo peitoral e ganho de peso corporal pode contribuir para o aumento na incidência de fraqueza de pernas, que é responsável pela redução no crescimento, mortalidade e redução da eficiência da produção comercial (EMMERSON et al., 1991; NELSON et al., 1992).

NESTOR (1984) hipotetizou que aumentos no peso corporal e desenvolvimento do músculo do peito sem concomitantes aumentos no músculo da perna e osso, são biologicamente incompatíveis com a manutenção normal do caminhar.

A quantidade de vitamina D₃ nas formulações de rações práticas é normalmente de 4 a 10 vezes o nível preconizado pelo National Research Council (NRC) e vários estudos são conduzidos para avaliar o efeito de altos níveis de D₃ no desempenho de frangos de corte.

EDWARDS et al. (1992) utilizando dietas a base de milho e farelo de soja para pintos de corte de 1 a 16 dias de idade verificaram que, somente com níveis de vitamina D₃ bem acima do recomendado, houve redução significativa de problemas de pernas.

PERINI (1993) observou, que, aumentando o nível de vitamina D₃ na dieta houve uma redução na incidência de problemas de pernas. Nenhum problema de perna foi observado em pintos alimentados com 12,5% de L-glutâmico e 25.000 UI de vitamina D₃/kg de dieta.

A elevada incidência de anomalias nas pernas de frangos de corte alimentados com dietas purificadas, contendo baixos níveis de nitrogênio não específico fornecidos pelo ácido L-glutâmico (L-Glu), ou por L-alanina (L-Ala), ou misturas isonitrógenas destes, foi observada por RIBEIRO et al. (1995a e c), RODRIGUES e MORAES (1995), GUIMARÃES et al. (1993a e b) e SILVA e MORAES (1995).

Tem sido demonstrado que a elevação do nível de nitrogênio não específico melhora o desempenho (ganho de peso corporal e conversão alimentar) e reduz a incidência de problemas de pernas (CORNÉLIO, 1995; GUIMARÃES et al., 1993a e b).

De acordo com SILVA e MORAES (1995), embora o nível de 7,5 % de L-Glu na dieta pareça satisfazer o requerimento de nitrogênio não específico para crescimento máximo, o nível de 12,5% de L-Glu foi necessário para reduzir significativamente a incidência de problemas de pernas.

O nível de L-Glu é, ainda, variável conforme observações feitas por diversos autores. MORAES et al. (1984) e GUIMARÃES et al. (1993a) verificaram ser necessário 10% de L-Glu ou quantidades isonitrógenas da mistura de L-Glu e L-Ala para pintos criados em bateria aquecida ou no chão.

O objetivo desse estudo foi testar níveis de nitrogênio não específico, na forma do aminoácido sintético ácido L-glutâmico (L-Glu), e níveis de vitamina D₃ visando maximizar o desempenho e reduzir as anormalidades de pernas em pintos de corte, de 1 a 14 dias de idade.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Procedimentos gerais

O experimento foi realizado utilizando esquema fatorial, em delineamento inteiramente casualizado 3 x 4, sendo 3 níveis de ácido glutâmico (L-Glu) e 4 níveis de vitamina D₃ (VD), no Setor de Avicultura do Departamento de Zootecnia, na Universidade Federal de Viçosa.

Foram utilizados 336 pintos de corte de um dia, machos, Hubbard, com peso médio de 40 gramas, distribuídos aleatoriamente nos tratamentos. Os tratamentos consistiram de uma dieta básica purificada (GUIMARÃES, 1988) (Quadro 1), contendo todos os aminoácidos essenciais (Quadro 2), vitaminas (Quadro 3) (exceto vitamina D₃) e minerais (Quadro 4), suplementada com três níveis de ácido L-glutâmico (5, 10 e 15%) combinados com quatro níveis de vitamina D₃ (0, 5.000, 10.000, 15.000 UI/kg). Cada tratamento consistiu de quatro repetições e sete aves por unidade experimental. As aves foram alojadas em baterias aquecidas com pisos de tela elevados e receberam água e dieta *ad libitum* durante todo o período experimental de 14 dias.

As aves e a ração foram pesadas no início do experimento e a cada semana após a sua montagem, sendo, então, registrado o ganho de peso, consumo de ração e calculada a conversão alimentar.

Quadro 1 – Dieta básica purificada

Ingredientes	Quantidade (%)
Aminoácidos não essenciais ^{1/}	Variável
Aminoácidos essenciais ^{2/}	8,94
Mistura vitamínica ^{3/}	4,48
Mistura mineral ^{4/}	9,10
Óleo de soja	15,00
Bicarbonato de sódio	1,00
Amido	qsp 100,00

1/ Ácido L-glutâmico: 5%, 10% e 15%.

2/ veja Quadro 2.

3/ veja Quadro 3.

4/ veja Quadro 4.

Quadro 2 – Aminoácidos essenciais^{1/}

Aminoácidos	Quantidade (%)
L – Arginina. HCl	1,15
L – Histidina. HCl. H ₂ O	0,41
L – Lisina. HCl	1,14
L – Tirosina	0,45
L – Fenilalanina	0,50
L – Triptofano	0,15
L – Metionina	0,35
L – Cisteína	0,45
L – Treonina	0,65
L – Leucina	1,00
L – Isoleucina	0,60
L – Valina	0,69
L – Prolina	0,40
Glicina	1,00

1/ SASSE e BAKER (1973).

Quadro 3 – Mistura Vitamínica^{1/}

Ingredientes	Quantidade/kg de dieta
Cloreto de Colina 60 %	3,3 g
Retinil Palmitato	5.000 UI
Colecalciferol ^{2/}	Variável
D - α - tocoferil acetato	22 UI
Menadiona sódio bissulfito	2,0 mg
Inositol	1,0 g
Riboflavina	9,0 mg
Tiamina. HCl	6,0 mg
Pantotenato de cálcio	20,0 mg
Niacina	50,0 mg
Piridoxina	8,0 mg
Ácido fólico	2,0 mg
Biotina	0,3 mg
B ₁₂ (0,1%)	20,0 mg
BHT	0,125 mg
Excipiente	Variável

1/ FEATHERSTON e ROGLER (1978).

2/ 0, 5.000, 10.000 e 15.000 UI/kg

Fonte: ROCHE

Quadro 4 – Mistura Mineral^{1/}

Ingredientes	Quantidade/kg de dieta
CaCO ₃	18,6526 g
CaHPO ₄ . 2H ₂ O	30,5300 g
K ₂ HPO ₄	11,2000 g
NaCl	6,0000 g
FeSO ₄	0,2000 g
ZnO	0,1225 g
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,0150 g
MnSO ₄ . H ₂ O	0,5100 g
KI	0,0400 g
MgCO ₃	2,5000 g
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	1,0000 g
Na ₂ SeO ₃	0,2200 mg
Excipiente (casca de arroz)	30,0000 g

1/ FEATHERSTON e ROGLER (1978).

2.2. Avaliação da incidência de problemas de pernas

Aos 14 dias de idade, as aves foram avaliadas visualmente quanto aos problemas de pernas. A seguir, foram sacrificadas por deslocamento cervical para remoção dos tibiotarsos e/ou fêmures.

Na avaliação da incidência de anomalias ósseas utilizou-se o sistema de escore, adaptado de KESTIN et al. (1992), dividido em categorias, conforme o grau de deformidade das pernas por exame visual, por cinco pessoas, simultaneamente:

Escore 0 - normal;

Escore 1 - ligeiramente deformada;

Escore 2 - deformidade severa, com dificuldade na movimentação;

Escore 3 - completamente deformada.

O método de escore entre as categorias fornece uma indicação útil do estado geral das aves, quantificando a incidência de problemas de pernas e a distribuição dos escores obtidos.

2.3 Análise estatística

A análise estatística dos dados obtidos foi feita por regressão. A escolha do melhor modelo baseou-se no coeficiente de determinação (R^2), na significância dos coeficientes de regressão pelo teste “t” de Student e na coerência com o fenômeno biológico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar

Os valores médios de ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar encontram-se no Quadro 5. O resumo da análise de variância encontra-se no Quadro 6.

O ganho de peso foi significativamente influenciado pelos níveis de ácido L-glutâmico (L-Glu) e vitamina D₃ (VD) estudados. Na Figura 1, verificou-se aumento no ganho de peso até um ponto máximo estimado de 192,61 g, obtido com 8,56% de L-Glu como fonte de nitrogênio não específico e 15.000 UI de VD (Quadro 7), que foram efetivos para promover ganho de peso.

Os resultados obtidos estão de acordo com SCOTT et al. (1963), MORAES et al. (1984) e GUIMARÃES (1988), os quais verificaram que a suplementação de dietas contendo aminoácidos sintéticos com um mínimo de 10% de L-Glu ou misturas isonitrógenas de aminoácidos não essenciais equivalentes a 10% de L-Glu foram efetivas como fonte de nitrogênio não específico para promover ganho de peso.

Com 15% de L-Glu, houve decréscimo significativo ($P < 0,01$) no desempenho das aves, provavelmente devido à prioridade de excreção do excesso de nitrogênio não específico fornecido pela dieta.

Quadro 5 - Ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar média de pintos de corte de 1 a 14 dias de idade

Característica	Vitamina D ₃ (UI)	Ácido L-Glutâmico			Média
		5	10	15	
Ganho de peso (g)	0	133,97	169,76	83,48	129,07
	5.000	142,99	173,88	89,90	135,59
	10.000	152,74	180,38	95,03	142,72
	15.000	182,50	186,41	79,64	149,52
Média		153,05	177,61	87,01	
Consumo de ração (g)	0	256,69	246,84	185,82	229,78
	5.000	241,97	275,76	171,52	229,75
	10.000	259,00	320,72	199,03	259,58
	15.000	304,13	318,95	194,97	272,68
Média		265,45	290,57	187,84	
Conversão alimentar	0	1,97	1,46	2,28	1,90
	5.000	1,70	1,59	1,91	1,73
	10.000	1,69	1,78	2,11	1,86
	15.000	1,68	1,71	2,50	1,96
Média		1,76	1,64	2,20	

Quadro 6 – Significância da estatística F de diferentes fontes de variação e coeficiente de variação experimental (C.V.) para ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar

Fonte de variação	Ganho de peso (g)	Consumo de ração (g)	Conversão alimentar
L-Glu	**	**	*
Vitamina D ₃	*	**	ns
L-Glu x vitamina D ₃	ns	*	ns
C.V. (%)	12,16	9,80	13,64

* Significativo pelo teste F (P< 0,05).

** Significativo pelo teste F (P< 0,01).

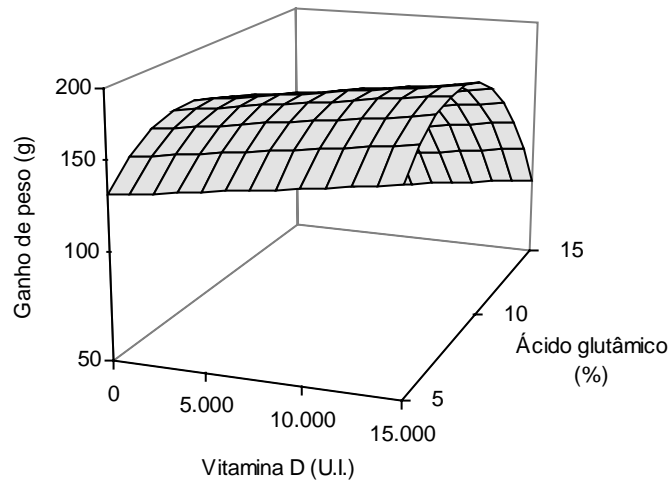
ns não significativo.

Quadro 7 – Estimativa de níveis de ácido L-glutâmico (L-Glu) e vitamina D₃ (VD) para pintos de corte de 1 a 14 dias de idade, considerando as variáveis de desempenho

Característica	Equação ajustada	R ²	Resposta máxima	Resposta mínima	Estimativa	
					L-Glu (%)	Vitamina D ₃ (UI)
Ganho de peso (g)	$Y = 3,0654 + 39,4574^{**}\text{Glu} - 2,3030^{**}\text{Glu}^2 + 0,001369^{**}\text{VD}$	0,95	192,61	—	8,56	15.000
Consumo de ração (g)	$Y = 88,6939 + 43,3804^{**}\text{Glu} - 2,5571^{**}\text{Glu}^2 + 0,003171^{**}\text{VD}$	0,91	320,24	—	8,48	15.000
Conversão alimentar	$Y = 2,5287 - 0,2319^{**}\text{Glu} + 0,01380^{**}\text{Glu}^2 + 6,22 \times 10^{-6} \text{VD}$	0,71	—	1,58	8,40	5.000

** e * Significativo ao nível de 1% e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste t.

$$\hat{Y} = 3,0654 + 39,4574^{**}Glu - 2,3030^{**}Glu^2 + 0,001369^{**}VD \quad R^2=0,95$$



** Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste t.

Figura 1 - Estimativa do ganho de peso em função de níveis de ácido glutâmico (Glu) e vitamina D₃ (VD).

O ácido L-Glu foi eficiente como fonte de nitrogênio não específico para a síntese de aminoácidos não essenciais, utilizados para a deposição de proteína, favorecendo, assim, o crescimento da ave.

SUMMERS et al. (1984) e PERRY et al. (1991) verificaram decréscimos no ganho de peso corporal e piora na conversão alimentar de frangos de corte, de 1 a 21, dias alimentados com dietas deficientes em vitamina D₃, como o encontrado.

O consumo de ração também foi afetado ($P < 0,01$) pelos níveis dietéticos de L-Glu e VD. Na Figura 2, observou-se aumento no consumo de ração até o máximo estimado em 320,24 g, obtido com 8,48% de L-Glu e 15.000 UI de VD (Quadro 7).

Observou-se aumento linear no consumo de ração com a suplementação de vitamina D, o que confirma os resultados de MORAES et al. (1997), quando os pintos de corte consumiram mais com os aumentos nos níveis de suplementação de VD.

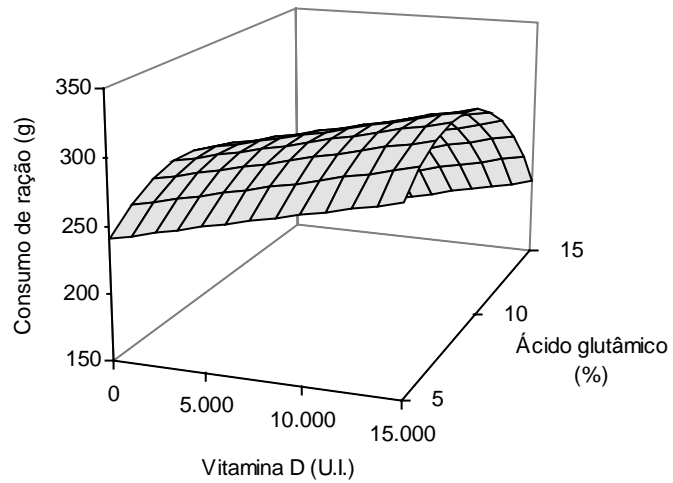
Quanto aos valores de conversão alimentar, verificou-se que a melhor taxa estimada foi de 1,58 obtida com nível estimado de 8,40% de L-Glu e 5.000 UI de VD, conforme Quadro 7, Figura 3. Os resultados obtidos quanto aos níveis de L-Glu estudados estão de acordo com MORAES et al. (1984), GUIMARÃES (1988) e PERINI (1993), quando foi necessário a suplementação das dietas com aminoácidos não essenciais para melhorar a conversão alimentar.

Verificou-se piora significativa ($P < 0,01$) na conversão alimentar com 5 e 15% de L-Glu, devido ao menor consumo de ração e ganho de peso dessas aves.

As aves com baixa capacidade de locomoção, devido à severidade dos problemas de pernas não foram capazes de competir com as outras aves para alcançar a água e a ração, e, conseqüentemente, apresentaram piora no desempenho.

A partir dos resultados obtidos, verificou-se que o L-Glu foi considerado boa fonte de nitrogênio não específico, e que os pintos jovens devem ser supridos com níveis de vitamina D₃ mais altos que os normalmente utilizados em dietas purificadas, para prevenir raquitismo e outros problemas ósseos, além de otimizar as variáveis de desempenho, levando-se em consideração o fato das aves comerciais serem criadas na presença limitada da luz solar.

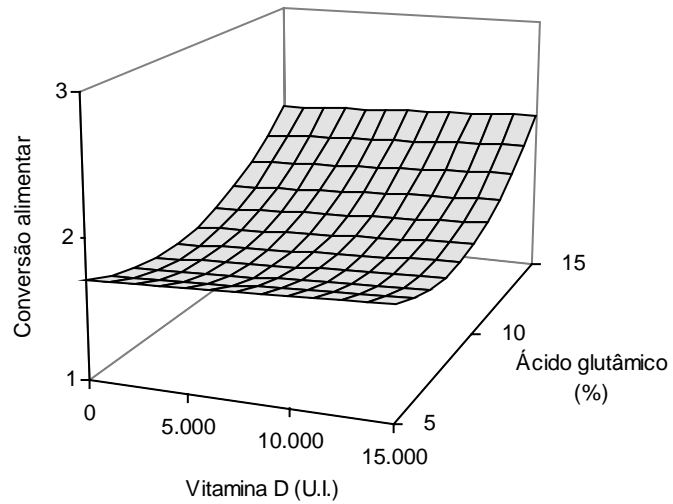
$$\hat{Y} = 88,6939 + 43,3804^{**}Glu - 2,5571^{**}Glu^2 + 0,003171^{**}VD \quad R^2=0,91$$



** Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste t.

Figura 2 - Estimativa do consumo de ração em função de níveis de ácido glutâmico (Glu) e vitamina D₃ (VD).

$$\hat{Y} = 2,5287 - 0,2319^{**}Glu + 0,01380^{**}Glu^2 + 0,000006224^{*}VD \quad R^2=0,71$$



** e * Significativos a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste t.

Figura 3 - Estimativa da conversão alimentar em função de níveis de ácido glutâmico (Glu) e de vitamina D₃ (VD).

3.2. Problemas de Pernas

Os percentuais médios de incidência de problemas de pernas obtidos experimentalmente estão relacionados no Quadro 8.

Quadro 8 - Percentual médio de pintos de corte distribuídos entre os escores

Ácido L-Glutâmico (%)	Vitamina D ₃ (UI)	Porcentagem de aves distribuídas entre os escores (%)			
		Normal	Ligeiramente deformada	Deformidade severa	Completamente deformada
5	0	25,59	24,40	16,08	33,93
	5.000	37,92	32,92	18,74	10,42
	10.000	28,57	34,29	14,28	22,86
	15.000	30,54	36,79	21,96	10,71
	Média		30,65	32,10	17,76
10	0	55,36	37,50	7,14	0,00
	5.000	56,55	43,45	0,00	0,00
	10.000	46,43	50,00	0,00	3,57
	15.000	92,86	7,14	0,00	0,00
	Média		62,80	34,52	7,14
15	0	80,95	8,33	10,72	0,00
	5.000	96,43	3,57	0,00	0,00
	10.000	91,67	4,17	4,16	0,00
	15.000	92,26	4,17	3,57	0,00
	Média		90,33	5,06	4,61

O maior percentual de pintos sem deformidades nas pernas foi observado com 15% de L-Glu (Quadro 8), mas apesar da redução na incidência e na severidade dos problemas de pernas, essas aves apresentaram o pior desempenho.

As aves alimentadas com dietas suplementadas com altos níveis de VD apresentaram maior percentual de aves normais, o que confirma os resultados obtidos por EDWARDS et al. (1992) e YARGER et al. (1995), que somente com níveis de vitamina D bem acima do recomendado houve redução dos problemas de pernas.

No entanto, CRUICKSHANK e SIM (1987), verificaram aumento na incidência de problemas de pernas com alto nível de vitamina D associado à alta densidade, em frangos de corte, Hubbard, alojados em baterias aquecidas.

Assim como o encontrado, RIBEIRO et al. (1995a) e MORAES et al. (1997) observaram maior incidência de problemas de pernas ($P < 0,01$) nas aves alimentadas com baixo nível de nitrogênio não específico e acentuada redução do mesmo quando se elevou o nível de nitrogênio não específico da dieta para 12,5% de L-Glu ou quantidades isonitrógenas de L-Glu e L-Ala.

Os resultados obtidos estão de acordo ainda com CHEVILLE e HORST (1981), ROBERSON e EDWARDS (1994), SINGH e GREWALL (1994) e XU e SOARES (1998), os quais verificaram redução nos problemas de pernas, sendo que a suplementação de níveis de vitamina D na dieta reduziu a incidência dos problemas de pernas.

Corroborando o encontrado, GOFF e HORST (1995), utilizando pintos Peterson Arbor Acre, alimentados com ração a base de milho-farelo de soja ou dietas purificadas suplementadas com 0 a 75 μg de colecalciferol/kg de dieta, observaram que as aves deficientes em colecalciferol foram severamente raquíticas e de baixo peso corporal. As aves que receberam dieta purificada foram eliminadas aos 15 dias de idade, devido à severidade das deformações.

4. RESUMO E CONCLUSÕES

Foram utilizados 336 pintos de corte, de um dia, machos, Hubbard, por um período de 14 dias, com peso médio inicial de 40 g, criados em baterias aquecidas com piso de tela elevado. Utilizou-se um esquema fatorial com delineamento inteiramente casualizado 3 x 4 (3 níveis de L-glutâmico x 4 níveis de vitamina D₃), consistindo de 12 tratamentos, quatro repetições e sete aves por repetição. Os tratamentos consistiram de níveis de 5, 10 e 15% de L-glutâmico (L-Glu) e 0; 5.000; 10.000 e 15.000 UI/kg de vitamina D₃ (VD). Todas as aves receberam uma dieta básica purificada contendo todos os L-aminoácidos essenciais, vitaminas e minerais.

As suplementações com L-Glu e vitamina D₃ influenciaram as variáveis de desempenho (ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar). Relacionando os níveis de L-Glu e VD estudados, observou-se ganho de peso máximo estimado (192,61 g) com 8,56% de L-Glu e 15.000 UI de vitamina D₃, maior consumo estimado (320,24 g) com nível estimado de 8,48% de L-Glu e 15.000 UI de vitamina D₃, melhor taxa de conversão alimentar estimada (1,58) com 8,40% de L-Glu e 5.000 UI de vitamina D₃.

Quanto aos problemas de pernas, observou-se maior incidência com baixos níveis de nitrogênio não específico, 5% de L-Glu. Com 10% de L-Glu e 15.000 UI de VD, as aves apresentaram-se normais em quase sua totalidade, e com o melhor desempenho experimental. Apesar das aves alimentadas com de 15% de L-Glu apresentarem grande porcentagem de aves normais, as mesmas apresentaram o pior desempenho.

Levando-se em consideração as respostas biológicas das aves quanto aos parâmetros avaliados, recomenda-se 8,56% de L-Glu e 15.000 UI de VD para pintos de corte de 1 a 14 dias de idade para atender ao ganho de peso, consumo de ração, conversão alimentar e redução na incidência de problemas de pernas.

CAPÍTULO 2

EFEITOS DO ÁCIDO L-GLUTÂMICO E DA VITAMINA D₃ NOS PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS DE TIBIOTARSOS E FÊMURES DE PINTOS DE CORTE

1. INTRODUÇÃO

O tecido ósseo é formado por uma estrutura orgânica composta de fibrilas, principalmente colágeno e proteínas não colagenosas, na qual se deposita a fase mineral, composta principalmente de hidroxiapatita.

O crescimento e a remodelação dos ossos longos das aves são regulados por complexas interações entre o potencial genético, fatores de crescimento, influências ambientais e pela nutrição, que influenciam a fisiologia do osso.

No passado, o osso era considerado apenas um tecido de suporte mecânico importante para compor a estrutura do animal. Hoje, sabe-se que além de suportar a musculatura e todo o peso do animal, está intimamente relacionado com o crescimento em geral (TARDIN, 1995).

Sabe-se que a presença de quantidades adequadas de vitamina D são requeridas para o crescimento normal, maturação e mineralização do osso, e para a manutenção do tecido ósseo maduro (NORMAN e HURWITZ, 1993, ANDERSON e TOVERUD, 1994).

RODRIGUES et al. (1996) observaram que pintos alimentados com 12,5% de L-Glu apresentaram melhor crescimento ósseo que aqueles que receberam 5%, confirmando que o nível de nitrogênio não específico de dietas purificadas é fundamental para o desenvolvimento de pintos, conforme observações feitas por FEATHERSTON (1976), MARUYAMA et al. (1976), MORAES et al. (1987).

O papel dos fatores nutricionais é o mais relevante para a resistência óssea, podendo ser subdividido em nutrientes orgânicos e inorgânicos.

Vitaminas tais como vitamina D, B₆, C e K são de grande importância na saúde do osso, por estarem envolvidas na síntese de constituintes da matriz, tais como colágeno e osteocalcina, e na formação de ligações cruzadas no colágeno (RATH et al., 2000).

Os objetivos desse estudo foram avaliar os efeitos de níveis de ácido L-glutâmico (L-Glu) e de vitamina D₃ nos parâmetros físicos e químicos de tibiotarsos e fêmures de pintos de corte de 1 a 14 dias de idade.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Procedimentos gerais

O experimento foi realizado utilizando-se esquema fatorial, em delineamento inteiramente casualizado 3 x 4, com 3 níveis de ácido glutâmico (L-Glu) x 4 níveis de vitamina D₃ (VD), no Setor de Avicultura do Departamento de Zootecnia, na Universidade Federal de Viçosa.

Foram utilizados 336 pintos de corte, machos, Hubbard, com 1 dia de idade com peso médio 40 gramas distribuídos aleatoriamente nos tratamentos. Os tratamentos consistiram de dieta básica purificada (GUIMARÃES, 1988) (Quadro 1) contendo todos os aminoácidos essenciais (Quadro 2), vitaminas (Quadro 3) (exceto vitamina D₃), minerais (Quadro 4) e suplementada com três níveis de ácido L-glutâmico (5, 10 e 15%) combinados com quatro níveis de vitamina D₃ (0, 5.000, 10.000, 15.000 UI/kg). Cada tratamento consistiu de quatro repetições de sete aves cada. As aves foram alojadas em baterias aquecidas com pisos de tela elevados e receberam água e dieta *ad libitum* durante todo o período experimental de 14 dias.

Quadro 1 – Dieta básica purificada

Ingredientes	Quantidade (%)
Aminoácidos não essenciais ^{1/}	Variável
Aminoácidos essenciais ^{2/}	8,94
Mistura vitamínica ^{3/}	4,48
Mistura mineral ^{4/}	9,10
Óleo de soja	15,00
Bicarbonato de sódio	1,00
Amido	qsp 100,00

1/ Ácido L-glutâmico: 5%, 10% e 15%.

2/ veja Quadro 2.

3/ veja Quadro 3.

4/ veja Quadro 4.

Quadro 2 – Aminoácidos essenciais^{1/}

Aminoácidos	Quantidade (%)
L – Arginina. HCl	1,15
L – Histidina. HCl. H ₂ O	0,41
L – Lisina. HCl	1,14
L – Tirosina	0,45
L – Fenilalanina	0,50
L – Triptofano	0,15
L – Metionina	0,35
L – Cisteína	0,45
L – Treonina	0,65
L – Leucina	1,00
L – Isoleucina	0,60
L – Valina	0,69
L – Prolina	0,40
Glicina	1,00

1/ SASSE e BAKER (1973).

Quadro 3 – Mistura Vitamínica^{1/}

Ingredientes	Quantidade/kg de dieta
Cloreto de Colina 60 %	3,3 g
Retinil Palmitato	5.000 UI
Colecalciferol ^{2/}	Variável
D - α - tocoferil acetato	22 UI
Menadiona sódio bissulfito	2,0 mg
Inositol	1,0 g
Riboflavina	9,0 mg
Tiamina. HCl	6,0 mg
Pantotenato de cálcio	20,0 mg
Niacina	50,0 mg
Piridoxina	8,0 mg
Ácido fólico	2,0 mg
Biotina	0,3 mg
B ₁₂ (0,1%)	20,0 mg
BHT	0,125 mg
Excipiente	Variável

1/ FEATHERSTON e ROGLER (1978).

2/ 0, 5.000, 10.000 e 15.000UI/kg.

Fonte: ROCHE.

Quadro 4 – Mistura Mineral^{1/}

Ingredientes	Quantidade/kg de dieta
CaCO ₃	18,6526 g
CaHPO ₄ . 2H ₂ O	30,5300 g
K ₂ HPO ₄	11,2000 g
NaCl	6,0000 g
FeSO ₄	0,2000 g
ZnO	0,1225 g
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,0150 g
MnSO ₄ . H ₂ O	0,5100 g
KI	0,0400 g
MgCO ₃	2,5000 g
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	1,0000 g
Na ₂ SeO ₃	0,2200 mg
Excipiente (casca de arroz)	30,0000 g

1/ FEATHERSTON e ROGLER (1978).

2.2. Determinação dos parâmetros físicos

Ao término do período experimental, 16 aves de cada tratamento foram selecionadas ao acaso, sacrificadas por deslocamento cervical e os ossos (tibiotalos e fêmures) de ambas as pernas removidos, limpos de todo tecido aderente, medidos seus comprimentos e diâmetros, com o uso de paquímetro e, então, pesados.

A resistência à quebra ou flexão dos ossos foi avaliada utilizando-se o Instron Corporation IX Automated Materials Testing System 1,09, adaptado com peças de acordo com o tamanho dos ossos, sempre mantendo o mesmo ponto de quebra.

2.3. Determinação de minerais nas cinzas:

Dez ossos (tibiotalos e fêmures) de cada tratamento foram utilizados para a determinação dos teores de cinzas em forno do tipo Mufla a 600 °C. A seguir, as cinzas foram utilizadas para o preparo da solução mineral. Esta solução mineral aquosa consistiu em dissolver as cinzas contidas nos cadinhos em 15 mL de solução de ácido clorídrico (1 :1), a fim de solubilizar os minerais presentes nas cinzas. O ácido foi evaporado em banho de areia por 30 minutos. O aquecimento em meio ácido tem a função de descomplexar os minerais, a fim de que sejam dosados nas análises subsequentes. Após o resfriamento dos cadinhos, o seu material foi redissolvido em água destilada e deionizada, filtrado em papel-filtro, recebendo o filtrado em balão volumétrico de 100 mL, obtendo-se, assim, a solução mineral.

As concentrações de cálcio, magnésio nas cinzas de ambos os ossos foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica. As concentrações de fósforo nas cinzas de ambos os ossos foram determinados por colorimetria. Essas determinações foram feitas conforme metodologias descritas por SILVA (1990).

2.4. Análise estatística:

A análise estatística dos dados obtidos foi feita por regressão. A escolha do melhor modelo baseou-se no coeficiente de determinação (R^2), na significância dos coeficientes de regressão pelo teste “t” de Student e na coerência com o fenômeno biológico.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Comprimento, diâmetro e resistência à quebra de fêmures e tibiotarsos

Os valores médios de comprimento, diâmetro e resistência óssea do fêmur e tibiotarso dos pintos de corte são apresentados no Quadro 5. O resumo da análise de variância encontra-se no Quadro 6.

Nas Figuras 1 e 2, observou-se efeito significativo de tratamento ($P < 0,01$) no comprimento do fêmur e tibiotarso. Os comprimentos máximos estimados (37,61 mm para o fêmur e 50,36 mm para o tibiotarso) foram obtidos com 9,51% de L-Glu e 15.000 UI de VD, e 9,99% de L-Glu e 15.000 UI de VD, respectivamente (Quadro 7).

O osso é um tecido heterogêneo complexo que suporta a musculatura, e, dessa forma, seu crescimento e desenvolvimento estão intimamente ligados com o crescimento corporal total. Assim, as aves que apresentaram o pior desempenho (Quadro 5, Capítulo 1) apresentaram também piora no desenvolvimento ósseo.

Os menores comprimentos dos ossos tibiotarso e fêmur foram obtidos com 5 e 15% de L-Glu, o que confirma o obtido por SILVA (1995), que observou redução dos comprimentos de tibiotarsos e fêmures com a suplementação de 5% de L-Glu.

Os resultados obtidos estão de acordo com CHEVILLE e HORST (1981), HEDSTROM et al. (1986) e PERRY et al. (1991), que observaram

diferenças no comprimento dos tibiotarsos e fêmures na deficiência e na suplementação de VD.

Quadro 5 - Comprimento, diâmetro e resistência média do fêmur e do tibiotarso de pintos de corte de 1 a 14 dias de idade

Característica	Vitamina D ₃ (UI)	Ácido L-glutâmico (%)			Média
		5	10	15	
Comprimento do fêmur (mm)	0	32,68	34,13	32,00	32,94
	5.000	33,75	35,63	32,25	33,88
	10.000	34,75	37,00	34,00	35,25
	15.000	35,75	37,25	35,00	36,00
Média		34,23	36,00	33,31	
Comprimento do tibiotarso (mm)	0	41,25	46,13	42,63	43,34
	5.000	44,13	48,00	45,00	45,71
	10.000	46,00	48,25	45,75	46,67
	15.000	48,25	49,88	46,25	48,13
Média		44,91	48,07	44,91	
Diâmetro do fêmur (mm)	0	3,00	3,50	3,00	3,17
	5.000	3,00	3,63	3,00	3,21
	10.000	3,50	3,63	3,00	3,38
	15.000	3,83	3,50	2,75	3,36
Média		3,33	3,57	2,94	
Diâmetro do tibiotarso (mm)	0	3,00	3,33	3,00	3,11
	5.000	3,13	3,33	3,00	3,15
	10.000	3,38	3,25	2,75	3,13
	15.000	3,88	3,13	2,63	3,21
Média		3,35	3,26	2,85	
Resistência do fêmur (kgf/cm ²)	0	43,01	34,96	29,09	35,69
	5.000	35,37	41,08	28,72	35,06
	10.000	38,17	53,12	34,04	41,78
	15.000	47,03	34,99	25,96	35,99
Média		40,90	41,04	29,45	
Resistência do tibiotarso (kgf/cm ²)	0	36,97	33,35	24,79	35,04
	5.000	36,13	40,56	31,05	35,91
	10.000	39,31	42,97	30,74	37,67
	15.000	51,78	38,27	23,62	37,89
Média		41,05	38,79	27,55	

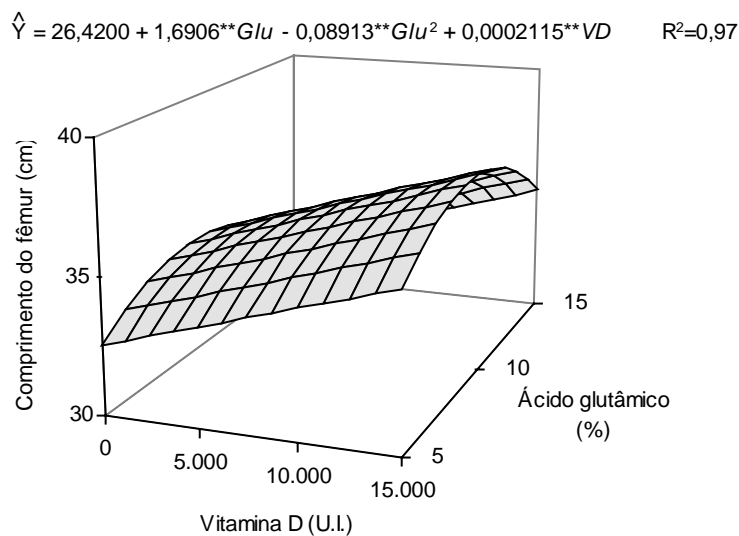
Quadro 6 – Significância da estatística F de diferentes fontes de variação e coeficiente de variação experimental (C.V.) para comprimento, diâmetro e resistência de fêmures e tibiotarsos

Fonte de variação	Fêmur			Tibiotarso		
	Comprimento	Diâmetro	Resistência	Comprimento	Diâmetro	Resistência
L-Glu	**	**	**	**	**	**
Vitamina D ₃	**	ns	**	**	ns	**
L-Glu x vitamina D ₃	ns	*	**	**	**	**
C.V. (%)	2,01	10,54	8,14	1,74	7,98	9,17

** Significativo pelo teste F (P < 0,01).

* Significativo pelo teste F (P < 0,05).

ns não significativo.



** Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste t.

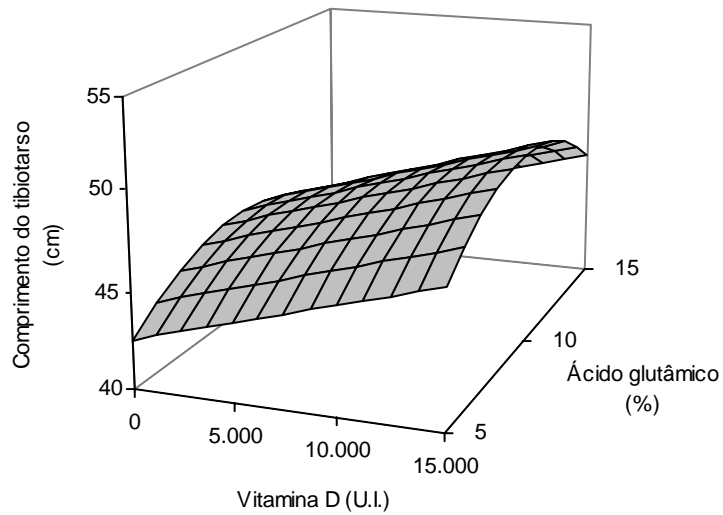
Figura 1 - Estimativa do comprimento do fêmur em função de níveis de ácido L-glutâmico (Glu) e vitamina D₃ (VD).

Quadro 7 – Estimativa de níveis de ácido L-glutâmico (L-Glu) e vitamina D₃ (VD) para pinos de corte, considerando as características dos fêmures e tibiotarsos

Característica	Equação ajustada	R ²	Resposta Máxima	Estimativa	
				L-Glu (%)	Vitamina D (UI)
Comprimento do fêmur (mm)	$Y = 26,4200 + 1,6906^{**}Glu - 0,08913^{**}Glu^2 + 0,0002115^{**}VD$	0,97	37,61	9,51	15.000
Diâmetro do fêmur (mm)	$Y = 1,5738 + 0,3590^{**}Glu - 0,01712^{**}Glu^2 + 0,00008933^{**}VD - 0,000007450^{**}GluVD$	0,91	3,62	10,49	15.000
Resistência do fêmur (kgf/cm ²)	$Y + 26,5932 + 3,5460^{**}Glu - 0,2345^{**}Glu^2 + 0,0009260^{**}VD + 0,00000005157^{**}VD^2$	0,56	52,47	7,57	8.978
Comprimento do tibiotarso (mm)	$Y = 33,1375 + 2,5250^{**}Glu - 0,1263^{**}Glu^2 + 0,0003067^{**}VD$	0,91	50,36	9,99	15.000
Diâmetro do tibiotarso (mm)	$Y = 2,4177 + 0,1468^{*}Glu - 0,006650^{**}Glu^2 + 0,00009030^{**}VD - 0,000008500^{**}GluVD$	0,90	3,17	11,04	15.000
Resistência do tibiotarso (kgf/cm ²)	$Y = 30,2810 + 2,2424^{**}Glu - 0,1796^{**}Glu^2 + 0,001006^{**}VD - 0,00000003995^{**}VD^2$	0,73	43,35	6,25	12.591

** e * Significativo ao nível de 1% e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste t.

$$\hat{Y} = 33,1375 + 2,5250^{**}Glu - 0,1263^{**}Glu^2 + 0,0003067^{**}VD \quad R^2=0,91$$



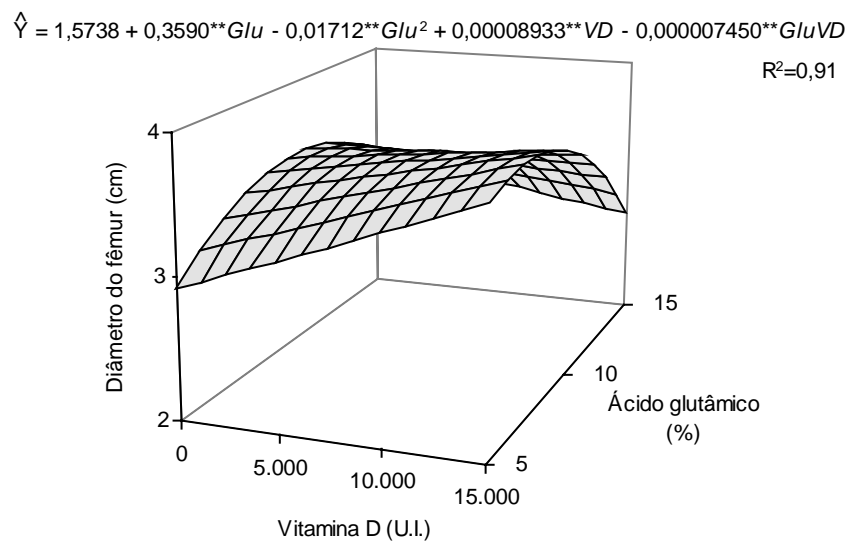
** Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste t.

Figura 2 - Estimativa do comprimento do tibiotarso em função de níveis de ácido glutâmico (Glu) e vitamina D₃ (VD).

Na Figuras 3 e 4, observou-se diâmetro máximo estimado de 3,57 mm com 10,49% de L-Glu e de 10.000 UI de VD, para o fêmur e diâmetro máximo estimado de 3,17 mm com 11,04% de L-Glu e 15.000 UI de VD, respectivamente (Quadro 7).

Os pintos jovens necessitaram de altos níveis de VD para maximizarem os parâmetros ósseos. Essas observações permitem sugerir que as aves de crescimento rápido não estão produzindo diidroxicalciferol a partir da vitamina D₃ suficientemente rápido, para absorver cálcio e, conseqüentemente, permitir bom desenvolvimento ósseo.

Pintos alimentados com níveis de 10% de L-Glu, como fonte de nitrogênio não específico apresentaram melhor crescimento ósseo que aqueles alimentados com baixo nível de nitrogênio não específico (5%), confirmando que o nível de nitrogênio não específico de dietas purificadas é essencial para o desenvolvimento corporal das aves. O nível é ainda variável conforme observações feitas por diversos autores. MORAES et al. (1984) e GUIMARÃES et al. (1993) verificaram ser necessário 10% de L-Glu ou quantidades isonitrógenas de L-Glu e L-Ala para pintos de corte criados no chão ou em bateria aquecida. SILVA e MORAES (1995) observaram que, para o crescimento adequado de fêmures e tibiotarsos de pintos de corte, foi necessário o mínimo de 7,5% de L-Glu.

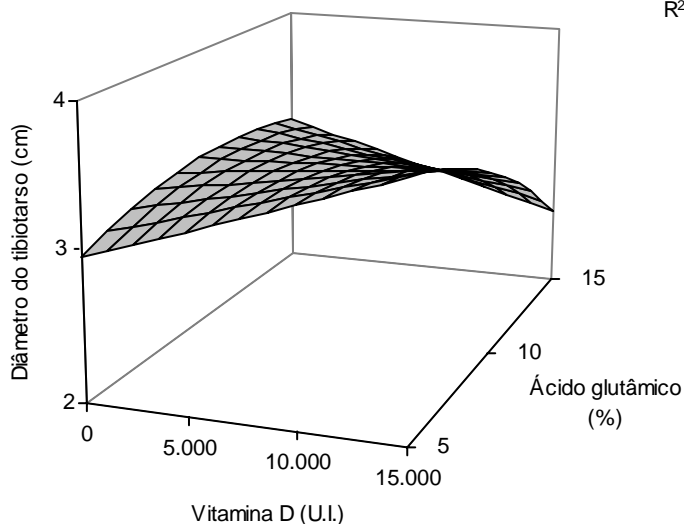


** Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste t.

Figura 3 - Estimativa do diâmetro do fêmur em função de níveis de ácido glutâmico (Glu) e vitamina D₃ (VD).

$$\hat{Y} = 2,4177 + 0,1468*Glu - 0,006650**Glu^2 + 0,00009030**VD - 0,000008500**GluVD$$

R²=0,90



** e * Significativos a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste t.

Figura 4 - Estimativa do diâmetro do tibiotarso em função de níveis de ácido glutâmico (Glu) e vitamina D₃ (VD).

A resistência máxima estimada para o fêmur foi de 52,47 kgf/cm² com 7,57% de L-Glu e de 8.978 UI de VD (Quadro 7, Figura 5). Para o tibiotarso, a resistência máxima estimada foi de 43,35 kgf/cm² obtida com 6,24% de L-Glu e 12.591 UI de VD (Figura 6).

Os resultados obtidos confirmam o encontrado por LOFTON e SOARES (1986), que verificaram redução na resistência dos tibiotarsos quando os frangos de corte foram alimentados com dietas à base de milho e farelo de soja contendo baixos níveis de vitamina D₃/kg de ração e aumento na resistência dos tibiotarsos com altos níveis na ração.

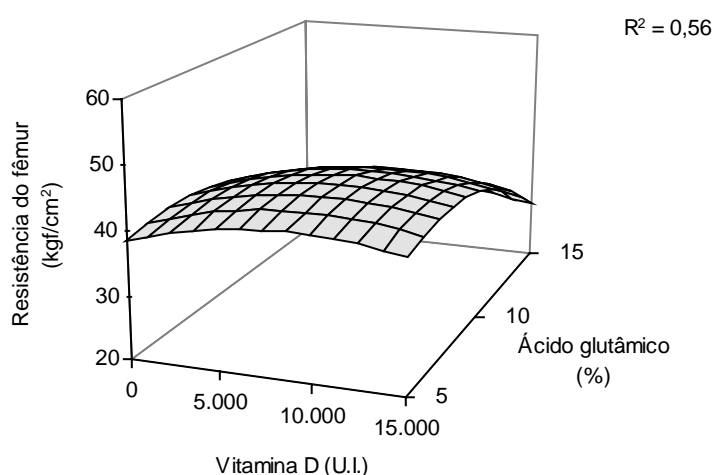
As aves de crescimento rápido apresentam discrepância entre o peso corporal e o comprimento do tibiotarso, aparentemente como resultado do melhoramento para acúmulo de massa muscular. O peso corporal aumenta mesmo quando o crescimento longitudinal do tibiotarso cessa, o que leva, então, à redução na resistência do tibiotarso, que teria que suportar maior peso corporal.

YALÇIN et al. (1998) relataram que a resistência do tibiotarso está relacionada com o comprimento dos ossos, o que poderia explicar, em parte os nossos resultados, quando houve um aumento na resistência do tibiotarso e fêmur com o aumento nos níveis de VD.

Excesso de consumo de nitrogênio pode produzir balanço negativo de cálcio e atrofia no crescimento e resistência óssea, como observado com 15% de L-Glu.

Não apenas os minerais, mas também os constituintes da matriz orgânica também são responsáveis pela resistência óssea. Observou-se que o aumento nas concentrações de proteínas não colagenosas (PNC) (Quadro 5, Capítulo 3) com o consumo de excesso de nitrogênio não específico reduziu a resistência de fêmures e tibiotarsos de pintos de corte.

$$\hat{Y} = 26,5932 + 3,5460^{**}Glu - 0,2345^{**}Glu^2 + 0,0009260^{**}VD + 0,00000005157^{**}VD^2$$

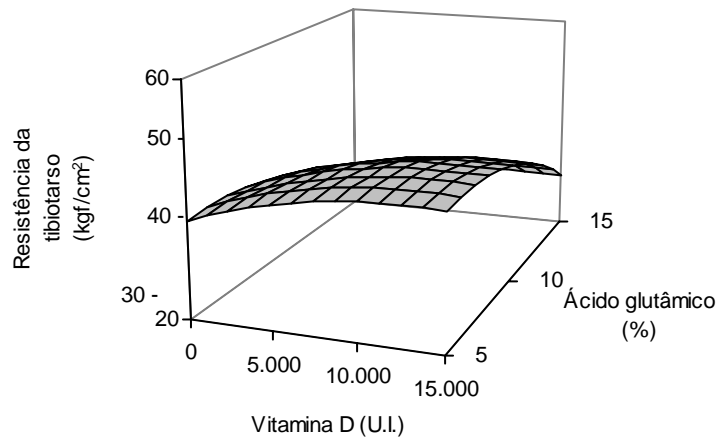


** Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste t.

Figura 5 - Estimativa da resistência do fêmur em função de níveis de ácido glutâmico (Glu) e vitamina D₃ (VD).

$$\hat{Y} = 30,2810 + 2,2424^{**}Glu - 0,1796^{**}Glu^2 + 0,001006^{**}VD - 0,00000003995^{**}VD^2$$

(R²=0,73; ** 1%, Teste t)



** Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste t.

Figura 6 - Estimativa da resistência do tibiotalso em função de níveis de ácido glutâmico (Glu) e vitamina D₃ (VD).

3.2. Porcentagem de cinza óssea do tibiotalso e fêmur

Os valores médios de cinzas do tibiotalso e do fêmur de pintos de corte de 1 a 14 dias de idade são apresentados no Quadro 8. O resumo da análise de variância encontra-se no Quadro 9.

As porcentagens de cinzas no fêmur e tibiotalso foram significativamente ($P < 0,01$) influenciadas pelos níveis de L-Glu e de VD, sendo que a porcentagem máxima estimada (44,37% para o fêmur e 40,73% para o tibiotalso) foram obtidas com 15% de L-Glu e 8.502 UI de VD e 15% de L-Glu e 15.000 UI de VD, respectivamente.

Os pintos que receberam dieta suplementada com 5% de L-Glu apresentaram os mais baixos teores de cinzas dos ossos tibiotalso e fêmur, diretamente relacionado com a maior incidência de problemas de pernas

(Quadro 8, Capítulo 1). Essa redução no teor de cinza óssea pôde ser revertida pela suplementação com vitamina D dietética

Corroborando os resultados observados, EDWARDS (1988, 1990) e VAIANO et al. (1994) relataram que a adição de metabólitos da vitamina D à dieta reduz a incidência e severidade de problemas de pernas e aumenta o conteúdo de cinza óssea

Ainda de acordo com o observado, HEDSTROM et al. (1986) descreveram raquitismo em perus de corte, que receberam dieta sintética deficiente em vitamina D. Além disso, houve decréscimo na cinza óssea, e nos minerais cálcio, fósforo e magnésio nas cinzas.

HURWITZ et al. (1973), SANDERS e EDWARDS (1991), ROBERSON e EDWARDS (1994) e SINGH e GREWAL (1994) também observaram aumento na porcentagem de cinza óssea nas aves que receberam dietas suplementadas com vitamina D₃ e decréscimo na incidência de raquitismo nos animais alimentados com altos níveis.

Quadro 8 – Porcentagem de cinzas do fêmur e do tibiotarso de pintos de corte de 1 a 14 dias de idade

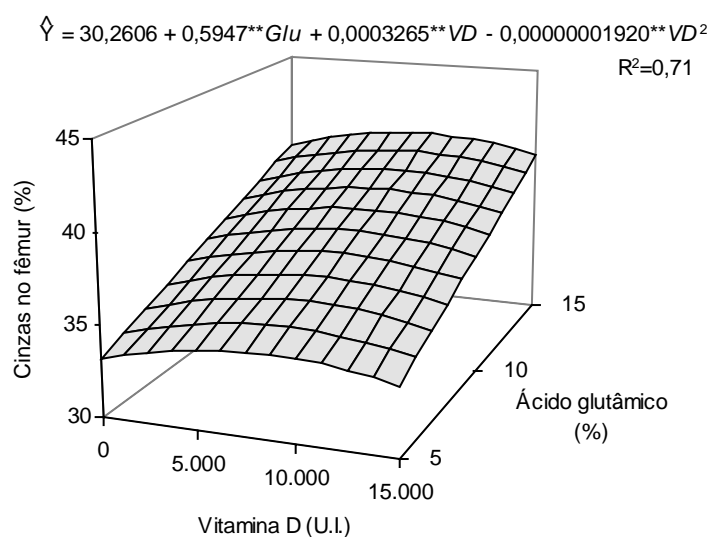
Característica	Vitamina D (UI)	Ácido L-glutâmico (%)			Média
		5	10	15	
Cinzas no fêmur (%)	0	33,82	33,98	40,34	36,05
	5.000	34,63	39,09	39,81	37,84
	10.000	35,73	35,91	39,57	37,07
	15.000	31,40	39,78	39,66	36,95
Média		33,90	37,19	39,85	
Cinzas no tibiotarso (%)	0	25,82	29,00	37,17	30,66
	5.000	33,63	29,13	39,16	33,97
	10.000	30,91	31,18	38,00	33,36
	15.000	33,08	37,36	38,68	36,37
Média		30,86	31,67	38,25	

Quadro 9 – Significância da estatística F de diferentes fontes de variação e coeficiente de variação experimental (C.V.) para porcentagens de cinzas nos fêmures e tibiotarsos

Fonte de variação	Cinzas	
	Fêmur	Tibiotarso
L-Glu	**	**
Vitamina D ₃	**	**
L-Glu x vitamina D ₃	**	**
C.V. (%)	2,32	4,58

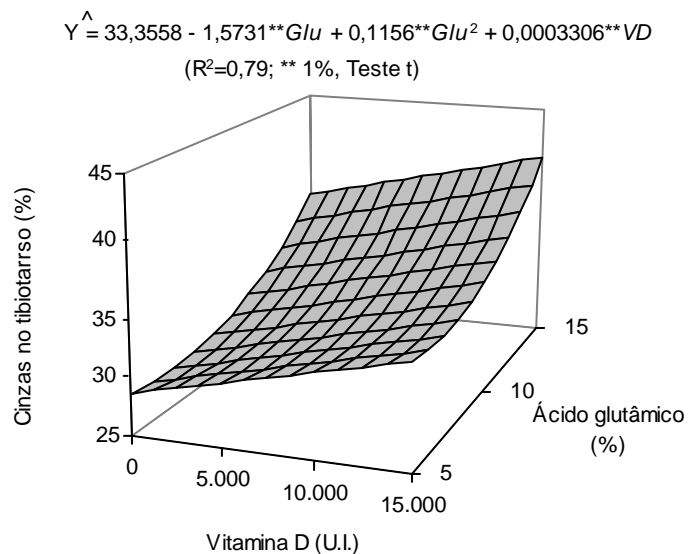
** Significativo pelo teste F (P < 0,01).

* Significativo pelo teste F (P < 0,05).



** Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste t.

Figura 7 - Estimativa dos teores de cinzas no fêmur em função de níveis de ácido glutâmico (Glu) e vitamina D₃ (VD).



** Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste t.

Figura 8 - Estimativa dos teores de cinzas no tibiotarso em função de níveis de ácido glutâmico (Glu) e vitamina D₃ (VD).

3.3. Concentrações de cálcio, fósforo, magnésio e relação Ca:P nas cinzas dos fêmures e tibiotarsos:

O Quadro 10 apresenta as concentrações médias obtidas para cálcio, fósforo, magnésio e relação Ca:P nas cinzas dos fêmures e dos tibiotarsos. O resumo da análise de variância encontra-se no Quadro 11.

Foram observados efeitos significativos ($P < 0,01$) dos níveis de L-Glu e de VD nas concentrações de cálcio nas cinzas dos fêmures. Na Figura 9, verificou-se redução nas concentrações de cálcio nas cinzas dos fêmures com a suplementação de L-Glu. A concentração de cálcio atingiu o mínimo (33,20%) no fêmur foi obtido com 15% de L-Glu e 9.694 UI de VD (Quadro 12).

Ao contrário dos resultado obtidos, RIBEIRO et al. (1995) não encontraram diferença significativa ($P > 0,05$) nas concentrações de cálcio nas cinzas dos fêmures de pintos de corte que receberam dietas experimentais com diferentes níveis de nitrogênio não específico.

Quadro 10 – Concentrações médias de cálcio, fósforo, relação cálcio:fósforo e magnésio nas cinzas do fêmur e tibiotarso

Característica	Vitamina D ₃ (UI)	Ácido L-glutâmico (%)			Média
		5	10	15	
Cálcio no fêmur (%)	0	44,33	36,83	34,29	38,48
	5.000	39,34	35,67	33,94	36,32
	10.000	36,56	37,03	33,70	35,76
	15.000	37,14	37,15	35,28	36,52
	Média		39,34	36,67	34,30
Cálcio no tibiotarso (%)	0	38,14	37,64	36,80	37,53
	5.000	39,76	37,01	36,52	37,76
	10.000	38,60	36,71	35,29	36,87
	15.000	34,82	35,72	37,06	35,87
	Média		37,83	36,77	36,42
Fósforo no fêmur (%)	0	21,18	20,93	19,07	20,39
	5.000	21,17	19,98	19,03	20,06
	10.000	19,01	21,24	20,93	20,39
	15.000	19,27	19,38	20,72	19,79
	Média		20,16	20,38	19,94
Fósforo no tibiotarso (%)	0	22,59	20,08	21,41	21,36
	5.000	20,44	20,57	19,61	20,21
	10.000	21,64	21,32	20,67	21,21
	15.000	19,07	19,63	19,66	19,45
	Média		20,94	20,40	20,34
Relação cálcio:fósforo no fêmur	0	2,10	1,76	1,80	1,89
	5.000	1,86	1,78	1,78	1,81
	10.000	1,92	1,74	1,61	1,76
	15.000	1,93	1,91	1,70	1,85
	Média		1,95	1,80	1,72
Relação cálcio:fósforo no tibiotarso	0	1,69	1,87	1,72	1,76
	5.000	1,96	1,80	1,86	1,87
	10.000	1,78	1,72	1,71	1,74
	15.000	1,82	1,82	1,89	1,84
	Média		1,81	1,80	1,80
Magnésio no fêmur (%)	0	1,05	1,05	1,02	1,04
	5.000	1,10	0,80	0,86	0,92
	10.000	0,97	0,80	0,74	0,84
	15.000	0,67	0,81	0,71	0,73
	Média		0,95	0,87	0,83
Magnésio no tibiotarso (%)	0	1,05	0,85	0,95	0,95
	5.000	1,20	1,00	0,92	1,04
	10.000	0,83	0,96	0,83	0,87
	15.000	0,94	0,90	0,98	0,94
	Média		1,01	0,93	0,92

Quadro 11 – Significância da estatística F de diferentes fontes de variação e coeficiente de variação experimental (C.V.) para cálcio (Ca), fósforo (P), magnésio (Mg) e relação Ca:P nas cinzas de fêmures e tibiotarsos

Fonte de variação	Fêmur				Tibiotarso			
	Ca	P	Mg	Ca:P	Ca	P	Mg	Ca:P
L-Glu	**	ns	**	**	ns	ns	*	ns
Vitamina D ₃	**	ns	**	**	ns	**	**	ns
L-Glu x vitamina D ₃	**	**	**	**	ns	ns	**	ns
C.V. (%)	3,16	4,69	11,55	4,40	5,84	5,03	9,02	7,67

** Significativo pelo teste F (P<0,01).

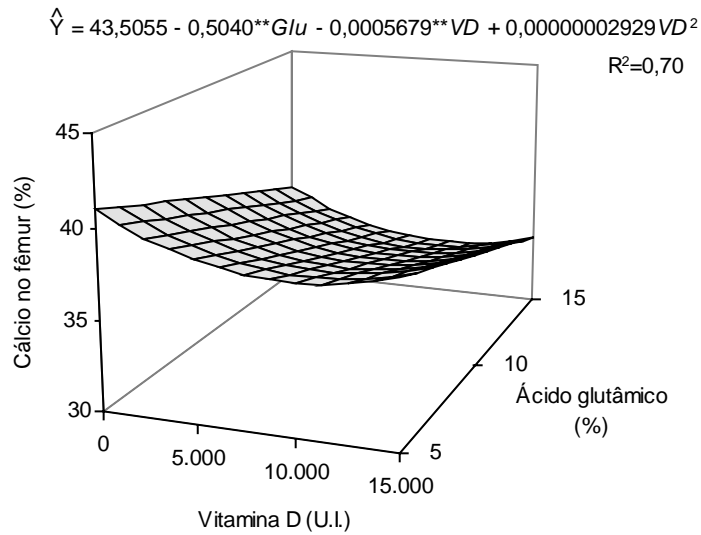
* Significativo pelo teste F (P<0,05).

Ns não significativo.

Na Figura 10, não foi verificado diferença significativa entre os tratamentos nas concentrações de cálcio, que foi constante e igual à 37,01%.

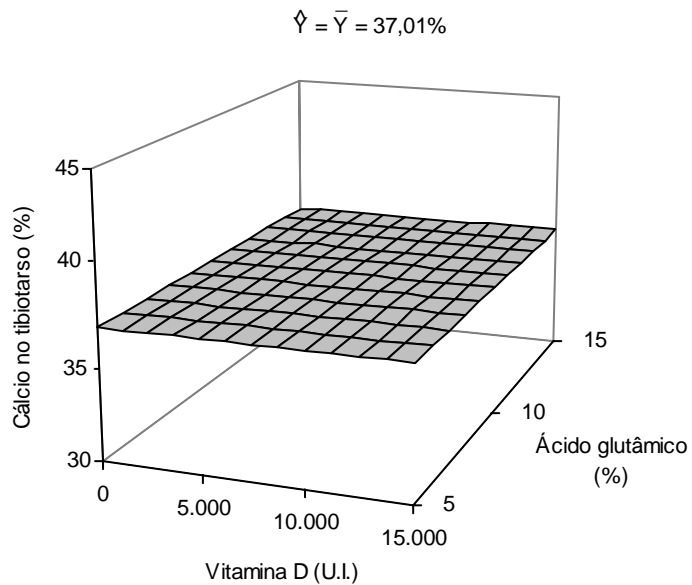
Corroborando o resultado acima, SILVA e MORAES (1995) não verificaram efeito significativo de L-Glu nas concentrações médias de cálcio nos tibiotarsos de pintos de corte aos 14 dias de idade.

No entanto, MORAES et al. (1997) observaram que as aves que receberam os tratamentos em que a dieta básica foi suplementada com 12,5% de L-Glu, apresentaram aumento na concentração de cálcio nos tibiotarsos, discordando dos resultados obtidos.



** Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste t.

Figura 9 - Estimativa da concentração de cálcio no fêmur em função de níveis de ácido glutâmico (Glu) e vitamina D₃ (VD).



** Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste t.

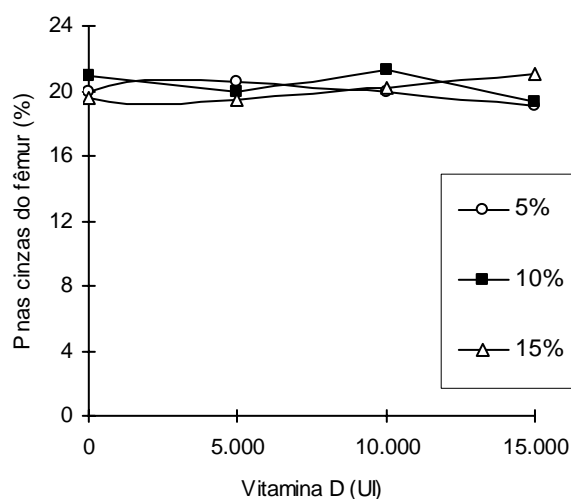
Figura 10 - Estimativa da concentração de cálcio no tibiatarso em função de níveis de ácido glutâmico (Glu) e vitamina D₃ (VD).

Quadro 12 – Estimativa de níveis de ácido L-glutâmico (L-Glu) e vitamina D₃ (VD) para pintos de corte, considerando as porcentagens de cinzas e de minerais nas cinzas de fêmures e tibiotarsos

Característica	Equação ajustada	R ²	Resposta máxima	Resposta mínima	Estimativa	
					L-Glu (%)	Vitamina D ₃ (UI)
Cinzas no fêmur (%)	$Y = 30,2606 + 0,5947^{**}\text{Glu} + 0,0003265^{**}\text{VD} - 0,00000001920^{**}\text{VD}^2$	0,71	44,37	-	15	8.502
Cálcio no fêmur (%)	$Y = 43,5055 - 0,5040^{**}\text{Glu} - 0,0005679^{**}\text{VD} + 2,929 \times 10^{-8}^{**}\text{VD}^2$	0,70	-	33,20	15	9.694
Fósforo no fêmur (%)	$Y = 19,9335 + 0,02961^{**}\text{VD}^{1/2} - 0,0003008^{**}\text{VD}$ (5%)	0,92		19,05	5	15.000
	Y = pontos experimentais (10%)	-	21,24	-	10	10.000
	$Y = 19,5147 - 0,01847^{**}\text{VD}^{1/2} + 0,0002536^{**}\text{VD}$ (15%)	0,66	21,05	-	15	15.000
Magnésio no fêmur (%)	$Y = 1,1504 - 0,01181^{**}\text{Glu} - 0,00002030^{**}\text{VD}$	0,73	-	0,67	15	15.000
Ca:P no fêmur	$Y = 2,1215 - 0,02313^{**}\text{Glu} - 0,00002829^{**}\text{VD} + 1,658 \times 10^{-9}^{**}\text{VD}^2$	0,72	1,95	-	5	15.000
Cinzas no tibiotarso (%)	$Y = 33,3558 - 1,5731^{**}\text{Glu} + 0,1156^{**}\text{Glu}^2 + 0,0003306^{**}\text{VD}$	0,79	40,73	-	15	15.000
Cálcio no tibiotarso (%)	Y = Y = 37,01	.	37,01	37,01	-	-
Fósforo no tibiotarso (%)	Y = Y = 20,55	.	20,55	20,55	-	-
Magnésio no tibiotarso (%)	Y = pontos experimentais (5%)	-	1,20	-	5	5.000
	$Y = 0,8546 + 0,00003368^{**}\text{VD} - 0,000000002075^{**}\text{VD}^2$ (10%)	0,86	0,99		10	8.145
	$Y = 0,9648 - 0,00002580^{**}\text{VD} + 0,000000001700^{**}\text{VD}^2$ (15%)	0,62	-	0,96	15	7.588
Ca:P no tibiotarso	Y = Y = 1,80	.	1,80	1,80	-	-

** e * Significativo ao nível de 1% e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste t.

Nas cinzas dos fêmures dos pintos alimentados com 10% de L-Glu e 10.000 UI de VD encontrou-se as maiores concentrações de fósforo (21,24%). SILVA e MORAES (1995) não encontraram diferença significativa ($P > 0,05$) entre 5 , 7,5 e 10% de L-Glu nas concentrações médias de fósforo, mas decréscimo a partir de 12,5% de L-Glu, e GUIMARÃES et al. (1996) observaram aumento nas concentrações de fósforo nas cinzas, quando as aves foram submetidas à dieta suplementada com 10% de L-Glu.

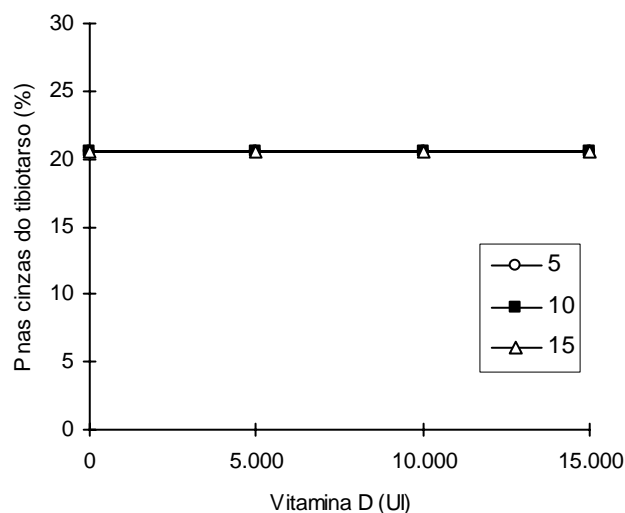


$$5\%: \hat{Y} = 19,9335 + 0,02961 * VD^{1/2} - 0,0003008 * VD \quad R^2 = 0,92$$

$$15\%: \hat{Y} = 19,5147 - 0,01847 * VD^{1/2} + 0,0002536 * VD \quad R^2 = 0,66$$

** e * Significativos a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste t.

Figura 11 - Estimativa da concentração de fósforo nas cinzas do fêmur em função de níveis de vitamina D (VD), em diferentes percentuais de ácido glutâmico (Glu).



$$\bar{Y} = 20,55 \%$$

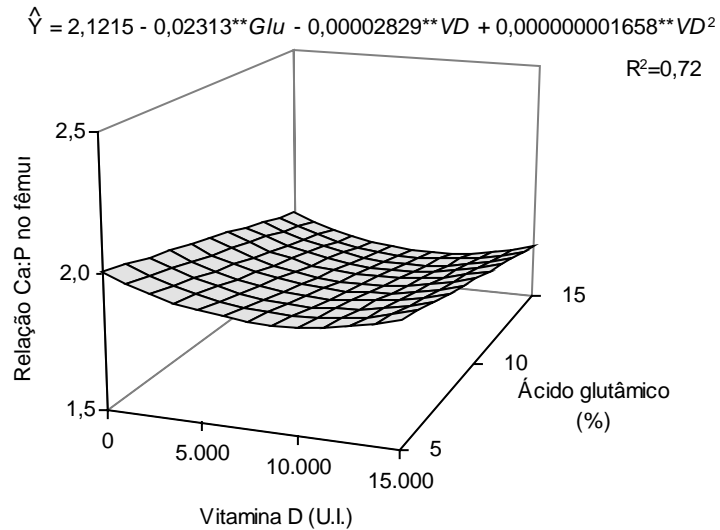
Figura 12 - Estimativa da concentração de fósforo nas cinzas do tibiotarso em função de níveis de vitamina D, em diferentes percentuais de ácido glutâmico.

Ao contrário do observado para a relação Ca:P do fêmur (Figura 13), não foi observado efeito significativo de tratamento na relação Ca:P dos tibiotarsos, constante e igual a 1,80. (Figura 14). A maior relação Ca:P no fêmur (1,95) estimada e próxima de 2:1, que foi utilizada na formulação das dietas, foi obtida com 5% de L-Glu e 15.000 UI de VD. SILVA (1995) observou que somente com altos níveis de L-Glu (12,5%) que a relação Ca:P dos fêmures foi próxima de 2:1. Nos tibiotarsos, assim como o encontrado, não houve efeito significativo ($P > 0,05$) dos níveis de L-Glu na relação Ca:P.

RIBEIRO et al. (1995) não observaram quaisquer diferenças significativas ($P > 0,05$) na relação Ca:P nos fêmures, diferente do observado.

Na figura 15, observou-se efeito linear dos níveis de L-Glu e VD

($P < 0,01$) nas concentrações de magnésio nas cinzas do fêmur, apresentando decréscimo (0,67%) com a suplementação de L-Glu (15%) e VD (15.000 UI).

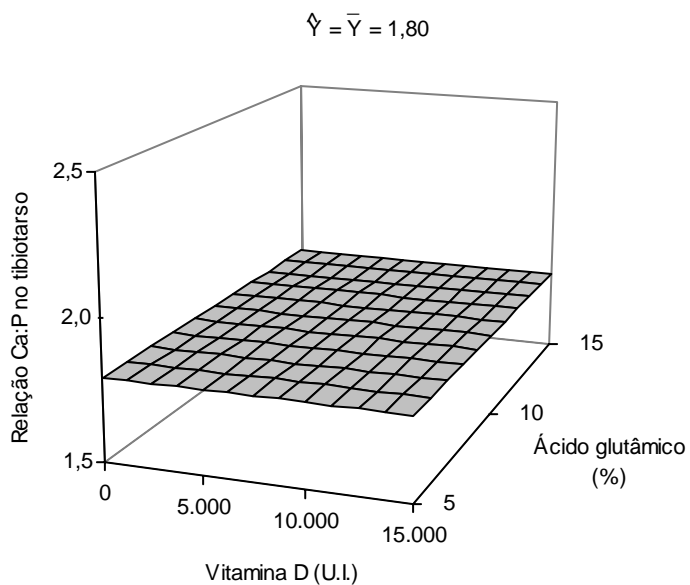


** Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste t.

Figura 13 - Estimativa da relação Ca:P no fêmur em função de níveis de ácido glutâmico (Glu) e vitamina D₃ (VD).

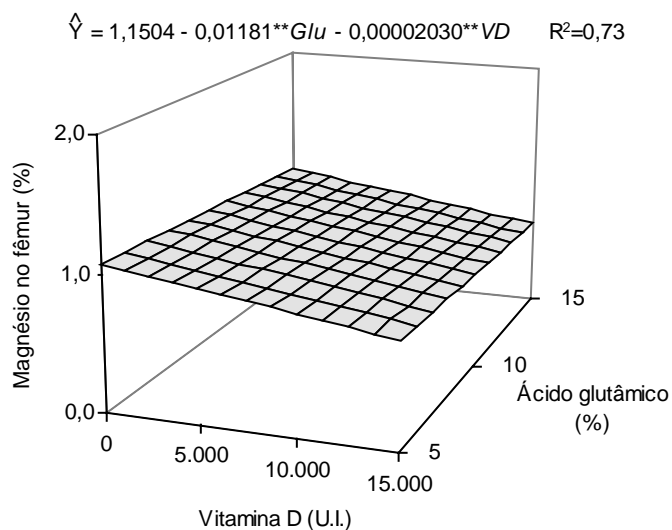
PERINI (1993) observou que as aves que receberam dieta suplementada com 12,5% de L-Glu apresentaram maiores concentrações de magnésio nas cinzas dos fêmures que as aves que receberam dieta contendo baixos níveis de L-Glu (5,0%).

A menor concentração de magnésio (0,97%) no tibiotarso foi obtida com 5% de L-Glu e 10.000 UI de VD.



** Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste t.

Figura 14 - Estimativa da relação Ca:P no tibiotarso em função de níveis de ácido glutâmico (Glu) e vitamina D₃ (VD).

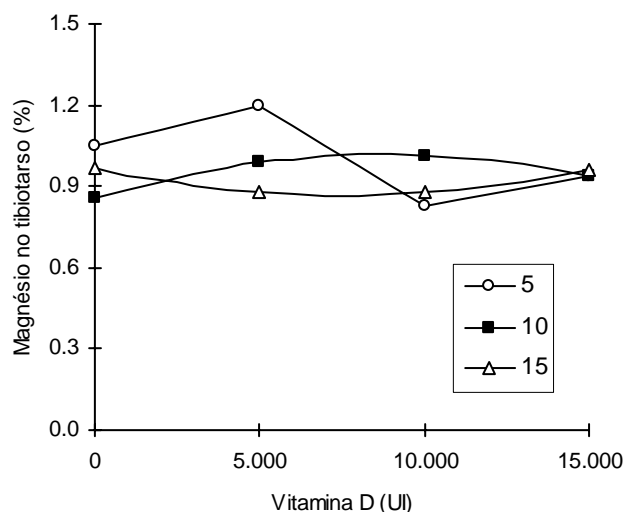


** Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste t.

Figura 15 - Estimativa da concentração de magnésio no fêmur em função de níveis de ácido glutâmico (Glu) e vitamina D₃ (VD).

Pouco se sabe sobre a composição química total ou mesmo parcial de ossos das pernas de animais deficientes em nitrogênio não específico. Além disso, as pequenas variações nas concentrações de macrominerais ósseos tem permitido sugerir que as deformações nas pernas estejam associadas a alterações na matriz orgânica dos ossos.

Não foi observado relação direta entre as concentrações de minerais e incidência de problemas de pernas, uma vez que as concentrações médias de cálcio, fósforo e magnésio se encontraram numa faixa fisiológica normal.



$$10\%: \hat{Y} = 0,8546 + 0,00003368 **VD - 0,000000002075 **VD^2 \quad R^2 = 0,86$$

$$15\%: \hat{Y} = 0,9648 - 0,00002580 **VD + 0,000000001700 **VD^2 \quad R^2 = 0,62$$

** Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste t.

Figura 16 - Estimativa da concentração de magnésio no tibiotalarso em função de níveis de ácido glutâmico e vitamina D (VD).

4. RESUMO E CONCLUSÕES

O objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos de três níveis de ácido L-glutâmico (L-Glu) em esquema fatorial, combinados com quatro níveis de vitamina D₃ (VD) nos parâmetros físicos (comprimento, diâmetro e resistência), cinzas e minerais dos ossos de pintos de corte, machos, Hubbard, aos 14 dias de idade. As aves foram alojadas em baterias aquecidas com piso de tela elevado, recebendo água e ração *ad libitum*.

Aos 14 dias de idade, as aves foram sacrificadas por deslocamento cervical, e, então, retiradas as pernas. Os ossos tibiotarsos e fêmures foram limpos de todo tecido aderente, medidos seus comprimentos e diâmetros com o uso de paquímetro e avaliada a resistência à quebra. Esses ossos foram utilizados na determinação dos teores de cinzas e minerais cálcio, fósforo, magnésio e relação Ca:P nas cinzas.

O comprimento máximo estimado para o fêmur foi de 37,61 mm, com 9,51% de L-Glu e 15.000 UI de VD; e de 50,36 mm para o tibiotarso, com 9,99% de L-Glu e 15.000 UI de VD. O diâmetro máximo do fêmur (3,57 mm) foi obtido com 10,49% de L-Glu e 10.000 UI de vitamina D₃, e 3,17 mm com 11,04% de L-Glu e 15.000 UI de VD para o tibiotarso. A resistência máxima (52,47 kgf/cm²) estimada para o fêmur foi determinada com 7,57% de L-Glu e 8.978UI de VD. Para o tibiotarso, a resistência máxima (43,35 kgf/cm²) foi obtida com 6,24% de L-Glu e 12.591 UI de VD.

A maior porcentagem de cinza óssea do fêmur (44,37%) foi obtida com 15% de L-Glu de 8.502 UI de VD, e 40,73% com 15% de L-Glu combinado com 15.000 UI de VD para o tibiotarso.

Não foi observada diferença significativa entre os tratamentos para as concentrações de cálcio nos tibiotarsos, que foi constante e equivalente a 37,01%. Houve redução nas concentrações de cálcio (33,2%) nas cinzas do fêmur com a suplementação de níveis de L-Glu até 9.694 UI de VD.

Não houve efeito de tratamento nas concentrações de fósforo no tibiotarso, que se manteve constante e igual a 20,55%.

Não foi observado efeito de tratamento na relação Ca:P do tibiotarso, que foi constante e igual a 1,80. No fêmur, houve efeito de tratamento na relação Ca:P, sendo que a melhor relação (1,95) foi obtida com 5% de L-Glu e 15.000 UI de VD.

No fêmur, houve decréscimo até (0,67%) nos níveis de magnésio com a suplementação de L-Glu e de VD. No tibiotarso, a maior concentração de magnésio foi encontrada com 5% de L-Glu e 5.000 UI de VD.

A maior porcentagem de aves com problemas de pernas (69,35%) apresentaram os menores teores de cinza óssea no fêmur e tibiotarso, mas não foi observada nenhuma relação entre as concentrações de minerais nas cinzas dos ossos e a incidência de problemas de pernas.

Altos níveis de VD (15.000 UI) foram necessários para maximizar a relação Ca:P (1,95) no fêmur.

Levando-se em consideração os parâmetros avaliados, principalmente resistência à quebra, devido sua importância no processamento das aves, recomenda-se 10% de L-Glu como fonte de nitrogênio não específico e 15.000 UI de VD para atender aos diversos parâmetros avaliados para pintos de corte de 1 a 14 dias de idade.

CAPÍTULO 3

EFEITOS DO ÁCIDO L-GLUTÂMICO E DA VITAMINA D₃ NOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DOS OSSOS E SORO SANGÜÍNEO DE PINTOS DE CORTE

1. INTRODUÇÃO

Alguns trabalhos têm mostrado que o nível de nitrogênio não específico da dieta influencia o aparecimento das anomalias nas pernas (GUIMARÃES et al., 1993 a, b e 1996; RIBEIRO et al., 1995a e c, SILVA e MORAES, 1995).

Das fontes e níveis estudados, o ácido L-glutâmico (L-Glu) a 12,5% (SUGAHARA e ARIYOSHI, 1967; MARUYAMA et al., 1976; FEATHERSTON, 1976; MORAES et al., 1984; MORAES et al., 1987; ROGLER et al., 1988) ou quantidades isonitrógenas de ácido L-aspártico e L-alanina (RIBEIRO *et al.*, 1995c) reduziram significativamente a incidência dos problemas de pernas.

Níveis de L-Glu inferiores a 10% para aves criadas no chão (GUIMARÃES et al., 1993a) e 12,5% para aves criadas em baterias aquecidas (GUIMARÃES et al., 1993b) resultaram em baixos ganhos de peso, elevada incidência de problemas de pernas e, conseqüentemente, alta taxa de mortalidade. Essas observações sugerem que os problemas de pernas podem estar associados as características genéticas dos animais que apresentam um crescimento e acúmulo de tecido muscular muito rápidos e, provavelmente, o esqueleto ósseo não acompanha o mesmo desenvolvimento.

Outros estudos foram conduzidos enfocando diferentes níveis das vitaminas D (PERINI, 1993) e K (RODRIGUES e MORAES, 1995; RODRIGUES et al., 1996) e da relação cálcio e fósforo da dieta (EDWARDS e VELTMAN, 1983; CORNÉLIO, 1995). Embora a vitamina K seja essencial para a síntese de algumas proteínas não colagenosas dos ossos (OLSON, 1984; PRICE, 1985; HAUSCHKA, 1986; VERMEER et al., 1995), não foi verificado nenhum efeito benéfico de níveis elevados ou agravamento devido a níveis reduzidos nos problemas de pernas. A vitamina D fornecida nas rações como colecalciferol somente foi benéfica em níveis bem superiores (25.000 UI) ao normalmente utilizado (2.250UI.), reduzindo as deformações (PERINI, 1993). Todavia, o nível adequado deve ser, ainda, pesquisado.

Em todos os trabalhos verificou-se que os animais com alta incidência de problemas de pernas apresentaram significativamente altos teores de proteínas não colagenosas ou extraíveis com EDTA (HAUSCHKA, 1985). Na fração proteínas não colagenosas estão pelo menos três proteínas que contêm três resíduos do aminoácido γ -carboxi-glutâmico (Gla) as quais foram denominadas Gla-proteínas (HAUSCHKA et al., 1975; HAUSCHKA e GALLOP, 1977). Estes aminoácidos apresentam uma forte capacidade de complexar íons Ca^{++} , mas, ainda não são conhecidas as funções das proteínas no desenvolvimento do tecido ósseo (HAUSCHKA et al., 1975; LIAN et al., 1979; GUIMARÃES et al., 1996).

VETTER et al. (1991) observaram que as mudanças nas concentrações de proteínas não colagenosas podem contribuir para a fragilidade do osso por interferência com a completa mineralização e/ou arquitetura normal.

Raquitismo experimental em aves é caracterizado pelo retardo no crescimento corporal, hipocalcemia, hipofosfatemia, atividade elevada de fosfatase alcalina no soro, hiperplasia da paratireóide e severa distorção óssea (HEDSTROM et al., 1986).

Os osteoblastos secretam grande quantidade de fosfatase alcalina quando estão depositando ativamente a matriz óssea. Acredita-se que essa enzima aumenta a concentração local de fosfato inorgânico ou ative as fibras de colágeno, de modo a causar a deposição de sais de cálcio. Devido a difusão de certa quantidade de fosfatase alcalina no sangue, o nível dessa enzima

constitui, em geral, um bom indicador da velocidade de formação óssea (PARTHEMORE et al., 1993; CHRISTENSON, 1997).

O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos de níveis de L-glutâmico (L-Glu) e vitamina D₃ nos parâmetros bioquímicos dos ossos e soro sanguíneo de pintos de corte.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Procedimentos gerais

O experimento foi montado segundo um esquema fatorial, em um delineamento inteiramente casualizado 3 x 4 (3 níveis de ácido glutâmico x 4 níveis de vitamina D₃), no Setor de Avicultura do Departamento de Zootecnia, na Universidade Federal de Viçosa.

Foram utilizados 336 pintos de um dia, machos, Hubbard, de peso médio 40 gramas distribuídos aleatoriamente nos tratamentos. Os tratamentos consistiram de uma dieta básica purificada (GUIMARÃES, 1988) (Quadro 1), contendo todos os aminoácidos essenciais (Quadro 2), vitaminas (Quadro 3) (exceto vitamina D₃) minerais (Quadro 4) , suplementada com três níveis de ácido L-glutâmico (5, 10 e 15%) combinados com quatro níveis de vitamina D₃ (0, 5.000, 10.000, 15.000 UI/kg). Cada tratamento consistiu de quatro repetições de sete aves cada. As aves foram alojadas em baterias aquecidas com pisos de tela elevados e receberam água e dieta *ad libitum* durante todo o período experimental de 14 dias.

Ao término do período experimental, 16 aves de cada tratamento foram sacrificadas por deslocamento cervical e os ossos (tibiotalarsos e fêmures) de ambas as pernas removidos, limpos de todo tecido aderente e medidos seus comprimentos, com o uso de paquímetro, sendo então pesados.

Quadro 1 – Dieta básica purificada

Ingredientes	Quantidade (%)
Aminoácidos não essenciais ^{1/}	Variável
Aminoácidos essenciais ^{2/}	8,94
Mistura vitamínica ^{3/}	4,48
Mistura mineral ^{4/}	9,10
Óleo de soja	15,00
Bicarbonato de sódio	1,00
Amido	qsp 100,00

1/ Ácido L-glutâmico: 5%, 10% e 15%.

2/ veja Quadro 2.

3/ veja Quadro 3.

4/ veja Quadro 4.

Quadro 2 – Aminoácidos essenciais^{1/}

Aminoácidos	Quantidade (%)
L - Arginina. HCl	1,15
L – Histidina. HCl. H ₂ O	0,41
L – Lisina. HCl	1,14
L – Tirosina	0,45
L – Fenilalanina	0,50
L – Triptofano	0,15
L – Metionina	0,35
L – Cisteína	0,45
L – Treonina	0,65
L – Leucina	1,00
L – Isoleucina	0,60
L – Valina	0,69
L – Prolina	0,40
Glicina	1,00

1/ SASSE e BAKER (1973).

Quadro 3 – Mistura Vitamínica^{1/}

Ingredientes	Quantidade/kg de dieta
Cloreto de Colina 60 %	3,3 g
Retinil Palmitato	5.000 UI
Colecalciferol ^{2/}	Variável
D - α - tocoferil acetato	22 UI
Menadiona sódio bissulfito	2,0 mg
Inositol	1,0 g
Riboflavina	9,0 mg
Tiamina. HCl	6,0 mg
Pantotenato de cálcio	20,0 mg
Niacina	50,0 mg
Piridoxina	8,0 mg
Ácido fólico	2,0 mg
Biotina	0,3 mg
B ₁₂ (0,1%)	20,0 mg
BHT	0,125 mg
Excipiente	30,0 g

1/ FEATHERSTON e ROGLER (1978).

2/ 0, 5.000, 10.000 e 15.000 UI/kg.

Fonte: ROCHE.

Quadro 4 – Mistura Mineral^{1/}

Ingredientes	Quantidade/kg de dieta
CaCO ₃	18,6526 g
CaHPO ₄ . 2H ₂ O	30,5300 g
K ₂ HPO ₄	11,2000 g
NaCl	6,0000 g
FeSO ₄	0,2000 g
ZnO	0,1225 g
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,0150 g
MnSO ₄ . H ₂ O	0,5100 g
KI	0,0400 g
MgCO ₃	2,5000 g
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	1,0000 g
Na ₂ SeO ₃	0,2200 mg
Excipiente (casca de arroz)	30,0000 g

1/ FEATHERSTON e ROGLER (1978).

2.2. Análise bioquímica nos ossos

Os ossos foram desengordurados com éter de petróleo por 10 horas e pesados. Após o desengorduramento, 10 ossos de cada tratamento foram submetidos a extração das proteínas não colagenosas (PNC) com EDTA (Ácido etilenodiamina tetracético). As concentrações das PNC foram determinados de acordo com BRADFORD (1976), utilizando albumina sérica bovina como padrão. Os ossos, após desmineralizados, foram lavados com água destilada e deionizada para eliminar o EDTA e usados para estimar as concentrações de proteínas colagenosas (PC). As concentrações de PC foram obtidas multiplicando-se o teor de nitrogênio pelo fator 6,25. As concentrações de proteínas totais (PT) foram obtidas pela soma dos teores de PNC e PC encontrados anteriormente.

2.3. Obtenção do sangue e fígado

A coleta de sangue foi feita por punção cardíaca de 6 animais de cada tratamento e o soro obtido utilizado para as determinações dos teores de cálcio, cálcio iônico, fósforo, fosfatase alcalina, proteína total, albumina, globulina.

Os soros foram devidamente diluídos com água deionizada para a determinação das concentrações de cálcio total, cálcio iônico, fosfato inorgânico e atividade de fosfatase alcalina através de procedimentos colorimétricos usando kits “In Vitro Diagnostica”.

Os fígados de 6 animais, por tratamento, foram removidos e imediatamente congelados em nitrogênio líquido. Após devidamente identificados, foram acondicionados em freezer e utilizados para a determinação de proteína total pelo Método do Biureto.

2.4. Análise estatística:

A análise estatística dos dados obtidos foi feita por regressão. A escolha do melhor modelo baseou-se no coeficiente de determinação (R^2), na significância dos coeficientes de regressão pelo teste “t” de Student e na coerência com o fenômeno biológico.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Proteínas colagenosas (PC), proteínas não colagenosas (PNC) e proteínas totais (PT) de tibiotarsos e fêmures

O Quadro 5 apresenta as concentrações médias de proteínas colagenosas (PC), proteínas não colagenosas (PNC) e proteínas totais (PT) do fêmur e tibiotarso de pintos de corte. O resumo da análise de variância encontra-se no Quadro 6.

Na Figura 1, não observou-se efeito significativo de tratamento ($P > 0,05$) nas concentrações de PC no fêmur, que foi constante e igual a 23,44 mg/100g, corroborando o verificado por RIBEIRO et al. (1995b), os quais observaram que o aumento do nível de L-Glu ou de L-Ala das dietas não promoveu diferença nas concentrações de proteínas colagenosas nos fêmures dos pintinhos, e GUIMARÃES et al. (1996), que observaram que as concentrações de proteínas colagenosas em ambos ossos não foram afetados significativamente pelas dietas experimentais, quando se variou os níveis de L-Glu.

A maior concentração estimada de PC no tibiotarso, 26,42 mg/100g, foi obtida com 15% de L-Glu (Quadro 7, Figura 2). A menor concentração de PC (22,19 mg/100g) foi obtida com 5% de L-Glu e 15.000 UI de VD.

Quadro 5 – Concentrações médias de proteínas colagenosas (PC), proteínas não-colagenosas (PNC) e proteínas totais (PT) no fêmur e tibiotarso

Característica	Vitamina D ₃ (UI)	Ácido L-glutâmico (%)			Média
		5	10	15	
Proteína colagenosa no fêmur (mg/100 g)	0	22,04	23,52	25,12	23,56
	5.000	25,29	23,14	24,53	24,32
	10.000	21,56	23,21	25,60	23,46
	15.000	22,29	22,91	21,99	22,40
	Média		22,80	23,20	24,31
Proteína colagenosa no tibiotarso (mg/100 g)	0	25,86	24,00	26,05	25,30
	5.000	26,78	23,17	25,41	25,12
	10.000	22,76	22,51	22,46	22,58
	15.000	22,21	25,51	22,39	23,37
	Média		24,40	23,80	24,08
Proteína não-colagenosa no fêmur (mg/100 g)	0	3,38	2,72	4,37	3,49
	5.000	3,51	2,78	3,71	3,33
	10.000	3,72	2,65	4,44	3,60
	15.000	3,92	2,35	4,99	3,75
	Média		3,63	2,63	4,38
Proteína não-colagenosa no tibiotarso (mg/100 g)	0	3,17	1,50	3,46	2,71
	5.000	3,26	2,42	3,71	3,13
	10.000	3,28	2,52	3,76	3,19
	15.000	3,97	2,68	3,84	3,50
	Média		3,42	2,28	3,69
Proteína total no fêmur (mg/100g)	0	25,42	26,24	29,49	27,05
	5.000	28,81	25,92	28,23	27,65
	10.000	25,27	25,86	30,04	27,06
	15.000	26,21	25,26	26,97	26,15
	Média		26,43	25,82	28,68
Proteína total no tibiotarso (mg/100 g)	0	29,03	25,50	29,51	28,01
	5.000	30,03	25,59	29,12	28,25
	10.000	26,04	25,03	26,22	25,76
	15.000	26,18	28,20	26,23	26,87
	Média		27,82	26,08	27,77

Quadro 6 – Significância da estatística F de diferentes fontes de variação e coeficiente de variação experimental para concentrações de proteínas colagenosas (PC), proteínas não colagenosas (PNC) e proteínas totais (PT) de fêmures e tibiotarsos

Fonte de variação	Fêmur			Tibiotarso		
	PC	PNC	PT	PC	PNC	PT
L-Glu	ns	**	**	ns	**	**
Vitamina D ₃	ns	*	ns	**	**	**
L-Glu x vitamina D ₃	ns	**	ns	**	*	**
C.V.	8,92	9,08	6,97	5,74	10,17	4,56

** Significativo pelo teste F (P < 0,01).

* Significativo pelo teste F (P < 0,05).

ns não significativo.

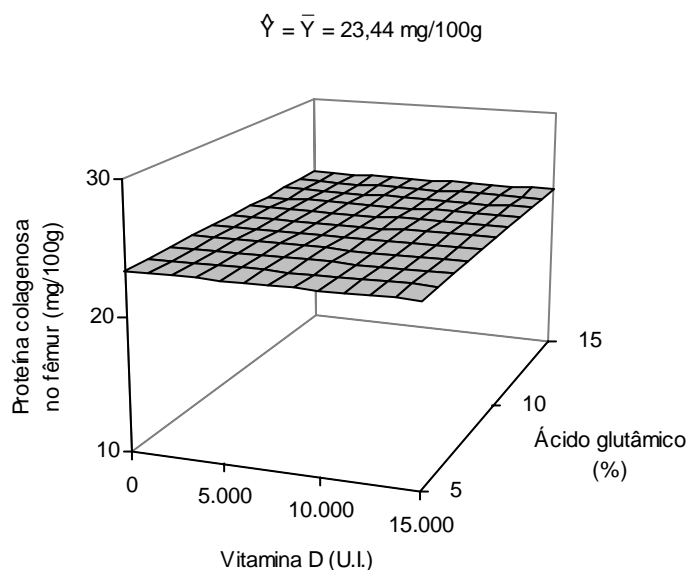


Figura 1 - Estimativa das concentrações de proteínas colagenosas no fêmur em função de níveis de ácido glutâmico (Glu) e vitamina D₃ (VD).

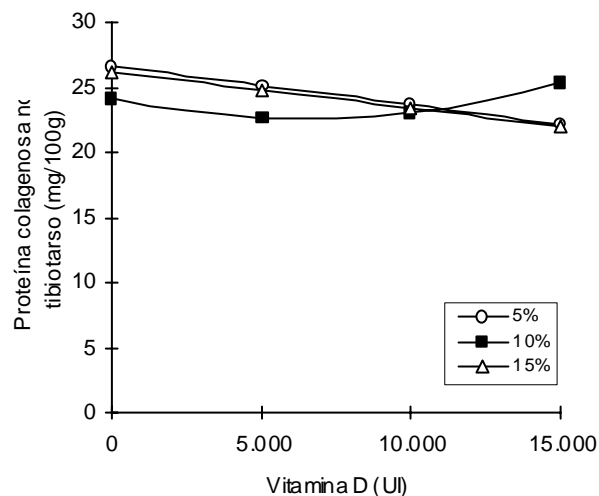
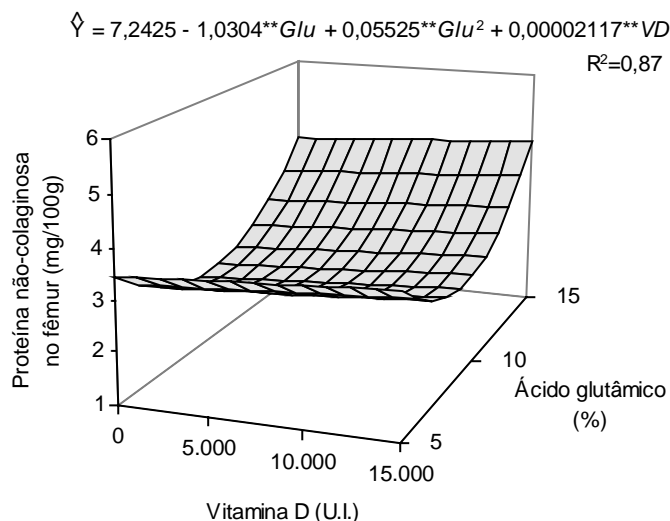


Figura 2 - Estimativa das concentrações de proteínas colagenosas no tibiotalarso em função de níveis de vitamina D₃ (VD), em diferentes percentuais de ácido glutâmico.

Houve efeito significativo de tratamento ($P < 0,01$) nas concentrações de proteínas não colagenosas (PNC) no fêmur.

As mais baixas concentrações de PNC nos fêmures, 2,54 mg/100g foram obtidas com 9,32% de L-Glu (Quadro 7, Figura 3). Com a suplementação de 5% (3,79 mg/100g) e 15% (4,53 mg/100g) de L-Glu foram observados as mais altas concentrações de PNC, coincidentes com o pior desempenho (Quadro 5, Capítulo 1), aumento na incidência de problemas de pernas (Quadro 6, Capítulo 1), e redução na resistência óssea com 15% de L-Glu (Quadro 5, Capítulo 2).

Esses resultados são confirmados por RIBEIRO et al. (1995a) e GUIMARÃES et al. (1996), os quais verificaram que as anomalias de pernas causadas pela deficiência de nitrogênio não específico podem estar associadas às altas concentrações de PNC dos ossos das pernas de pintos de corte.



** Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste t.

Figura 3 - Estimativa das concentrações de proteínas não-colagenosas no fêmur em função de níveis de ácido glutâmico (Glu) e vitamina D₃ (VD).

Nos tibiotarsos, as menores concentrações de PNC (2,15 mg/100g) foram obtidas com nível estimado de 9,73% de L-Glu (Quadro 7), coincidentes com o melhor desempenho (Quadro 5, Capítulo 1) redução dos problemas de pernas (Quadro 6, Capítulo 1), melhoria na resistência óssea (Quadro 5, Capítulo 2) e redução na espessura e melhoria na organização do disco epifisário de crescimento do tibiotarso (Quadro.5, Capítulo 4)

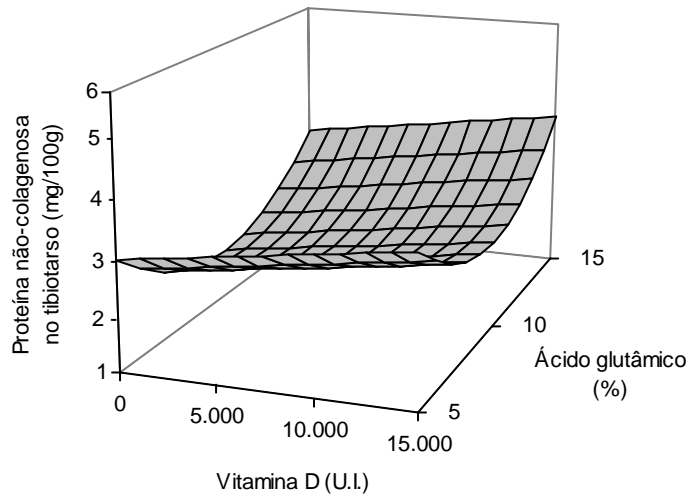
Quanto aos níveis de VD, as menores concentrações estimadas de PNC foram observadas na deficiência de VD, mas que representa piora no desempenho e aumento na incidência de problemas de pernas.

Na Figura 5, verificou-se maior concentração média (28,68 mg/100g) de PT no fêmur em função de níveis de L-Glu, obtida com 15% de L-Glu.

Na Figura 6, verificou-se maior concentração de PT (30,03 mg/100g) foi obtida com 5% de L-Glu e 5.000 UI de VD.

$$\hat{Y} = 6,7408 - 0,9923^{**}Glu + 0,05099^{**}Glu^2 + 0,00004840^{**}VD$$

R²=0,92



** Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste t.

Figura 4 - Estimativa das concentrações de proteínas não-colagenosas no tibiotarso em função de níveis de ácido glutâmico (Glu) e vitamina D₃ (VD).

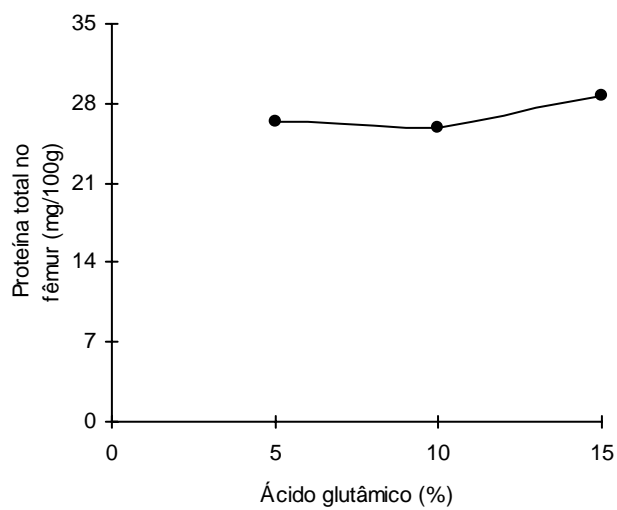
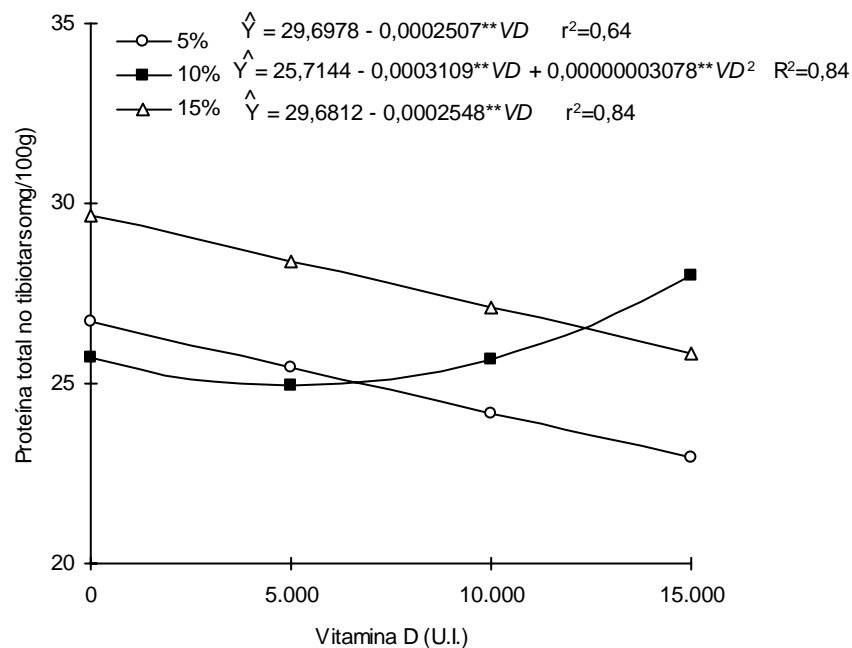


Figura 5 - Concentrações médias de proteínas totais no fêmur, em função de níveis de ácido glutâmico.

Quadro 7 – Estimativa de níveis de ácido L-glutâmico (L-Glu) e vitamina D₃ (VD) para pintos de corte, considerando as concentrações de proteínas colagenosas, não colagenosas e totais de fêmures e tibiotarsos

Característica	Equação ajustada	R ²	Resposta máxima	Resposta mínima	Estimativa	
					L-Glu (%)	Vitamina D ₃ (UI)
Proteína colagenosa no fêmur (mg/100g)	Y = Y = 23,44	-	23,44	23,44	-	-
Proteína não colagenosa no fêmur (mg/100g)	Y = 7,2425 – 1,0304**Glu + 0,05525**Glu ² + 0,00002117**VD	0,87	-	2,54	9,32	0
Proteína total no fêmur (mg/100g)	Y = pontos experimentais	-	30,04	-	15	10.000
Proteína colagenosa no tibiotarso (mg/100g)	Y = 24,3124 + 0,07499**VD ^{0,5} – 0,0007537**VD	0,65	-	22,19	5	0
	Y = 24,1702 – 0,0004967**VD + 0,00000003830**VD ²	0,88	25,34	-	10	0
	Y = 26,4258 – 0,0005251**VD + 0,00000001940**VD ²	0,73	26,42	-	15	0
Proteína não colagenosa no tibiotarso (mg/100g)	Y = 6,7408 – 0,9923**Glu + 0,5099**Glu ² + 0,00004840**VD	0,92	-	2,15	9,73	0
Proteína total no tibiotarso (mg/100g)	Y = médias experimentais em função de L-Glu e VD	-	30,03	-	5	5.000
	Y = 25,7144 – 0,0003109**VD + 0,00000003078**VD ²	0,84	-	24,93	10	5.000
	Y = 29,8980 – 0,0004767**VD + 0,00000001755*VD ²	0,68	-	26,74	15	0

** e * Significativo ao nível de 1% e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste t.



** e * Significativos a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste t.

Figura 6 - Estimativa da concentração de proteína total no tibiotarso em função de níveis de vitamina D₃ (VD).

3.2. Cálcio total, cálcio iônico, fósforo e fosfatase alcalina no soro sanguíneo

As concentrações médias de cálcio total, cálcio iônico, fósforo e fosfatase alcalina no soro sanguíneo encontram-se no Quadro 8. O resumo da análise de variância encontra-se no Quadro 9.

A figura 7 apresentou aumentos lineares com a suplementação de L-Glu nas concentrações de cálcio até o valor máximo estimado de 9,61 mg/dL (Quadro 10), obtido com 15% de L-Glu e 14.181 UI de VD.

Na deficiência de VD, observou-se decréscimo nas concentrações de cálcio sanguíneo total, o que leva a concluir o postulado por HURWITZ (1989),

que os sistemas de controle das aves são incapazes de manter a concentração normal de cálcio plasmático na ausência de VD, que resulta no declínio do cálcio plasmático de 10 para aproximadamente 5 mg/100mL.

Foram necessários altos níveis de VD para manter as concentrações de cálcio total no soro no limite fisiológico normal, através da intensificação da eficiência de absorção intestinal de cálcio para manter as funções celulares essenciais e promover a mineralização do esqueleto, e através da mobilização dos estoques de cálcio no osso.

Quadro 8 – Concentrações médias de cálcio total, cálcio iônico, fósforo e, fosfatase alcalina no soro sanguíneo de pintos de corte aos 14 dias de idade

Característica	Vitamina D ₃ (UI)	Ácido L-glutâmico (%)			Média
		5	10	15	
Cálcio total no soro (mg/dL)	0	5,28	5,47	5,90	5,55
	5.000	8,39	7,46	8,99	8,28
	10.000	6,72	8,73	9,13	8,19
	15.000	9,02	9,08	9,69	9,26
	Média		7,35	7,69	8,43
Cálcio iônico no soro (mg/dL)	0	4,28	4,38	4,56	4,41
	5.000	6,71	5,98	6,58	6,42
	10.000	5,30	6,58	6,96	6,28
	15.000	7,43	6,92	7,44	7,26
	Média		5,93	5,97	6,39
Fósforo no soro (mg/dL)	0	3,19	4,37	6,35	4,64
	5.000	5,18	5,39	5,06	5,21
	10.000	5,85	8,08	5,27	6,40
	15.000	3,74	6,45	6,13	5,44
	Média		4,49	6,07	5,70
Fosfatase alcalina no soro (UI/L)	0	235,3	262,1	259,4	252,3
	5.000	139,1	182,5	216,0	179,2
	10.000	167,4	207,4	242,5	205,7
	15.000	140,5	232,5	138,9	170,6
	Média		170,6	221,2	214,2

Quadro 9 – Significância da estatística F de diferentes fontes de variação e coeficiente de variação experimental para concentrações de cálcio total, cálcio iônico e fósforo no soro sanguíneo

Fonte de variação	Cálcio total	Cálcio iônico	Fósforo
L-Glu	**	ns	**
Vitamina D ₃	**	**	**
L-Glu x vitamina D ₃	*	*	**
C.V.(%)	7,84	7,92	6,87

** Significativo pelo teste F (P < 0,01).

* Significativo pelo teste F (P < 0,05).

ns não significativo.

Na Figura 8, observou-se concentração máxima de fósforo no soro (7,20 mg/dL) com 10% de L-Glu e 10.863 UI de VD. O fósforo é um íon abundante em todos os sistemas biológicos, cuja concentração plasmática está mais sujeito a flutuações que o cálcio. Geralmente, a concentração de fósforo é metade da concentração de cálcio, cerca de 5 mg/dL. As mais baixas concentrações de fósforo no soro foram obtidas com 5% (3,12 mg/dL) e 15% (4,07 mg/dl) e na deficiência de VD.

Corroborando com os resultados encontrados, PERRY et al. (1991), SINGH e GREWAL (1994) e GOFF e HORST (1995), verificaram decréscimo no cálcio, fósforo plasmático e aumento na atividade de fosfatase alcalina quando as aves foram alimentadas com uma dieta deficiente em vitamina D por 14 dias de idade.

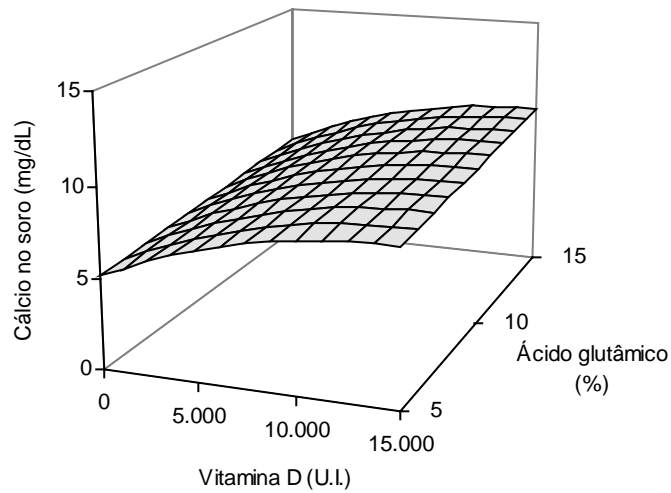
Os resultados sugerem que, aumentando o nível de vitamina D até uma taxa limite suportável pelo rim para transformá-la em metabólito ativo, aumenta a absorção intestinal de cálcio e fósforo, com conseqüente aumento no soro sanguíneo.

Quadro 10 – Estimativa de níveis de ácido L-glutâmico (L-Glu) e vitamina D₃ (VD) para pintos de corte, considerando as concentrações de cálcio total, fósforo e fosfatase alcalina no soro sanguíneo de pintos de corte

Característica	Equação ajustada	R ²	Resposta máxima	Estimativa	
				L-Glu (%)	Vitamina D ₃ (UI)
Cálcio total no soro (mg/dL)	$Y = 4,6765 + 0,1075^{**}\text{Glu} + 0,0004691^{**}\text{VD} - 0,00000001654^{**}\text{VD}^2$	0,82	9,61	15	14.181
Cálcio iônico no soro (mg/dL)	$Y = 4,1165 + 0,104558^{*}\text{Glu} + 0,0003233^{**}\text{VD} - 0,00000001032^{**}\text{VD}^2$	0,79	7,33	15	15.664
Fósforo no soro (mg/dL)	$Y = 4,0737 + 0,0005764^{**}\text{VD} - 0,00000002653^{**}\text{VD}^2$	0,76	7,20	10	10.863
Fosfatase alcalina no soro (UI/L)	Atividades enzimáticas médias	-	262,14	10	0

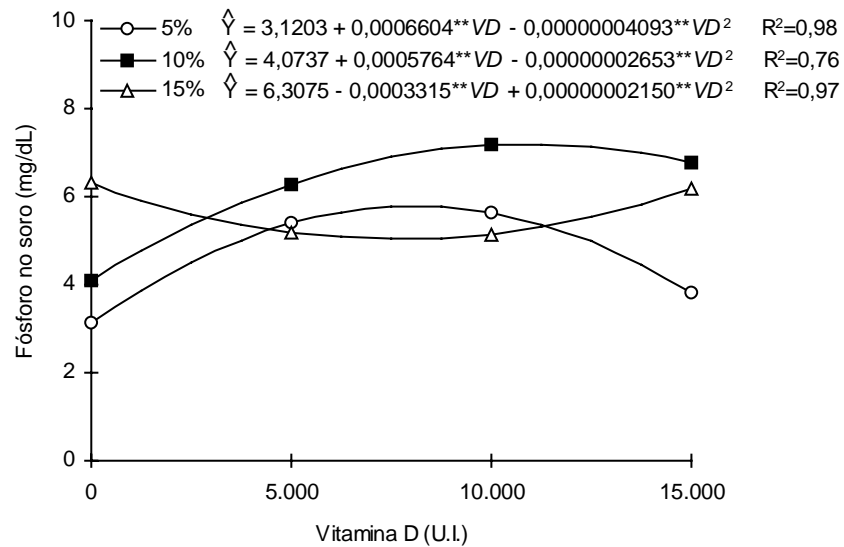
** e * Significativo ao nível de 1% e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste t.

$$\hat{Y} = 4,6765 + 0,1075^{**}Glu + 0,0004691^{**}VD - 0,00000001654^{**}VD^2 \quad R^2=0,82$$



** Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste t.

Figura 7 - Estimativa das concentrações de cálcio no soro, em função de níveis de ácido glutâmico (Glu) e vitamina D₃ (VD).



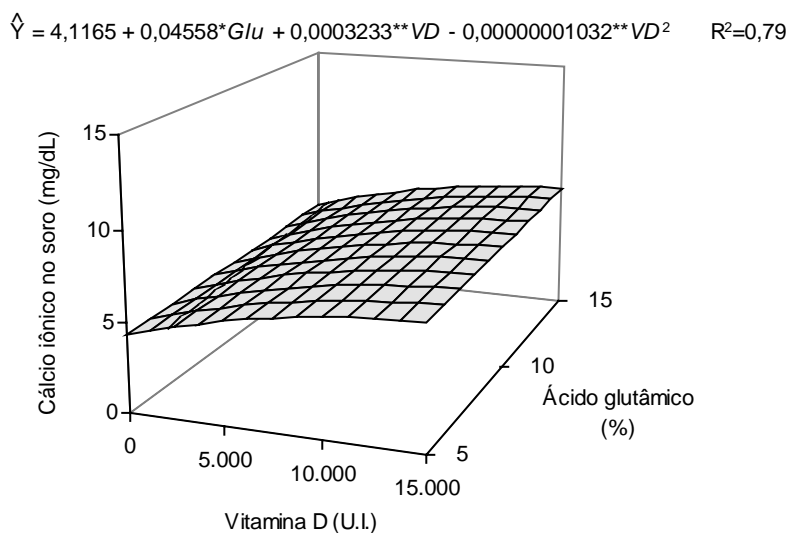
** Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste t.

Figura 8 - Estimativa das concentrações de fósforo no soro, em função de níveis de ácido glutâmico (Glu) e vitamina D₃ (VD).

Ao contrário do encontrado, ZHOUWEN e TAT (1993) não observaram diferença significativa nas concentrações de cálcio, fósforo e fosfatase alcalina no soro sangüíneo das aves que apresentaram problemas de pernas.

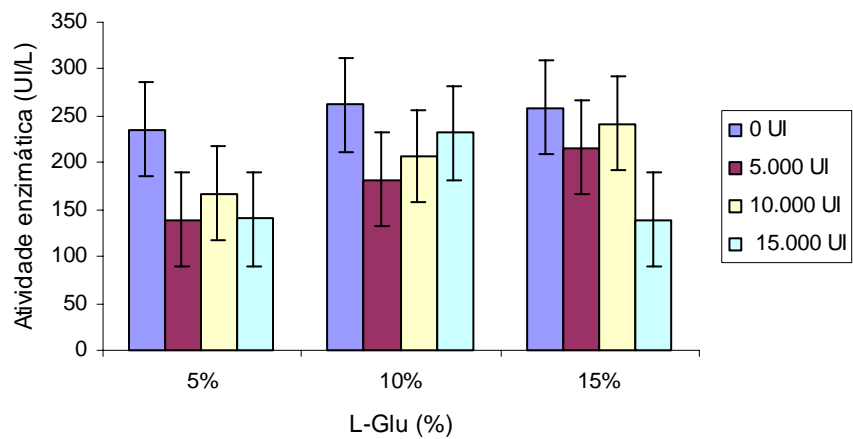
As aves que apresentaram maior incidência de problemas de pernas (Quadro 6, Capítulo 1), apresentaram as menores concentrações de cálcio, cálcio iônico, fósforo e fosfatase alcalina (Figura 10) no soro sangüíneo, o que corrobora XU e SOARES (1998) que observaram que aves que receberam ração deficiente em vitamina D por um período de três semanas exibiram pior desempenho, hipocalcemia, e raquitismo.

O valor máximo estimado de cálcio iônico (7,33 mg/dL) (Quadro 10) foi obtido com 15% de L-Glu e 15.664 UI de VD, o que corrobora o obtido por WATKINS e SOUTHERN (1991), ROBERSON et al. (1993), os quais observaram aumento significativo no cálcio iônico no soro das aves que receberam maior suplementação de vitamina D₃.

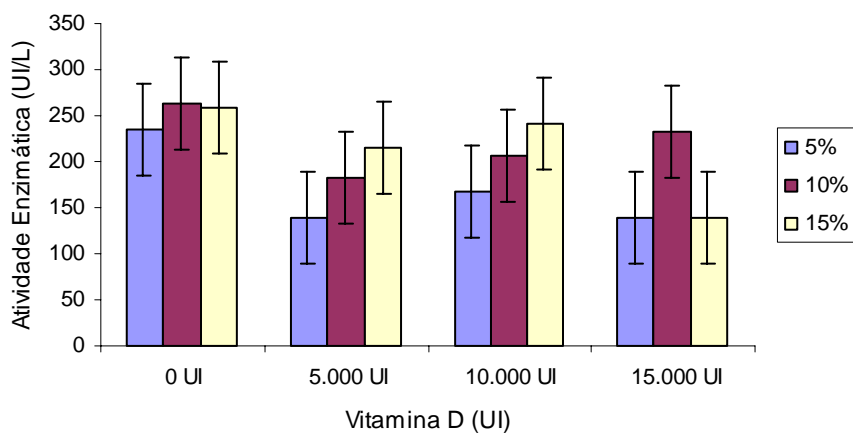


** e * Significativos a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste t.

Figura 9- Estimativa das concentrações de cálcio iônico no soro, em função de níveis de ácido glutâmico (Glu) e vitamina D₃ (VD).



(a)



(b)

Figura 10 – Atividade enzimática de fosfatase alcalina no soro, em função de níveis de ácido L-Glutâmico (L-Glu) (a) e vitamina D (b).

3.3. Proteína total, albumina e globulina no soro sangüíneo, e proteína total no fígado

O Quadro 11 apresenta as concentrações médias de proteínas totais, albumina e globulina no soro sangüíneo e proteína total no fígado de pintos de corte. O resumo da análise de variância encontra-se no Quadro 12.

Quadro 11 – Concentrações médias de proteínas totais, albumina, globulina no soro de pintos de corte de 1 a 14 dias de idade

Característica	Vitamina D ₃ (UI)	Ácido L-glutâmico (%)			Média
		5	10	15	
Proteína total no soro (g%)	0	2,35	2,26	2,90	2,50
	5.000	2,50	2,38	3,35	2,74
	10.000	2,95	3,47	3,69	3,37
	15.000	2,06	2,90	3,12	2,69
	Média		2,47	2,75	3,27
Albumina no soro (g%)	0	0,86	0,97	1,09	0,97
	5.000	0,95	0,93	1,46	1,11
	10.000	0,95	1,21	1,08	1,08
	15.000	0,84	1,24	1,14	1,07
	Média		0,90	1,09	1,19
Globulina no soro (g%)	0	1,49	1,30	1,60	1,46
	5.000	1,55	1,45	1,90	1,63
	10.000	2,00	2,26	2,61	2,29
	15.000	1,23	1,66	1,98	1,62
	Média		1,57	1,67	2,02
Proteína total no fígado (mg/g)	0	110,70	105,06	109,39	108,38
	5.000	122,47	108,84	110,08	113,80
	10.000	178,14	120,46	146,84	148,48
	15.000	84,68	102,47	97,58	94,91
	Média		124,00	109,21	115,97

Quadro 12 – Significância da estatística F de diferentes fontes de variação e coeficiente de variação experimental para concentrações de proteínas totais, albumina e globulina no soro sanguíneo e proteína total no fígado de pintos de corte

Fonte de variação	Proteína total no soro	Albumina	Globulina	Proteína total no fígado
L-Glu	**	**	**	*
Vitamina D ₃	**	*	**	**
L-Glu x vitamina D ₃	**	**	ns	**
C.V. (%)	7,75	8,93	11,09	11,84

** Significativo pelo teste F (P < 0,01).

* Significativo pelo teste F (P < 0,05).

ns não significativo.

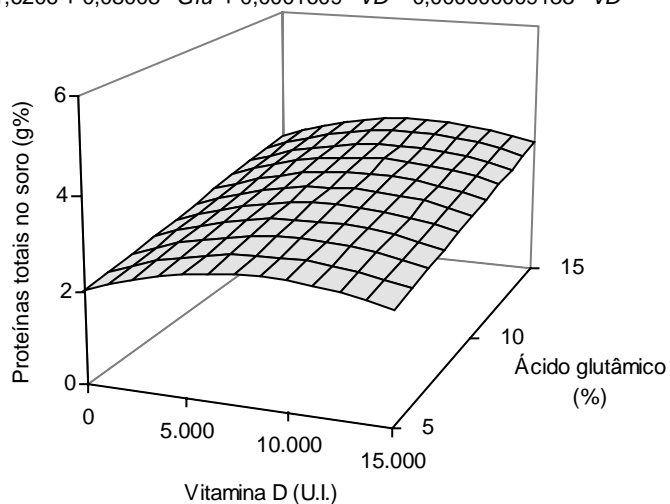
Observou-se aumento nas concentrações de proteínas totais no soro sanguíneo até a concentração máxima estimada de 3,52 g% (Figura 11), obtida com 15% de L-Glu e 8.811 UI de VD.

As concentrações de albumina no soro sanguíneo atingiram o máximo (1,26 g%) com 15% de L-Glu e 9.407UI de VD (Figura 12). Já para as concentrações de globulina no soro atingiram o máximo estimado de 0,95 g%, com 15% de L-Glu e 8.865 UI de VD (Figura 13).

As proteínas sanguíneas são sintetizadas principalmente no fígado, sendo que a taxa de síntese está diretamente relacionada com o estado nutricional do animal, principalmente com os níveis de proteína.

A restrição de ingestão protéica, observados com baixo nível de nitrogênio não específico, diminuiu a concentração sérica de albumina. O rápido turnover das proteínas plasmáticas e a redução das concentrações séricas de albumina indicaram remoção contínua das proteínas plasmáticas da circulação, efetuada, em grande parte, pelo fígado e rim. A albumina sérica penetra presumivelmente na célula por mecanismo de pinocitose, sendo degradada por enzimas proteolíticas intracelulares, com os aminoácidos liberados, tornando-se disponíveis para a síntese de novas moléculas protéicas.

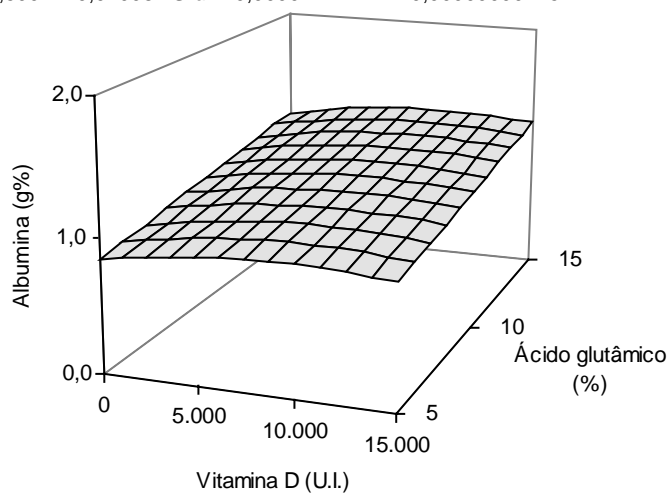
$$\hat{Y} = 1,6206 + 0,08008^{**}Glu + 0,0001609^{**}VD - 0,000000009133^{**}VD^2 \quad R^2=0,71$$



** Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste t.

Figura 11 - Estimativa das concentrações de proteínas totais no soro, em função de níveis de ácido glutâmico (Glu) e vitamina D₃ (VD).

$$\hat{Y} = 0,6904 + 0,02908^{**}Glu + 0,00002747^{*}VD - 0,000000001467^{**}VD^2 \quad R^2=0,55$$



** e * Significativos a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste t.

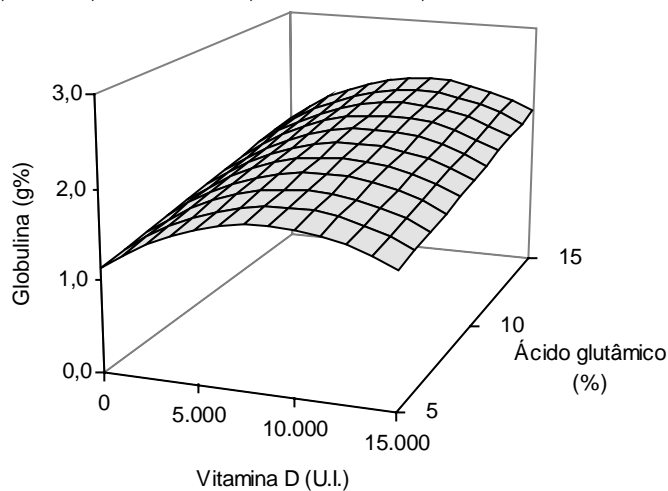
Figura 12 - Estimativa das concentrações de albumina no soro, em função de níveis de ácido glutâmico (Glu) e vitamina D₃ (VD).

Quadro 13 – Estimativa de níveis de ácido L-glutâmico (L-Glu) e vitamina D₃ (VD) para pintos de corte, considerando as concentrações de albumina, globulina, proteína total no soro sanguíneo e proteína total no fígado

Característica	Equação ajustada	R ²	Resposta máxima	Estimativa	
				L-Glu (%)	Vitamina D (UI)
Proteína total no soro (g%)	$Y = 1,6206 + 0,08008^{**}Glu + 0,0001609^{**}VD - 0,000000009133^{**}VD^2$	0,71	3,53	15	8.811
Albumina no soro (g%)	$Y = 0,6904 + 0,02908^{**}Glu + 0,00002747^{**}VD - 0,000000001467^{**}VD^2$	0,55	1,25	15	9.407
Globulina no soro (g%)	$Y = 0,9160 + 0,04567^{**}Glu + 0,0001484^{**}VD - 0,000000008378^{**}VD^2$	0,62	2,26	15	8.865
Proteína total no fígado (mg/g)	$Y = 101,0520 + 0,01533^{**}VD - 0,000001052^{**}VD^2$ (5%)	0,60	156,90	5	7.286
	$Y = 103,1840 + 0,003343^{**}VD - 0,0000002177^{**}VD^2$ (10%)	0,63	116,02	10	7.678
	Y = Pontos experimentais (15%)	-	146,86	15	10.000

** e * Significativo ao nível de 1% e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste t.

$$\hat{Y} = 0,9160 + 0,04567^{**}Glu + 0,0001484^{**}VD - 0,000000008378^{**}VD^2 \quad R^2=0,62$$



** Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste t.

Figura 13 - Estimativa das concentrações de globulina no soro, em função de níveis de ácido glutâmico (Glu) e vitamina D₃ (VD).

De acordo com o Quadro 13 e Figura 14, a concentração máxima estimada de proteínas totais no fígado, 156,9 mg/g foi obtida com 5% de L-Glu e 7.286 UI de VD.

Ao contrário do encontrado, GUIMARÃES et al. (1996) não observaram diferença significativa ($P > 0,05$) nas concentrações de proteína total no fígado dos pintos alimentados com 5% e 10% de L-Glu. Entretanto, as aves alimentadas com 10% de L-Glu ou misturas isonitrógenas de L-Glu e L-Asp, ou L-Glu e L-Ala apresentaram tendência às maiores concentrações de proteína no fígado em relação ao menor nível de nitrogênio não específico.

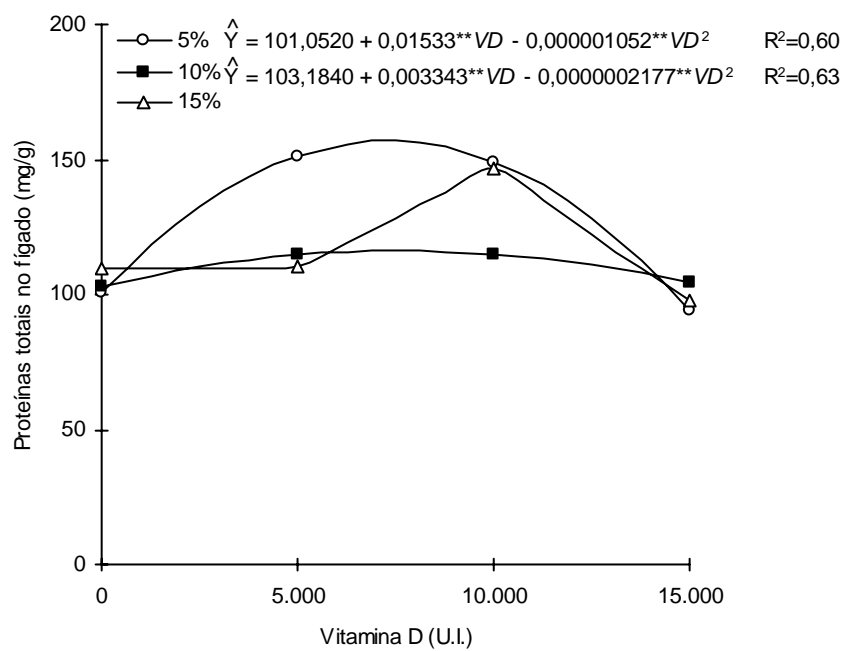


Figura 14 - Estimativa das concentrações de proteínas totais no fígado, em função de níveis de ácido glutâmico (Glu) e vitamina D₃ (VD).

4. RESUMO E CONCLUSÕES

Com o objetivo de estudar o efeito de níveis crescentes de ácido L-glutâmico (L-Glu) e níveis de vitamina D₃ (VD) na composição bioquímica do osso e do soro foram utilizados pintos de corte, machos, Hubbard, de 1 a 14 dias de idade.

Os animais foram distribuídos em esquema fatorial em um delineamento inteiramente casualizado, com 12 tratamentos, quatro repetições e sete aves por repetição, criadas em sistema de baterias aquecidas com piso de tela elevado, recebendo água e dieta purificada à vontade. Os tratamentos consistiram de uma dieta básica purificada contendo todos os L-aminoácidos essenciais, mistura vitamínica e mineral, suplementada com três níveis de L-Glu (5, 10 e 15%) e quatro níveis de VD (0, 5.000, 10.000 e 15.000 UI/kg).

Não foi observado efeito de tratamento ($P > 0,05$) nas concentrações de proteína colagenosa no fêmur, constante e igual a 23,44 mg/100g. Nos tibiotarsos, A maior concentração (26,42 mg/100g) foi obtida com 15% de L-Glu.

Observou-se, ainda, efeito quadrático dos níveis de L-Glu nas concentrações de proteína não colagenosa (PNC) no fêmur e tibiotarso, sendo que as menores concentrações de PNC no fêmur foram obtidas com 9,32% de L-Glu. Nos tibiotarsos, as menores concentrações de PNC foram obtidos com nível estimado de 9,73% de L-Glu.

No fêmur, obteve-se maior teor médio de proteína total (30,04 mg/100g) com 15% de L-Glu e 10.000 UI de VD, e no tibiotarso, a maior concentração (30,03 mg/100g) foi obtida com 5% de L-Glu e 5.000 UI de VD.

Houve efeito significativo ($P < 0,01$) dos níveis de L-Glu e VD nas concentrações de cálcio no soro sanguíneo, que alcançaram máximo estimado de 9,61 mg/dL, com 15% de L-Glu e 14.181 UI de VD.

Foi observado efeito quadrático dos níveis de VD sobre as concentrações de cálcio iônico no soro. O ponto máximo obtido, 7,33 mg/dL, foi obtido com 15% de L-Glu e 15.664 UI de VD.

O ponto máximo estimado para as concentrações de fósforo no soro foi 7,20 mg/dL obtido com 10% de L-Glu e 10.863 UI de VD.

Os maiores valores de atividade enzimática foram encontrados com 10% de L-Glu e na deficiência de VD.

Os resultados mostraram um valor máximo estimado de 3,52 g% de proteína total no soro obtido com 15% de L-Glu e 8.811 UI de VD. A maior concentração de albumina no soro (1,26 g%) foi obtida com 15% de L-Glu e 9.407 UI de VD. Com 15% de L-Glu e 8.865 UI de VD, obteve-se um ponto máximo estimado de 0,95% de globulina no soro.

Com 5% de L-Glu foram observados as maiores concentrações de proteínas totais no fígado até um nível máximo de 10.000 UI de VD.

Na deficiência de VD houve aumento na atividade de fosfatase alcalina atribuída ao aumento na atividade dos osteoblastos, e, em geral, observou-se, que 10% de L-Glu como fonte de nitrogênio não específico otimizou os teores de PNC no fêmur e no tibiotarso, cujas concentrações estão diretamente relacionadas com a menor incidência de problemas de pernas. Além disso, foi necessário um mínimo de 5.000 UI de VD para restabelecer as concentrações normais de cálcio no soro, reduzido em função da deficiência de VD.

CAPÍTULO 4

ANÁLISE HISTOLÓGICA DE TIBIOTARSOS E FÊMURES DE PINTOS DE CORTE DE 1 A 14 DIAS DE IDADE

1. INTRODUÇÃO

Uma variedade de fatores contribui para as anormalidades de pernas em aves, cuja etiologia e patogênese são complexas e inadequadamente definidas (CRUICKSHANK e SIM, 1987; THORP e WADDINGTON, 1997). Fatores relacionados às pernas são provavelmente devido à interação de vários fatores que envolvem nutrição, ambiente, genética e/ou doenças.

A vitamina D desempenha papel essencial na manutenção do esqueleto mineralizado saudável para muitos vertebrados, e a luz solar promove a fotoprodução da vitamina D₃ na pele. Uma vez formada, é seqüencialmente metabolizada no fígado e rim à 1,25 – diidroxicolecalciferol. A principal função biológica desse composto é manter as concentrações de cálcio e fósforo no soro dentro de valores normais para manter as funções celulares essenciais e promover a mineralização do esqueleto (HOLLICK, 1996). A deficiência de vitamina D em frangos jovens produz raquitismo, e é caracterizada pelo alongamento do disco epifisário e falha na mineralização da cartilagem do disco epifisário, causando

desorganização e hipertrofia dos condrócitos e defeitos na mineralização, resultando em deformidades ósseas (PERRY et al., 1991).

A suplementação dietética é fonte primária de vitamina D₃ para frangos de corte, e a sua deficiência em frangos de corte pode ocorrer como resultado da suplementação inadequada ou absorção deficiente de colecalciferol da ração (PERRY et al., 1991; GOFF e HORST, 1995).

O disco epifisário dos ossos das aves desempenha importante papel no desenvolvimento do esqueleto. É o principal sítio de crescimento longitudinal dos ossos longos. A cartilagem do disco epifisário é formada pela proliferação, hipertrofia dos condrócitos e síntese de matriz extracelular. A cartilagem é, então, calcificada, degradada e substituída por tecido ósseo. O desenvolvimento do osso está ligado à formação da cartilagem, no qual o osso é formado a partir de um modelo de cartilagem. A matriz óssea consiste de alto grau de mineralização, que é necessário para a formação de uma estrutura funcional rígida (VELLEMAN, 2000).

Comparado com as espécies de mamíferos, o disco epifisário de crescimento contém mais células, é menos organizado e parece mais susceptível à má formação (LEACH e GAY, 1987; PINES e HURWITZ, 1991). A cartilagem do disco epifisário regula a velocidade de crescimento e comprimento de vários ossos do esqueleto. Pouco se conhece sobre a regulação da degradação terminal da cartilagem anterior à formação do osso. O presente estudo foi investigar os efeitos do ácido L-glutâmico (L-Glu) e vitamina D₃ (VD) nas deformidades ósseas em frangos de corte, investigadas microscopicamente.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Procedimentos gerais

O experimento foi montado segundo um esquema fatorial, em um delineamento inteiramente casualizado 3 x 4 (3 níveis de ácido glutâmico x 4 níveis de vitamina D₃), no Setor de Avicultura do Departamento de Zootecnia, na Universidade Federal de Viçosa.

Um total de 336 pintos de um dia, machos, Hubbard, com peso médio 40 gramas foram distribuídos aleatoriamente nos tratamentos, que consistiram de dieta básica purificada (GUIMARÃES , 1988) (Quadro 1), contendo todos os aminoácidos essenciais (Quadro 2), vitaminas (Quadro 3) e minerais (Quadro 4) e suplementada com três níveis de ácido L-glutâmico (5, 10 e 15%) combinados com quatro níveis de vitamina D₃ (0, 5.000, 10.000 e 15.000 UI/kg). Cada tratamento consistiu de quatro repetições de sete aves cada. As aves foram alojadas em baterias aquecidas com pisos de tela elevados e receberam água e dieta *ad libitum* durante todo o período experimental de 14 dias.

Ao término do período experimental, 16 aves de cada tratamento foram sacrificadas por deslocamento cervical e os ossos (tibiotarsos e fêmures) de ambas as pernas, removidos.

2.2. Preparo das lâminas

Foram reservados 12 tibiotarsos e 12 fêmures para análises histológicas, devidamente limpos de todo tecido aderente, desidratados em série crescente de álcoois e fixados em líquido de Bouin, por 48 horas. Foram, então, descalcificados em mistura descalcificadora contendo ácido clorídrico, por 10 dias.

A seguir, os fragmentos ósseos sofreram processamento histológico rotineiro, desde a desidratação, diafanização até a inclusão em parafina. Três cortes semi-seriados de cinco µm de espessura, foram obtidos de cada fragmento ósseo e corados segundo a técnica de Hematoxilina-Eosina (GRIMALDI FILHO, 1981).

Os parâmetros, tais como espessura do disco epifisário, espessura do tecido compacto da diáfise, diâmetro do canal medular e organização do disco epifisário dos tibiotarsos foram avaliados a partir de cortes longitudinais. Para os fêmures, foram utilizados cortes transversais para a avaliação da diâmetro do canal medular e espessura do osso compacto da diáfise.

QUADRO 1 – Dieta básica purificada

Ingredientes	%
Aminoácidos não essenciais ^{1/}	variável
Aminoácidos essenciais ^{2/}	8,94
Mistura vitamínica ^{3/}	4,48
Mistura mineral ^{4/}	9,10
Óleo de soja	15,00
Bicarbonato de sódio	1,00
Amido	qsp 100,00

1/ Ácido L-glutâmico: 5%, 10% e 15%.

2/ veja Quadro 2.

3/ veja Quadro 3.

4/ veja Quadro4.

QUADRO 2 – Aminoácidos essenciais^{1/}

Aminoácidos	%
L – Arginina. HCl	1,15
L – Histidina. HCl. H ₂ O	0,41
L – Lisina. HCl	1,14
L – Tirosina	0,45
L – Fenilalanina	0,50
L – Triptofano	0,15
L – Metionina	0,35
L – Cisteína	0,45
L – Treonina	0,65
L – Leucina	1,00
L – Isoleucina	0,60
L – Valina	0,69
L – Prolina	0,40
Glicina	1,00

^{1/} SASSE e BAKER (1973).

QUADRO 3 – Mistura Vitamínica^{1/}

Ingredientes	Quantidade/kg de dieta
Colina 70 %	3,3 g
Retinil Palmitato	5.000 UI
Colecalciferol ^{2/}	Variável
D - α - tocoferil acetato	22 UI
Menadiona sódio bissulfito	2,0 mg
Inositol	1,0 g
Riboflavina	9,0 mg
Tiamina. HCl	6,0 mg
Pantotenato de cálcio	20,0 mg
Niacina	50,0 mg
Piridoxina	8,0 mg
Ácido fólico	2,0 mg
Biotina	0,3 mg
B ₁₂ (0,1%)	20,0 mg
BHT	0,125 mg
Excipiente	Variável

1/ FEATHERSTON e ROGLER (1978).

2/ 0, 5.000, 10.000 e 15.000 UI/kg.

FONTE: ROCHE.

QUADRO 4 – Mistura Mineral^{1/}

Ingredientes	Quantidade/kg de dieta
CaCO ₃	18,6526 g
CaHPO ₄ . 2H ₂ O	30,5300 g
K ₂ HPO ₄	11,2000 g
NaCl	6,0000 g
FeSO ₄	0,2000 g
ZnO	0,1225 g
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,0150 g
MnSO ₄ . H ₂ O	0,5100 g
KI	0,0400 g
MgCO ₃	2,5000 g
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	1,0000 g
Na ₂ SeO ₃	0,2200 mg
Excipiente (casca de arroz)	30,0000 g

1/ FEATHERSTON e ROGLER (1978).

3.RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Espessura e organização do disco epifisário de tibiotarso

As médias obtidas para os tratamentos são mostradas no Quadro 5. A menor espessura média do disco epifisário e alto nível de organização foi obtido com 10% de L-Glu e 15.000 UI de VD.

Com 15% de L-Glu e 15.000 UI de VD, o disco de crescimento mostrou-se reduzido em espessura, mas apresentou-se desorganizado e com falhas na mineralização da cartilagem, assim como 5% de L-Glu, cujo disco apresentou-se com a pior organização em relação às diversas zonas de células que compõem o disco, e os vários estágios até a calcificação da cartilagem. Nessas condições, as maiores alterações ósseas na deficiência de VD, foram observadas na espessura e organização do disco epifisário.

Na deficiência de VD e nitrogênio não específico, a zona de cartilagem hipertrófica mostrou-se alongada e desorganizada e observou-se camada desenvolvida de células na zona proliferativa pré-hipertrófica. A Figura 1a mostra transição abrupta entre o disco epifisário e a metáfise. Notar a presença de algumas espículas ósseas (Figura 1b) na zona hipertrófica degenerativa parcialmente calcificada e com pequena invasão de capilares na zona hipertrófica (Figura 1c).

QUADRO 5 – Diâmetro do canal medular, espessura do osso compacto da diáfise e comprimento médio do disco epifisário de cortes longitudinais do tibiotarso

Característica	Vitamina D ₃ (UI)	Ácido glutâmico (%)			Média
		5	10	15	
Diâmetro do canal medular (μ m)	0	1205	834	1184	1074,00 \pm 8,85
	5.000	1086	1132	987	1068,31 \pm 16,13
	10.000	1169	979	1211	1119,82 \pm 90,18
	15.000	1316	1251	697	1088,32 \pm 8,71
Média		1192,5 \pm 23,37	1049 \pm 26,77	1019,7 \pm 70,21	
Espessura da diáfise (μ m)	0	310	350	363	341 \pm 21,13
	5.000	452	840	402	565 \pm 21,98
	10.000	504	699	339	514 \pm 4,85
	15.000	702	746	274	574 \pm 8,94
Média		492 \pm 17,86	658,5 \pm 17,13	344,5 \pm 27,85	
Espessura do disco epifisário (μ m)	0	3208	3656	2753	3207,0 \pm 49,84
	5.000	3427	2483	2812	2907,3 \pm 100,50
	10.000	3551	3671	3146	3456,0 \pm 52,64
	15.000	3379	1814	2078	2423,7 \pm 30,30
Média		3391 \pm 40,05	2906 \pm 80,86	2697,2 \pm 18,27	

Com 5% de L-Glu e 5.000 UI de VD encontrou-se aumento no comprimento das espículas ósseas (Figura 1d). Houve maior organização das várias camadas de células que compõem o disco epifisário em relação às aves que receberam dieta deficiente em VD. Acompanhando as espículas, estão as células da zona de calcificação (células grandes e arredondadas) e desenvolvida camada de células proliferativas (Figura 1e). Com 5% de L-Glu e 10.000 UI de VD, observou-se desorganização do disco epifisário, com células em diferentes estágios (Figura 1f).

Com 10% de L-Glu e deficiência de VD, observou-se a presença de espículas ósseas no disco epifisário e não houve boa organização do disco, que apresentou células em diferentes estágios ao mesmo tempo.

As aves que receberam 10% de L-Glu e 5.000 UI de VD apresentaram presença de várias espículas de profundidades variadas na metáfise e melhor organização das várias camadas do disco epifisário (Figura.1g).

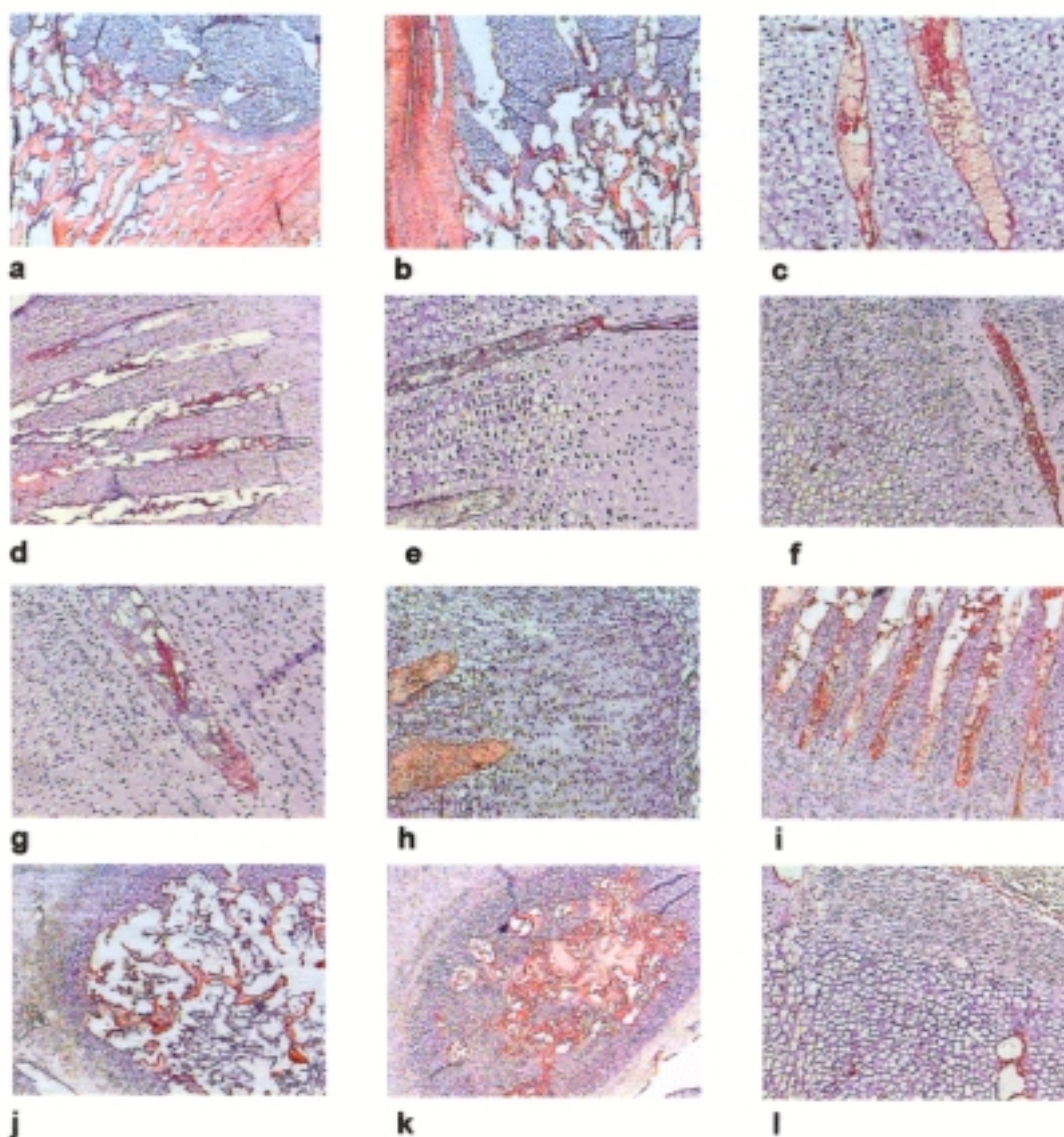


Figura 1 – a – Porção terminal do disco epifisário (40X), b – Presença de poucas espículas ósseas (40X), c – Camada de células hipertróficas e canal vascular metafiseal (100X), d – Espículas ósseas (em vermelho) e cartilaginosas (em azul) alternadas (40X), e – Desenvolvida camada proliferativa e hipertrófica (100X), f – Disco epifisário desorganizado (100X), g – Melhor organização do disco epifisário (100X), h – Disco epifisário curto e organizado (100X), i – Espículas ósseas em vermelho (40X), j – Centro de ossificação secundário (40X), k – Centro de ossificação secundário (40X), l – Redução da espessura do disco epifisário, tecido ósseo (em vermelho) (40X). HE.

Com 10% de L-Glu e 5.000 UI de VD observou-se redução e organização do disco epifisário, presença de calcificação da matriz cartilaginosa e processo de ossificação endocondral em progresso.

Com 10% de L-Glu e 15.000 UI de VD, o disco epifisário apresentou-se mais curto e organizado (Figura 1i), com várias espículas ósseas (Figura 1j), com a presença do centro de ossificação secundário (Figura 1k) na cartilagem articular, favorecendo o crescimento intersticial.

O centro de ossificação secundário se expande progressivamente reduzindo a cartilagem epifisária e do disco epifisário a zonas estreitas.

Com 15% de L-Glu e 5.000 UI de VD foi observado desorganização do disco, que foi composto por células em vários estágios ao mesmo tempo, observou-se também processo de ossificação na porção terminal do disco epifisário.

Com 15% de L-Glu e 15.000 UI de VD, presença de centro de ossificação secundário (Figura 1l), redução do comprimento e nível de organização do disco epifisário (Figura 1m), presença de tecido ósseo na região proximal do disco (Figura 1n).

Em geral, as aves que receberam dietas deficientes em VD apresentaram, as zonas proliferativas e hipertróficas ligeiramente aumentadas em espessura, arranjo desordenado dos condrócitos na zona proliferativa, falha da mineralização da cartilagem do disco epifisário.

Com 10% de L-Glu e adição de VD, houve melhoria no crescimento e desenvolvimento ósseo. Em geral, com 5 e 15% de L-Glu, o disco epifisário apresentou falhas na mineralização da cartilagem de crescimento e na organização do disco epifisário, coincidentes com as aves que apresentaram pior desempenho (Quadro 5, Capítulo 1) maior incidência de problemas de pernas (Quadro 8, Capítulo 1), e tibiotarso e fêmur com maiores concentrações de proteínas não colagenosas (Quadro 5, Capítulo 8). Os resultados encontrados confirmam os de McNAMEE et al. (1998), que relataram que os problemas de pernas estão associados com alterações histológicas no disco epifisário da terminação proximal do osso.

3.2. Diâmetro do canal medular e espessura do osso compacto da diáfise do tibiotarso

As médias de tratamentos encontram-se no Quadro 5. Observou-se efeito significativo dos níveis de L-Glu na espessura do osso compacto da diáfise do tibiotarso, com o melhor desenvolvimento ósseo observado com 10% de L-Glu (Figura 2e). Na deficiência de VD, em todos os níveis de L-Glu, houve depressão no desenvolvimento da diáfise (Figuras 2a, 2c e 2f), sendo restabelecido com a suplementação de VD (Figuras 2b, 2d e 2g). No caso do diâmetro do canal medular, não foi observado efeito significativo dos níveis de VD e de L-Glu.

3.3. Diâmetro do canal medular e espessura do osso compacto da diáfise do fêmur

As médias obtidas para os tratamentos experimentais são apresentadas no Quadro 6. Observou-se aumento do diâmetro do canal medular e da espessura do osso compacto da diáfise do fêmur com a suplementação de 10% de L-Glu (Figura 2h). Na deficiência de VD, observou-se redução no diâmetro do canal medular e na espessura do osso. Nas figuras 2i e 2j, observou-se redução da espessura do osso compacto da diáfise com 15% de L-Glu e 15.000 UI de VD.

Em geral, a deposição contínua de tecido ósseo pela atividade dos osteoblastos aumenta a espessura do tecido ósseo compacto da diáfise. Esse aumento é acompanhado pelo aumento do diâmetro do canal medular. Os resultados estão de acordo com KANNAN et al. (1995), os quais relataram melhoria no crescimento e desenvolvimento ósseo devido à suplementação de VD.

QUADRO 6 – Diâmetro do canal medular e espessura do osso compacto da diáfise de cortes transversais de fêmures

Característica	Vitamina D3 (UI)	Ácido glutâmico (%)			Média
		5	10	15	
Diâmetro do canal medular (µm)	0	1160	1167	973	1100 ± 6,63
	5.000	1224	1159	1224	1202 ± 36,08
	10.000	1451	1350	1039	1280 ± 16,93
	15.000	1358	1591	1226	1392 ± 9,67
Média		1298 ± 26,47	1316 ± 12,02	1115 ± 13,02	
Espessura da diáfise (µm)	0	474	467	271	403,81 ± 8,28
	5.000	497	769	394	553,47 ± 46,36
	10.000	475	703	409	529,45 ± 11,25
	15.000	722	694	243	553,25 ± 5,12
Média		542 ± 4,43	658 ± 35,98	329 ± 14,56	

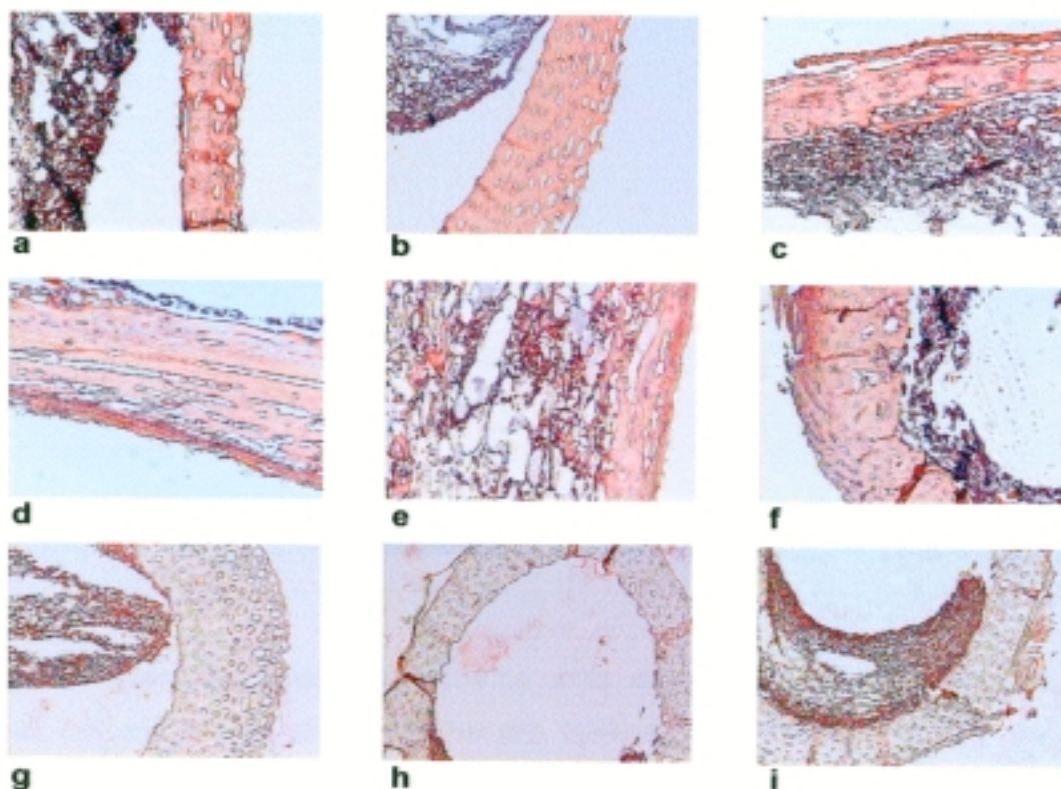


Figura 2 – a – Espessura do osso compacto da diáfise em vermelho (40X), b – Aumento na espessura da diáfise (40X), c – Aumento na espessura da diáfise (40X), d – Aumento significativo da diáfise em relação à b (40X), e – Redução da espessura da diáfise (40X), f – Diáfise do fêmur com 10% de L-Glu e 15.000 UI de Vitamina D₃, g – Diáfise de fêmur com 10% de L-Glu e 15.000 UI de vitamina D₃, h – Redução na espessura com 15% de L-Glu e 15.000 UI de vitamina D₃, i – Redução na espessura do osso compacto da diáfise (40X). HE.

4. RESUMO E CONCLUSÕES

Foram utilizados 336 pintos de corte, de um dia, machos, Hubbard, por um período de 14 dias, criados em baterias aquecidas com piso de tela elevado. Utilizou-se um esquema fatorial com delineamento inteiramente casualizado 3 x 4 (3 níveis de L-glutâmico x 4 níveis de vitamina D₃), consistindo de 12 tratamentos, quatro repetições e sete aves por repetição. Os tratamentos consistiram de dieta básica purificada contendo todos os L-aminoácidos essenciais e não essenciais, minerais, vitaminas, suplementada com 5, 10 e 15% de L-glutâmico (L-Glu) combinados com 0; 5.000; 10.000 e 15.000 UI de vitamina D₃ (VD).

O menor comprimento do disco epifisário foi obtido com 10% de L-Glu e 15.000 UI de VD, quando se observou o mais alto grau de organização e disposição das várias camadas de células do disco epifisário. Na deficiência de VD, observou-se maior desorganização do disco epifisário, com alargamento das zonas de células proliferativas e hipertróficas e falha na mineralização da cartilagem. Com a suplementação de vitamina houve restauração da organização do disco epifisário, principalmente com o nível de suplementação de 10% de L-Glu.

Observou-se efeito marcante dos níveis de L-Glu na espessura do osso compacto da diáfise. Na deficiência de VD houve depressão no desenvolvimento do tibiotarso. Não foi observado efeito significativo dos níveis de VD e L-Glu na espessura do canal medular do tibiotarso.

No fêmur, observou-se aumento do diâmetro do canal medular e da espessura do osso compacto da diáfise com a suplementação de 10% de L-Glu. Na deficiência de VD houve redução do diâmetro do canal medular e na espessura do osso compacto.

Conclui-se que, 10% de L-Glu e 15.000 UI de VD intensificaram o crescimento e desenvolvimento ósseo, quando se observou melhoria no grau de organização e na espessura do disco epifisário; espessura do osso compacto da diáfise e diâmetro do canal medular. Esses níveis estão de acordo com as aves que apresentaram o melhor desempenho e menor incidência de problemas de pernas.

RESUMO E CONCLUSÕES GERAIS

Foram utilizados 336 pintos de corte, de um dia, machos, Hubbard, por um período de 14 dias, com peso médio inicial de 40,0 g, criados em baterias aquecidas com piso de tela elevado. Utilizou-se um esquema fatorial com delineamento inteiramente casualizado 3 x 4 (3 níveis de L-glutâmico x 4 níveis de vitamina D₃), consistindo de 12 tratamentos, quatro repetições e sete aves por repetição. Os tratamentos consistiram de níveis de 5, 10 e 15% de L-glutâmico (L-Glu) e 0; 5.000; 10.000 e 15.000 UI de vitamina D₃ (VD). Todas as aves receberam uma dieta básica purificada contendo todos os L-aminoácidos indispensáveis, minerais e vitaminas.

O comprimento máximo estimado para o fêmur foi de 37,61 mm, com 9,51% de L-Glu e 15.000 UI de VD; e de 50,36mm para o tibiotarso, com 9,99% de L-Glu e 15.000 UI de VD. O diâmetro máximo do fêmur (3,57 mm) foi obtido com 10,49% de L-Glu e 10.000 UI de vitamina D₃, e 3,17 mm com 11,04% de L-Glu e 15.000 UI de VD para o tibiotarso. A resistência máxima (52,47 kgf/cm²) estimada para o fêmur foi determinada com 7,57% de L-Glu e 8.978UI de VD. Para o tibiotarso, a resistência máxima (43,35 kgf/cm²) foi obtida com 6,24% de L-Glu e 12.591UI de VD.

A maior porcentagem de cinza óssea do fêmur (44,37%) foi obtida com 15% de L-Glu de 8.502 UI de VD, e 40,73% com 15% de L-Glu combinado com 15.000 UI de VD para o tibiotarso.

Não foi observado diferença significativa entre os tratamentos para as concentrações de cálcio nos tibiotarsos, que foi constante e equivalente a

37,01%. Houve redução nas concentrações de cálcio (33,2%) nas cinzas do fêmur com a suplementação de níveis de L-Glu até 9.694 UI de VD.

Não houve efeito de tratamento nas concentrações de fósforo no tibiotalarso, que se manteve constante e igual a 20,55%.

Não foi observado efeito de tratamento na relação Ca:P do tibiotalarso, que foi constante e igual a 1,80. No fêmur, houve efeito de tratamento na relação Ca:P, sendo que a melhor relação (1,95) foi obtida com 5% de L-Glu e 15.000 UI de VD.

No fêmur, houve decréscimo até 0,67% nos níveis de magnésio com a suplementação de L-Glu e de VD. No tibiotalarso, a maior concentração de magnésio foi encontrada com 5% de L-Glu e 5.000 UI de VD.

Não foi observado efeito de tratamento ($P > 0,05$) nas concentrações de proteínas colagenosas no fêmur, permanecendo constante em 23,44 mg/100g, enquanto nos tibiotalarsos, a maior concentração (26,42 mg/100g) foi obtida com 15% de L-Glu.

Nos fêmures, as menores concentrações de proteínas não colagenosas (2,54 mg/100g) foram obtidas com 9,32% de L-Glu, nos tibiotalarsos, as menores concentrações de proteínas não colagenosas foram obtidas com nível estimado de 9,73% de L-Glu.

No fêmur, obteve-se maior concentração média de proteína total (30,04mg/100g) com 15% de L-Glu e 10.000UI de VD, e no tibiotalarso (30,03mg/100g), obtidas com 5% de L-Glu e 5.000UI de VD.

Houve aumento nas concentrações de cálcio no soro (9,61mg/dL) com a suplementação de 15% de L-Glu e 14.181 UI de VD, aumento significativo de cálcio iônico no soro (7,33 mg/dL) com 15% de L-Glu e 15.664 UI de VD.

A concentração máxima estimada de fósforo no soro foi 7,20 mg/dl obtida com 10% de L-Glu e um nível estimado de 10.863 UI de VD. Os maiores valores de atividade enzimática de fosfatase alcalina foram encontrados com 10% de L-Glu e na deficiência de VD.

Os resultados mostraram um valor máximo estimado de 3,52 g% de proteína total no soro obtido com 15% de L-Glu e 8.812 UI de VD. A maior concentração de albumina no soro (1,26 g%) foi obtida com 15% de L-Glu e 9.407 UI de VD. Com 15% de L-Glu e 8.865 UI de VD, obteve-se um ponto máximo estimado de 0,95% de globulina no soro. Com 5% de L-Glu e 7.286 UI

de VD foram observados as maiores concentrações de proteína total no fígado (156,9 mg/g).

A menor espessura do disco epifisário foi obtida com 10% de L-Glu e 15.000UI de VD, quando se observou o maior grau de organização e disposição das várias camadas de células do disco epifisário. Na deficiência de VD, observou-se maior desorganização do disco epifisário, com alargamento das zonas de células proliferativas e hipertróficas e falha na mineralização da cartilagem.

Observou-se efeito marcante dos níveis de L-Glu na espessura do osso compacto da diáfise do tibiotarso. Na deficiência de VD houve depressão no desenvolvimento do tibiotarso. Não foi observado efeito significativo dos níveis de VD e de L-Glu na espessura do canal medular do tibiotarso.

No fêmur, observou-se aumento do diâmetro do canal medular e da espessura do osso compacto da diáfise com a suplementação de 10% de L-Glu. Na deficiência de VD houve redução do diâmetro do canal medular e espessura do osso compacto.

Dos resultados obtidos pode-se concluir que:

1. Baixos níveis de nitrogênio não específico, 5% de L-Glu na dieta resultaram em um desempenho reduzido, alta incidência de problemas de pernas e altas concentrações de proteínas não colagenosas nos tibiotarsos e fêmures;

2. A elevação do nível de nitrogênio não específico na dieta (10%) melhora o desempenho, reduz mas não elimina os problemas de pernas e reduzem as concentrações de proteínas não colagenosas nos ossos longos;

3. A vitamina D₃ aparentemente está associada ao aparecimento dos problemas de pernas, sem que, contudo, tenha sido, ainda, obtido o nível adequado para eliminá-los;

4. As aves que apresentaram maior incidência de problemas de pernas com 5% de L-Glu apresentaram os menores teores de cinza óssea no fêmur e tibiotarso, mas não foi observada nenhuma relação direta marcante entre as concentrações de minerais nas cinzas dos ossos e a incidência de problemas de pernas;

6. O melhor desenvolvimento ósseo foi diretamente relacionado com os níveis de L-Glu (10%) e níveis de suplementação de vitamina D₃ (15.000 UI);

7. Foi necessário um mínimo de 5.000 UI de vitamina D₃ para restabelecer as concentrações normais de cálcio no soro, reduzido em função da deficiência de vitamina D₃;

8. Com a suplementação de vitamina D₃ houve restauração da organização do disco epifisário, principalmente com o nível de suplementação de 10% de L.Glu.

9 Em geral, considerando o conjunto de parâmetros avaliados, recomenda-se 10% de L-Glu como fonte de nitrogênio não específico e 15.000 UI de vitamina D₃ para atender as exigências dos pintos de corte, aos 14 dias de idade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERS, G.A.A. 1994. Criação e resistência às doenças em avicultura. *Conferência APINCO 1994*, 3-14.
- ANDERSON, J.J.B., TOVERUD, S.U. 1994. Diet and vitamin D: a review an emphasis on human function. *J. Nutr. Biochem.*, 5(2):58-65.
- BRADFORD, M. A 1976. Rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, 72(1):248-254.
- BREEN, E.C., Van WIJNEN, A.J., LIAN, J.B.et. al. 1994. In vivo occupancy of the vitamin D responsive element in the osteocalcin gene supports vitamin D-dependent transcriptional upregulation in intact cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91(26):12902-12906.
- CHESNEY, R.W. 1989. Vitamin D: can an upper limit be defined. *J. Nutr.* 119(12S):1825-1828.
- CHEVILLE, N.F., HORST, R.L. 1981. Pathology of experimental vitamin D deficiency in chickens and effects of treatment with vitamin D metabolites. *Vet. Pathol.*, 18(5):638-651.
- COOK, M.E. 2000. Skeletal deformities and their causes: introduction. *Poult. Sci.*, 79(8): 982-984.
- CORNÉLIO, L. dos R. 1995. Efeitos do ácido L-glutâmico e da relação cálcio e fósforo no desempenho e anormalidades de pernas de pintos de corte. Viçosa, MG, UFV, 1995. 54p. (Tese M.S.).
- CHRISTENSON, R.H. 1997. Biochemical markers of bone metabolism: an overview. *Clinical Bioch.*, v.30(8), p.573-593.
- CRUICKSHANK, J.J., SIM, J.S. 1987. Effects of excess vitamin D₃ and cage density on the incidence of leg abnormalities in broiler chickens. *Avian Dis.*, 31(2):332-338.
- De LUCA, H.F., SCHNOES, H.K. 1983. Metabolism and mechanism of action of vitamin D. *Ann. Rev. Biochem.* 45:631-666.

- De LUCA, H.D. Vitamin D:1993. *Nutrition Today November/December*, p.6-11.
- DESAI, R.K., Van WIJNEN, A.J., STEIN, J.L. et al. 1995. Control of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor-mediated enhancement of osteocalcin gene transcription: effects of perturbing phosphorylation pathways by okadaic acid and staurosporine. *Endocrinology*, 136(12):5685-5693.
- EDWARDS, H.M., JR. 1988. Effect of dietary calcium, phosphorus chloride, and zeolite on the development of tibial dyschondroplasia. *Poult. Sci.*, 67(10):1436-1446.
- EDWARDS, H.M., JR. 1990. Efficacy of several vitamin D compounds in the prevention of dyschondroplasia in broiler chickens. *J. Nutr.*, 120:1054-1061.
- EDWARDS Jr, H.M., ELLIOT, M.A., SOONCHARERNYING, S. 1992. Effects of dietary calcium on tibial dyschondroplasia. Interaction with light, cholecalciferol, 1,25-dihydroxycholecalciferol, protein, and synthetic zeolite. *Poult. Sci.*, 71(12):2041-2055.
- EDWARDS, H.M., VELTMAN, J.R. 1983. The role of calcium and phosphorus in the etiology of tibial dyschondroplasia in young chicks. *J. Nutr.*, 113(8):1568-1575.
- ELLIOT, M.A., EDWARDS Jr, H.M. 1994. Effects of genetic strain, calcium, and feed withdrawal on growth, tibial dyschondroplasia, plasma 1,25-dihydroxycholecalciferol, and plasma 25-hydroxycholecalciferol in sixteen-day-old chickens. *Poult. Sci.*, 73(4):509-519.
- ELKIN, R.G., FEATHERSTON, W.R., ROGLER, J.C. 1978. Investigations of leg abnormalities in chicks consuming high tannin sorghum grain diets. *Poult. Sci.*, 57(3):757-762.
- EMMERSON, D.A., ANTHONY, N.B., NESTOR, K.E. et al. 1991. Genetic association of selection for increased leg muscle and increased shank diameter with body composition and walking ability. *Poult. Sci.*, 70(4):739-745.
- FEATHERSTON, W.R. 1976. Adequacy of glutamic acid synthesis by chick for maximal growth. *Poult. Sci.*, 53(6):680-686.
- FEATHERSTON, W.R., ROGLER, J.C. 1978. Methionine–cystine interrelationship in chicks fed diets containing suboptimal levels of methionine. *J. Nutr.*, 108(10):1954-1058.
- FUJISAWA, R., WADA, Y., NODASAKA, Y. et al. 1996. Acidic amino acid-rich sequences as binding sites of osteonectin to hydroxyapatite crystals. *Biochimica et Biophysica Acta* , 1292:53-60.

- GOFF, J.P., HORST, R.L. 1995. Assessing adequacy of cholecalciferol supplementation in chicks using plasma cholecalciferol metabolite concentrations as an indicator. *J. of Nutr.*, 125(5):1351-1357.
- GRIMALDI FILHO. 1981.
- GUIMARÃES, V.M. 1988. Efeitos de aminoácidos dispensáveis e indispensáveis no desempenho e anomalias das pernas de pintos de corte. Viçosa, MG, UFV, 1988. 54p. (Tese M.S.).
- GUIMARÃES, V.M., MORAES, G.H.K. de, ROSTAGNO, H.S. et al. 1993a. Efeitos de aminoácidos não essenciais no desenvolvimento e incidência de problemas de pernas em pintos de corte. *Rev. Soc. Bras. Zoot.*, 22(4):699-705.
- GUIMARÃES, V.M., MORAES, G.H.K., FONSECA, J.B. et al. 1993b. Efeitos do ácido L-Glutâmico, L-Prolina e L-Lisina da dieta no desenvolvimento e incidência de problemas de pernas em pintos de corte. *R. Soc. Bras. Zoot.*, 22(4):584-590.
- GUIMARÃES, V.M., MORAES, G.H.K., FONSECA, J.B. et al. 1996. Efeitos de aminoácidos não essenciais da dieta sobre glutamato-oxaloacetato transaminase hepática e composição química parcial de tíbias e fêmures de pinto de corte. *R. Soc. Bras. Zoot.*, 25(3):481-493.
- HAUSCHKA, P.V., LIAN, J.B., GALLOP, P.M. 1975. Direct identification of the calcium binding aminoacid gamma-carboxyglutamic in mineralized tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72(10):3925-3929.
- HAUSCHKA, P.V. Osteocalcin and its functional domains. In: BUTLER, W.T. The Chemistry and Biology of Mineralized Tissues. EBSCO Media, 149-158, 1985.
- HAUSCHKA, P.V. Osteocalcin: the vitamin k dependent calcium binding protein of bone matrix. *Haemostasis*, 16:258-272, 1986.
- HAUSCHKA, P.V., GALLOP, P.M. 1977. Purification and calcium - binding properties of osteocalcin, the gamma - carboxyglutamic acid - containing proteins of bone. In: WEISSIERMAN, R.H., et al. Calcium binding proteins and calcium function. Amsterdam, Elsevier, p.338-347.
- HEDSTROM, O.R., CHEVILLE, N.F., HORST, R.L. 1986. Pathology of vitamin D deficiency in growing turkeys. *Vet. Path.*, 23(4):485-498.
- HESTER, P. 1994. The role of environment and management on leg abnormalities in meat-type fowl. *Poult. Sci.*, 73(6):904-915.
- HOLICK, M.F. 1996. Vitamin D and bone health. *J. Nutr.*, 126(45):1159S-1164S.
- HONMA, N.H. 1992. Efeitos dos níveis nutricionais de cálcio sobre a capacidade reprodutiva e integridade dos ossos de galos reprodutores de corte. Viçosa, MG: UFV, 1992.63p Tese (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa.

- HURWITZ, S., BAR, A., MESHORER, A. 1973. Field rickets in turkey poults: plasma and bone chemistry, bone histology, intestinal calcium-binding protein. *Poult. Sci.*, 52(4):1370-1374.
- HURWITZ, S. 1989. Calcium homeostasis in birds. *Vitamin. Horm.*, 45:173-221.
- ITAKURA, C., YAMASAKI, K., GOTO, M. et al. 1978. Pathology of experimental vitamin D deficiency rickets in growing chickens. I. Bone. *Avian Path.*, 7:491-513.
- JANDE, S.S., DICKSON, I.R. 1980. Comparative histological study of the effects of high calcium diet and vitamin D supplements on epiphyseal plates of vitamin-D-deficient chicks. *Acta Anat.*, 108(4):463-468.
- KANNAN, Y., HARAYAMA, H., KATO, S. 1997. Effects of dietary calcium levels on the histomorphology of proximal tibia in vitamin D-deficient chicks. *Japanese Poult. Sci.*, 34(2):124-131.
- KESTIN, S.C., KNOWLES, T.G., TINCH, A.E. et al. 1992. Prevalence of leg weakness in broiler chickens and its relationship with genotype. *Vet. Rec.*, 131:190-194.
- LEACH, R.M., GAY, C.V. 1987. Role of epiphyseal cartilage in endochondral bone formation. *J. Nutr.*, 117(4):784-790.
- LIAN, J.B., REIT, B., ROUFOSSE, A.H. et al. 1979. Osteocalcin developing bone systems. In: SUTIE, J.W. Vitamin k metabolism and vitamin k dependent proteins, p.237-244.
- LILBURN, M.S. 1994. Skeletal growth of commercial poultry species. *Poult. Sci.* 73(6):897-903.
- LOFTON, J.T., SOARES, J.H. Jr. 1986. The effects of vitamin D₃ on leg abnormalities in broilers. *Poult. Sci.*, 65(5):749-756.
- MARUYAMA, K., SUNDE, M.L., HARPER, A.E. 1976. Is L-Glutamic acid nutritionally a dispensable aminoacid for the young chick? *Poult. Sci.*, 55(1):45-60.
- Mc NAMEE, P.T., McCULLAGH, J.J., THORP, B.H. et al. 1998. J.A. Study of leg weakness in two commercial flocks. *Vet. Rec.*, 143(1):131-135.
- MITCHELL, R.D., EDWARDS, H.M.Jr. McDANIEL, G.R. et al. 1997. Dietary 1,25-dihydroxicholecalciferol has variable effects on the incidences of leg abnormalities, plasma vitamin D metabolites, and vitamin D receptors in chickens divergently selected for tibial dyschondroplasia. *Poult. Sci.*, 76(2):338-345.
- MORAES, G.H.K., PERINI, D.T., MIRANDA, L.C.G. et al. 1997. Efeitos do ácido L-glutâmico e da vitamina D₃ sobre o desempenho e anormalidades nas pernas de pintos de corte. *R. Bras. Zoot.*, 26(4):773-778.

- MORAES, G.H.K. de, ROGLER, J.C., FEATHERSTON, W.R. 1984. Effects of nonspecific deficiency on growth rate and leg problems in chicks. *Poult. Sci.*, 63(2):344-353.
- MORAES, G.H.K. de; ROGLER, J.C.; FEATHERSTON, W.R. 1987. Effects of D-amino acids on growth rate and kidney D-amino acid oxidase in chicks. *Poult. Sci.*, 66(1):98-102.
- NELSON, T.S., KIRBY, L.K., JOHNSON, Z.B. 1992. Effect of calcium, phosphorus, and energy on the incidence of weak legs in heavy male broiler. *J. Appl. Poult. Res.* 1:11-18.
- NESTOR, K.E. 1984. Genetics of growth and reproduction in the turkey. 9. Long-term selection for increased 16-week body weight. *Poult Sci*, 63:2114-2122.
- NORMAN, A.W. 1994. The vitamin D endocrine system: identification of another piece of the puzzle. *Endocrin.*, 134(4):1601A-1602A.
- NORMAN, A.W., HURWITZ, S. 1993. The role of vitamin D endocrine system in avian bone biology. *J. Nutr.*, 123(2):310-316.
- OLSON, R.E. 1984. The function and metabolism of vitamin k. *Ann. Rev. Nutr.*, 4:281-337.
- PARTHEMORE, J.G., BURTON, D.W., DEFTOS, L.J. 1993. Associations and dissociations between serum bone Gla protein and alkaline phosphatase in skeletal metabolism. *J. Orthopaedic Res.*, 11:671-676.
- PERINI, D.T. 1993. Efeitos do ácido L-glutâmico e da vitamina D₃ no desempenho e anormalidades das pernas de pintos de corte. Viçosa, MG, UFV, 1993. 94p. (Tese M.S.)
- PERRY, R.W., ROWLAND, G.N., BRITTON, W.M. 1991. Pathology of experimental vitamin D deficiency in turkeys and the effects of various vitamin D supplements. *Avian Dis.*, 35:542-553.
- PINES, M., HURWITZ, S. 1991. The role of growth plate in longitudinal bone growth. *Poult. Sci.*, 70(8):1806-1814.
- PRICE, P.A. 1985. Vitamin k-dependent formation of bone Gla protein (osteocalcin) and its function. In: AUBARCH, G.D. Vitamins and Hormones. Academic Press, p.65-109.
- PRICE, P.A., BAUKOL, S.A. 1980. 1,25-dihydroxy vitamin D₃ increases synthesis of the vitamin-K-dependent bone protein by osteosarcoma cells. *J. Biol. Chem.*, 225(24):11660-11663.
- RATH, N.C., HUFF, G.R., HUFF, W.E. et al. 2000. Factors regulating bone maturity and strength in poultry. *Poult. Sci.*, 79(8):1024-1032.

- RIBEIRO, M. 1988. Efeitos de fontes e níveis de nitrogênio não-específico no desempenho e incidência de anomalias nas pernas de pintos de corte. Viçosa, MG, UFV, 1988. 82p. (Tese M.S.).
- RIBEIRO, M.; MORAES, G. H. K. de; FONSECA, J. B. 1995a. Efeitos de ácido L-glutâmico, L-alanina e L-prolina da dieta em pintos de corte: I - Desempenho, incidência de problemas de pernas e composição química de fêmures. *Rev. Soc. Bras. Zoot.*, 24(5):768-777.
- RIBEIRO, M.; MORAES, G. H. K. de; SANT'ANNA, R. et al. 1995b. Efeitos de ácido L-glutâmico, L-alanina e L-prolina da dieta em pintos de corte: II - Glutamato desidrogenase (GDH) hepática, aminoácidos e ácido úrico séricos. *Rev. Soc. Bras. Zoot.*, 24(5):778-787.
- RIBEIRO, M., MORAES, G.H.K. de, FONSECA, J.B. 1995c. Efeitos de fontes e níveis de nitrogênio não específico em dietas purificadas no desenvolvimento de pintos de corte. *Rev. Soc. Bras. Zoot.*, 24(1):88-98.
- ROBERSON, K.D., EDWARDS, H.M. 1994. Effects of ascorbic acid and 1,25-dihydroxycholecalciferol on alkaline phosphatase and tibial dyscondroplasia in broilers chickens. *British Poult. Sci.*, 35(5):763-773.
- ROBERSON, K.D., EDWARDS, H.M., JR. 1993. Dietary requirement for 1,25-dihydroxycholecalciferol to prevent tibial dyschondroplasia in broilers. *Poult. Sci.*, 72(Suppl. 1):S114.
- RODRIGUES, A.C.P. 1992. Efeito do ácido L-Glutâmico e da vitamina k da dieta no desempenho e anomalias das pernas de pintos de corte. Viçosa, MG, UFV, 1992. 55p. (Tese M.S.).
- RODRIGUES, A.C.P., MORAES, G.H.K. de. 1995. Efeitos de ácido L-glutâmico e de vitamina K da dieta no desempenho e nas anomalias das pernas de pintos de corte. *Rev. Ceres*, 42(241):270-278.
- RODRIGUES, A. C. P.; MORAES, G. H. K. de; ROSTAGNO, H. S. 1996. Efeitos do ácido L-glutâmico e da vitamina k no comprimento e na composição química parcial de tíbias e fêmures de pintos de corte. *Rev. Ceres*, 43(249):567-580.
- ROGLER, J. C.; MORAES, G. H. K. de; ELKIN, R. G. 1988. Effects of dietary nonspecific nitrogen on ¹⁴C-Glu and ¹⁴C-Pro incorporation into bone proteins in chicks. *Proc. Exp. Biol. Med.*, 188:169-172, 1988.
- SANDERS, A.M., EDWARDS, H.M., JR. 1991. The effects of 1,25-dihydroxycholecalciferol on performance and bone development in the turkey pout. *Poult. Sci.*, 70(4):853-866.
- SASSE, C.E., BAKER, D.H. 1973. Modification of the Illinois reference standard amino acid mixture. *Poult. Sci.*, 52(5):270-278.

- SILVA, D.J. 1990. Análise de alimentos (métodos químicos e biológicos). Viçosa, UFV, Impr. Univ., p.115-120.
- SILVA, F.A. da. 1995. Efeitos do ácido L-glutâmico no desempenho e composição química de tíbias e fêmures de pintos de corte. Viçosa, MG, UFV. 1995. 63p. (Tese M.S.).
- SILVA, F.A. da, MORAES, G.H.K., de. 1995. Effects of L-glutamic on growth and partial chemical composition of tibia and femur of chicks. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 24, Caxambu, MG, 1995. Anais, São Paulo, SBBQ, 1995. p.51.
- SCOTT, H.M., DEAN, W.F., SMITH, R.E. 1963. Studies on the nonspecific nitrogen requirement of chicks fed a crystalline amino acid diet. *Poult. Sci.*, 42(5):1305.
- SINGH, A., GREWAL, G.S. 1994. Patho-morphological changes due to rickets in chicks. *Indian J. Animal Sci.*, 64(11):1132-1137.
- SMITH, E.L., HILL, R.L., LEHMAN, I.R. et al. 1988. A. *Bioquímica: mamíferos*. 7ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1988, 620p.
- SPIESS, Y.H., PRICE, P.A., DEFTOS, J.L., MANOLAGAS, S.C. 1986. Phenotype – associated changes in the effects of 1,25 - dihydroxyvitamin D₃ on alkaline phosphatase and bone Gla - protein of rat osteoblastic cells. *Endocrinology*, 118: p.1340-1346.
- SUDA, T., SHINKI, T., TAKAHASHI, N. 1990. The role of vitamin D in bone and intestinal cell differentiation. *Ann. Rev. Nutr.*, 10:195-211.
- SULLIVAN, T.W. 1994. Skeletal problems in poultry: estimated annual cost and descriptions. *Poult. Sci.*, 73(6):879-882.
- SUMMERS, J.D., SHEN, H., LEESON, S. et al. 1984. Influence of vitamin deficiency and level of dietary protein on the incidence of leg problems in broiler chicks. *Poult. Sci.*, 63(6):1115-1121.
- SUGAHARA, H.; ARIYOSHI, S. 1967. The nutritional value of the individual nonessential amino acid as the nitrogen source in the chick nutrition. *Agric. Biol. Chem.*, 31:1270-1276.
- TARDIN, A.C. 1995. Visão nutricional dos problemas locomotores em frangos de corte. Conferência APINCO 1995, p.71-83.
- THORP, B.H., WADDINGTON, D. 1997. Relationships between the bone pathologies, ash and mineral content of long bones in 35-day-old broiler chickens. *Res. Vet. Sci.*, 62(1):67-73.

- VAIANO, S.A., AZUOLAS, J.K., PARKINSON, G.B. et al. 1994. Serum calcium, phosphorus, 1,25-dihydroxycholecalciferol, and endochondral ossification defects in commercial broiler chickens. *Poult. Sci.*, 73(8):1296-1305.
- VELLEMAN, S.G. 2000. The role of the extracellular matrix in skeletal development. *Poult. Sci.*, 79(8):985-989.
- VERMEER, C., JIE, K.S.G., KNAPEN, H.J. 1995. Role of vitamin k in bone metabolism. *Ann. Rev. Nutr.*, 15:1-22.
- VETTER, V., FISHER, L.W., MINTZ, K.P. 1991. Osteogenesis imperfecta: changes in noncollagenous proteins in bone. *J. Bone Miner. Res.*, 6:501-505.
- XU, T., SOARES, J.H., JR. 1998. Molecular aspects of tibial dyschondroplasia in the chicken: II. Effects of 1,25(OH)₂D₃ on the expression of type x collagen and alkaline phosphatase activity in growth plate chondrocytes. *Nutr. Res.*, 18(5):809-822.
- ZHOUWEN, L., TAT, O.B. 1993. Report on cause study of leg weakness in broiler. *Acta Veterinaria Sinica*, 24(1):57-61.
- ZUBAIR, A. K., LEESON, S. 1996. Compensatory growth in the broiler chicken: a review. *World's Poult. Sci. J.*, 52(2):189-201.
- WATKINS, K.L., SOUTERN, L.L. 1991. Effect of dietary zeolite A and graded levels of calcium on growth, plasma, and tibia characteristics of chickens. *Poult. Sci.*, 70:2295-2303.
- WIDEMAN, R.F. Jr. 1987. Renal regulation of avian calcium and phosphorus metabolism. *J. Nutr.*, 117(4):808-815.
- YALÇIN, S., AKBAS, Y., SETTAR, P., GONUL, T. 1996. Effect of tibial dyschondroplasia on carcass part weights and bone characteristics. *British Poult. Sci.*, 37(5):923-927.
- YARGER, J.G., SAUNDERS, C.A., Mc NAUGHTON, J.L. 1995. Comparison of dietary 25-hydroxycholecalciferol in broiler chicks. *Poult. Sci.*, 74(7):1159-1167.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Quadro 1A - Resumo da análise de variância do ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar

Fonte de variação	GL	Quadrado médio		
		Ganho de peso	Consumo de ração	Conversão alimentar
Ácido L-glutâmico (L-Glu)	2	35.122,0900 **	45.890,2500 **	1,4135 **
Vitamina D ₃ (VD)	3	937,8333 *	5.632,9850 **	0,1129 ns
L-Glu x VD	6	619,5754 ns	1.488,7720 *	0,1464 ns
Resíduo	36	286,3830	590,9406	0,0648
CV (%)	.	12,16	9,80	13,64

** F significativo a 1% de probabilidade.

* F significativo a 5% de probabilidade.

ns F não-significativo a 5% de probabilidade.

Quadro 2A - Resumo da análise de variância do comprimento, diâmetro e resistência do fêmur e do tibiotarso

Fonte de variação	GL	Quadrado médio			
		Comprimento	Diâmetro	Resistência	
Fêmur	Ácido L-glutâmico (L-Glu)	2	29,8540 **	1,5977 **	706,7952 **
	Vitamina D ₃ (VD)	3	22,6269 **	0,1324 ns	117,0238 **
	L-Glu x VD	6	0,4331 ns	0,3033 *	163,7880 **
	Resíduo	36	0,4803	0,1192	9,1349
Tibiotarso	Ácido L-glutâmico (L-Glu)	2	53,1302 **	1,1474 **	836,6855 **
	Vitamina D ₃ (VD)	3	48,5972 **	0,0122 ns	98,6902 **
	L-Glu x VD	6	3,1441 **	0,3779 **	120,6002 **
	Resíduo	36	0,6389	0,0631	10,7817
Fêmur	CV (%)	.	2,01	10,54	8,14
Tibiotarso	CV (%)	.	1,74	7,98	9,17

** F significativo a 1% de probabilidade.

* F significativo a 5% de probabilidade.

ns F não-significativo a 5% de probabilidade.

Quadro 3A - Resumo da análise de variância dos teores de cinzas do fêmur e tibiotarso

Fonte de variação		GL	Quadrado médio
			Cinzas
Fêmur	Ácido L-glutâmico (L-Glu)	2	142,0063 **
	Vitamina D ₃ (VD)	3	6,4969 **
	L-Glu x VD	6	18,5708 **
	Resíduo	36	0,7360
Tibiotarso	Ácido L-glutâmico (L-Glu)	2	263,2339 **
	Vitamina D ₃ (VD)	3	66,1488 **
	L-Glu x VD	6	24,6170 **
	Resíduo	36	2,3620
Fêmur	CV (%)	.	2,32
Tibiotarso	CV (%)	.	4,58

** F significativo a 1% de probabilidade.

* F significativo a 5% de probabilidade.

ns F não-significativo a 5% de probabilidade.

Quadro 4A - Resumo da análise de variância das concentrações de cálcio, fósforo e relação cálcio:fósforo (Ca:P) nas cinzas do fêmur e tibiotarso.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio			
		Cálcio	Fósforo	Ca:P	
Fêmur	Ácido L-glutâmico (L-Glu)	2	101,7295 **	0,7967 ns	0,2214 **
	Vitamina D ₃ (VD)	3	16,8570 **	1,0241 ns	0,0355 **
	L-Glu x VD	6	18,4176 **	5,8675 **	0,0313 **
	Resíduo	36	1,3457	0,8955	0,0064
Tibiotarso	Ácido L-glutâmico (L-Glu)	2	8,6280 ns	1,7377 ns	0,0022 ns
	Vitamina D ₃ (VD)	3	8,6495 ns	9,6421 **	0,0514 ns
	L-Glu x VD	6	7,1482 ns	2,3534 ns	0,0248 ns
	Resíduo	36	4,6626	1,0670	0,0191
Fêmur	CV (%)	.	3,16	4,69	4,40
Tibiotarso	CV (%)	.	5,84	5,03	7,67

** F significativo a 1% de probabilidade.

* F significativo a 5% de probabilidade.

ns F não-significativo a 5% de probabilidade.

Quadro 5A - Resumo da análise de variância das concentrações de magnésio nas cinzas do fêmur e tibiotarso

	Fonte de variação	GL	Quadrado médio Magnésio
Fêmur	Ácido L-glutâmico (L-Glu)	2	0,0598 **
	Vitamina D ₃ (VD)	3	0,2071 **
	L-Glu x VD	6	0,0424 **
	Resíduo	36	0,0103
Tibiotarso	Ácido L-glutâmico (L-Glu)	2	0,0362 *
	Vitamina D ₃ (VD)	3	0,0578 **
	L-Glu x VD	6	0,0383 **
	Resíduo	36	0,0073
Fêmur	CV (%)	.	11,55
Tibiotarso	CV (%)	.	9,02

** F significativo a 1% de probabilidade.

* F significativo a 5% de probabilidade.

ns F não-significativo a 5% de probabilidade.

Quadro 6A - Resumo da análise de variância das concentrações de proteínas colagenosas, não-colagenosas e proteínas totais no fêmur e tibiotarso

Fonte de variação	GL	Quadrado médio			
		Proteínas colagenosas	Proteínas não-colagenosas	Proteínas totais	
Fêmur	Ácido L-glutâmico (L-Glu)	2	9,8211 ns	12,4028 **	36,5031 **
	Vitamina D ₃ (VD)	3	7,5301 ns	0,3796 *	4,6252 ns
	L-Glu x VD	6	7,2720 ns	0,5427 **	7,1400 ns
	Resíduo	36	4,3643	0,1035	3,5354
Tibiotarso	Ácido L-glutâmico (L-Glu)	2	1,4630 ns	8,9669 **	15,7583 **
	Vitamina D ₃ (VD)	3	21,3206 **	1,2597 **	15,7336 **
	L-Glu x VD	6	10,2810 **	0,2636 *	10,8086 **
	Resíduo	36	1,9120	0,1013	1,5423
Fêmur	CV (%)	.	8,92	9,08	6,97
Tibiotarso	CV (%)	.	5,74	10,17	4,56

** F significativo a 1% de probabilidade.

* F significativo a 5% de probabilidade.

ns F não-significativo a 5% de probabilidade.

Quadro 7A - Resumo da análise de variância das concentrações de cálcio total, cálcio iônico e fósforo no soro sanguíneo

Fonte de variação	GL	Quadrado médio		
		Cálcio total no soro	Cálcio iônico no soro	Fósforo no soro
Ácido L-glutâmico (L-Glu)	2	3,6296 **	0,7697 ns	8,2236 **
Vitamina D ₃ (VD)	3	22,7097 **	13,0494 **	4,8503 **
L-Glu x VD	6	1,2928 *	0,7590 *	4,2253 **
Resíduo	24	0,3759	0,2328	0,1383
CV (%)	.	7,84	7,92	6,87

** F significativo a 1% de probabilidade.

* F significativo a 5% de probabilidade.

ns F não-significativo a 5% de probabilidade.

Quadro 8A - Resumo da análise de variância das concentrações de proteína total no soro sanguíneo e no fígado

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	
		Proteína total no soro	Proteína total no fígado
Ácido L-glutâmico (L-Glu))	2	1,9750 **	657,7439 *
Vitamina D ₃ (VD)	3	1,2653 **	4.685,5590 **
L-Glu x VD	6	0,2004 **	764,2974 **
Resíduo	24	0,0481	189,9706
CV (%)	.	7,75	11,84

** F significativo a 1% de probabilidade.

* F significativo a 5% de probabilidade.

ns F não-significativo a 5% de probabilidade.

Quadro 9A - Resumo da análise de variância das concentrações de albumina, e globulina no soro sanguíneo

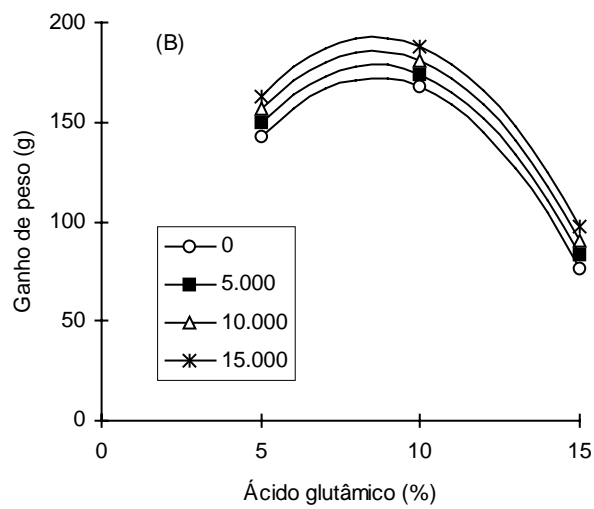
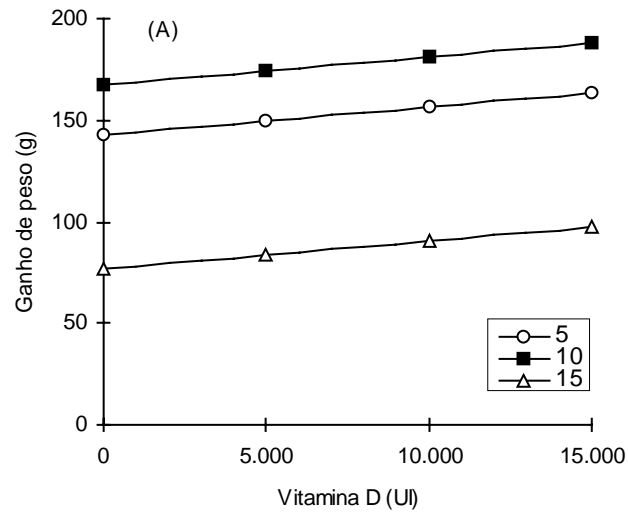
Fonte de variação	GL	Quadrado médio	
		Albumina no soro	Globulina no soro
Ácido L-glutâmico (L-Glu)	2	0,2603 **	0,6898 **
Vitamina D ₃ (VD)	3	0,0335 *	1,2138 **
L-Glu x VD	6	0,0764 **	0,0862 ns
Resíduo	24	0,0089	0,0378
CV (%)	.	8,93	11,09

** F significativo a 1% de probabilidade.

* F significativo a 5% de probabilidade.

ns F não-significativo a 5% de probabilidade.

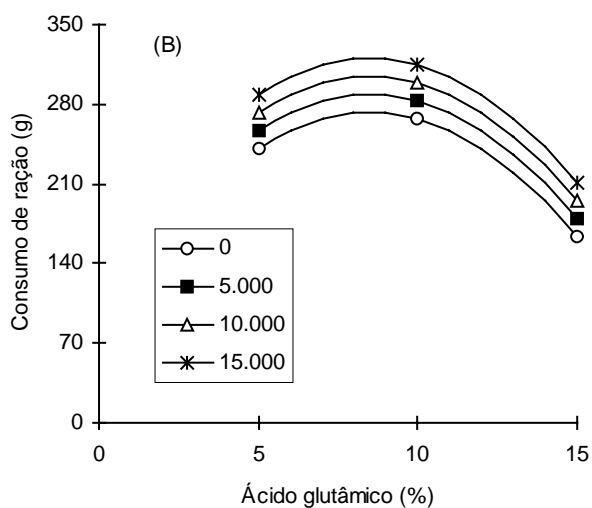
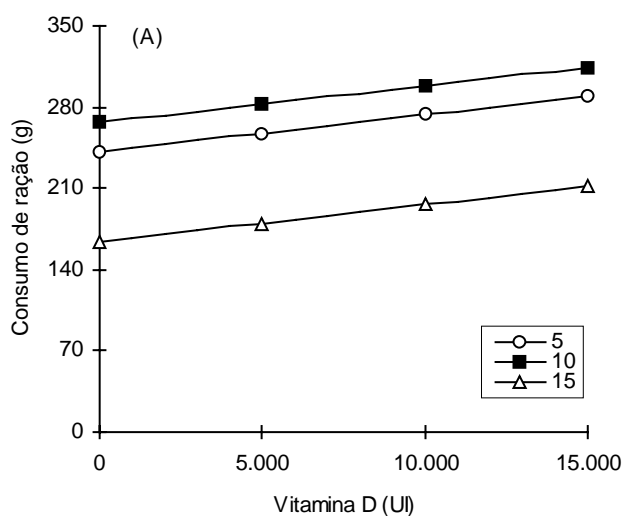
APÊNDICE B



$$\hat{Y} = 3,0654 + 39,4574 **Glu - 2,3030 **Glu^2 + 0,001369 **VD \quad R^2 = 0,95$$

** Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste t.

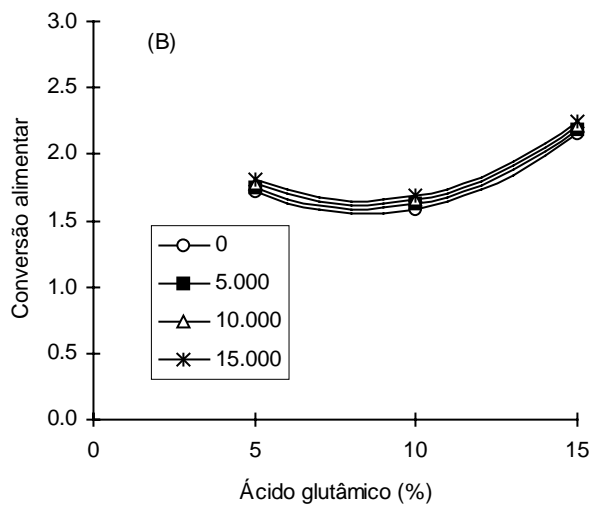
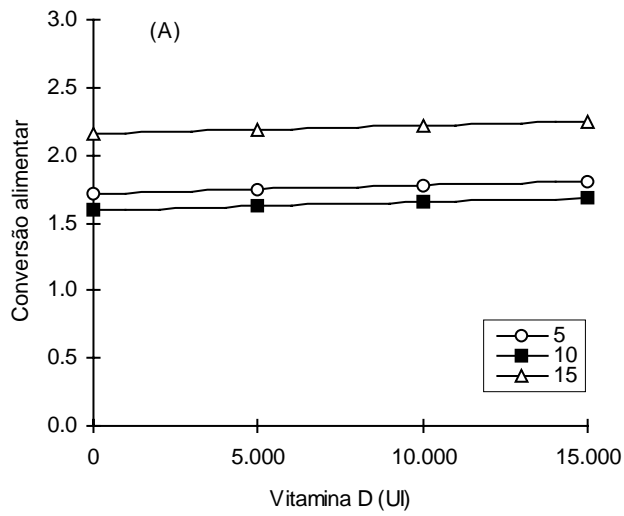
Figura 1B – Cortes na superfície de resposta do ganho de peso em função de níveis de vitamina D (A) e ácido glutâmico (B).



$$\hat{Y} = 88,6939 + 43,3804 **Glu - 2,5571 **Glu^2 + 0,003171 **VD \quad R^2 = 0,91$$

** Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste t.

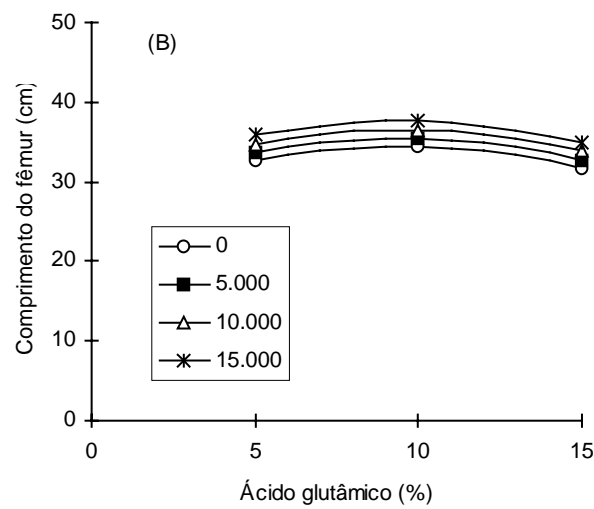
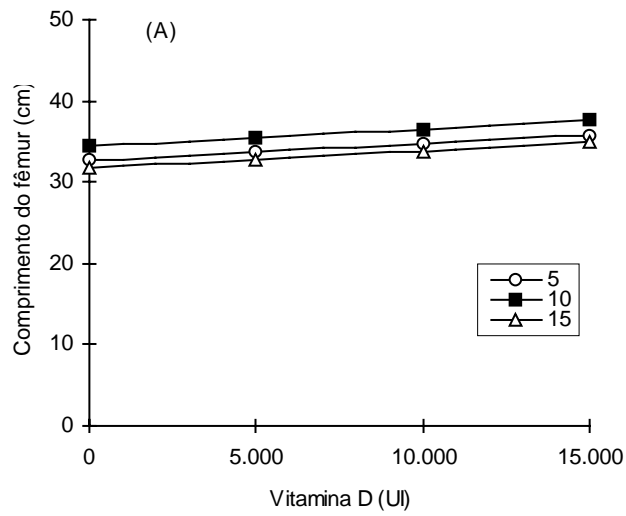
Figura 2B – Cortes na superfície de resposta do consumo de ração em função de níveis de vitamina D (A) e ácido glutâmico (B).



$$\hat{Y} = 2,5287 - 0,2319 **Glu + 0,01380 **Glu^2 + 0,000006224 * VD \quad R^2 = 0,71$$

** e * Significativos a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste t.

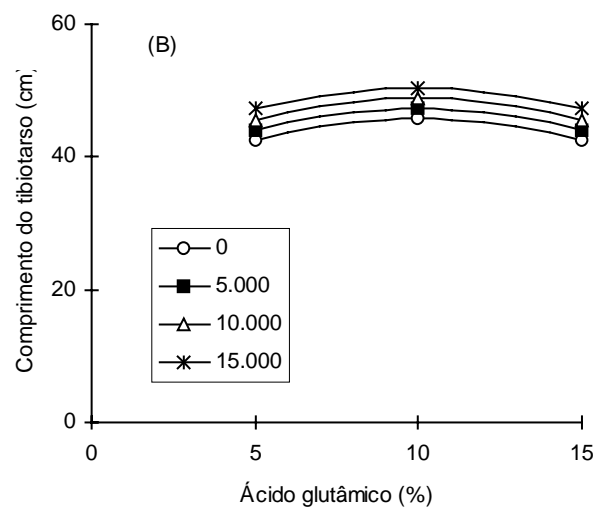
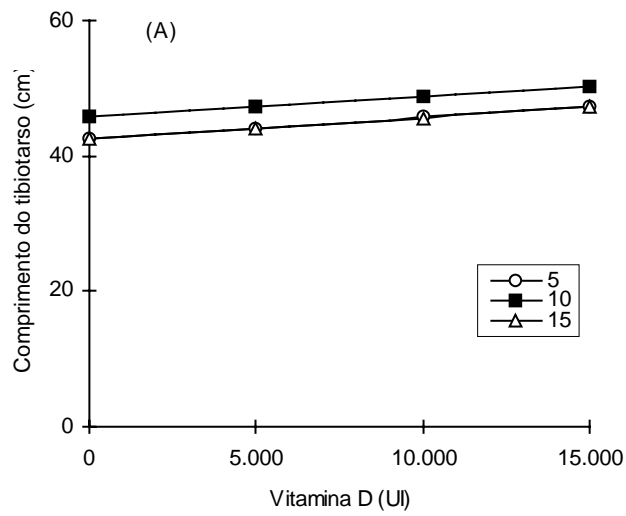
Figura 3B – Cortes na superfície de resposta da conversão alimentar em função de níveis de vitamina D (A) e ácido glutâmico (B).



$$\hat{Y} = 26,4200 + 1,6906 **Glu - 0,08913 **Glu^2 + 0,0002115 **VD \quad R^2 = 0,97$$

** Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste t.

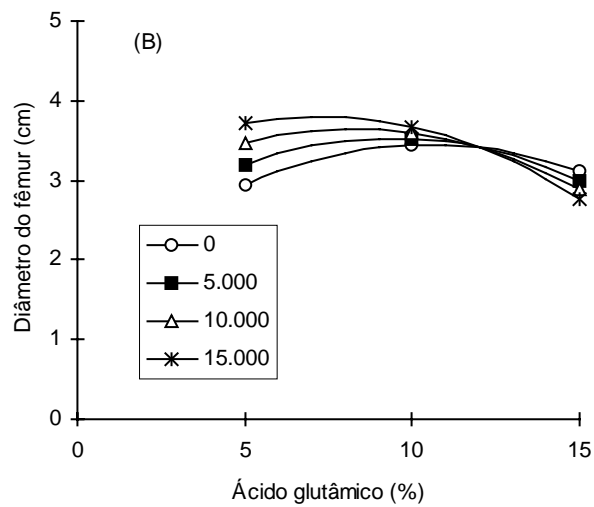
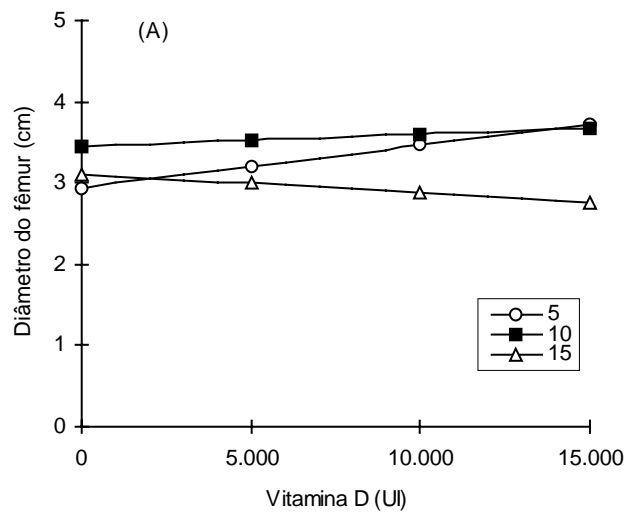
Figura 4B – Cortes na superfície de resposta do comprimento do fêmur em função de níveis de vitamina D (A) e ácido glutâmico (B).



$$\hat{Y} = 33,1375 + 2,5250 * *Glu - 0,1263 * *Glu^2 + 0,0003067 * *VD \quad R^2 = 0,91$$

** Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste t.

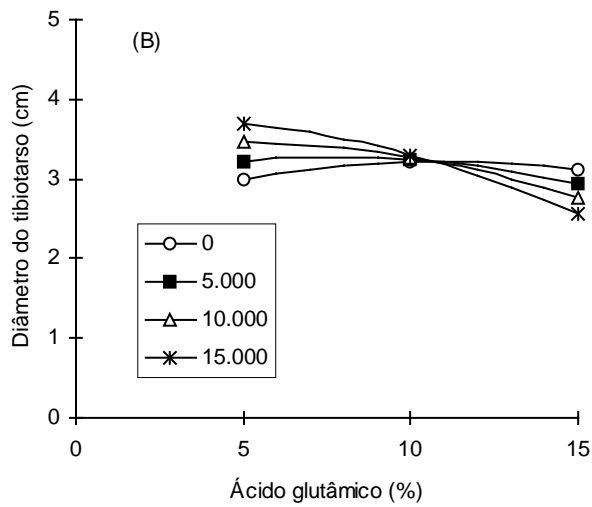
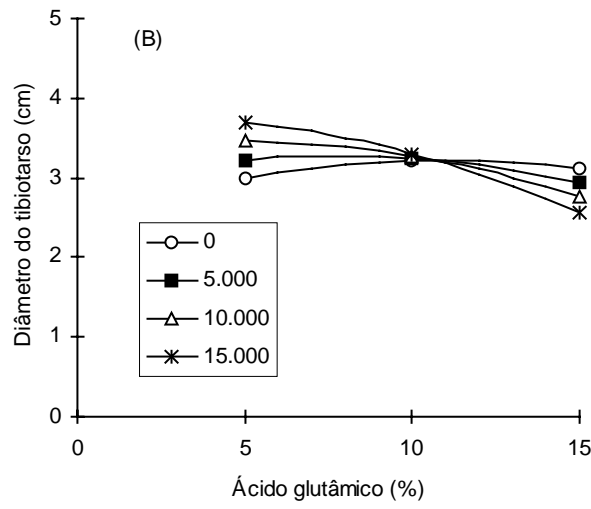
Figura 5B – Cortes na superfície de resposta do comprimento do tibiotalarso em função de níveis de vitamina D (A) e ácido glutâmico (B).



$$\hat{Y} = 1,5738 + 0,3590 **Glu - 0,01712 **Glu^2 + 0,00008933 **VD - 0,000007450 **GluVD \quad R^2 = 0,91$$

** Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste t.

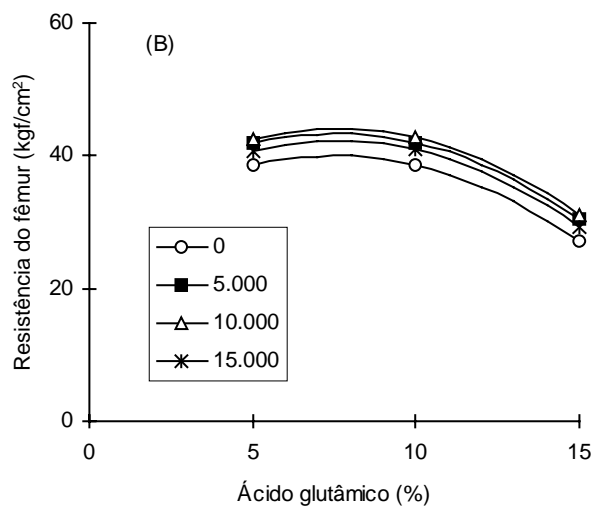
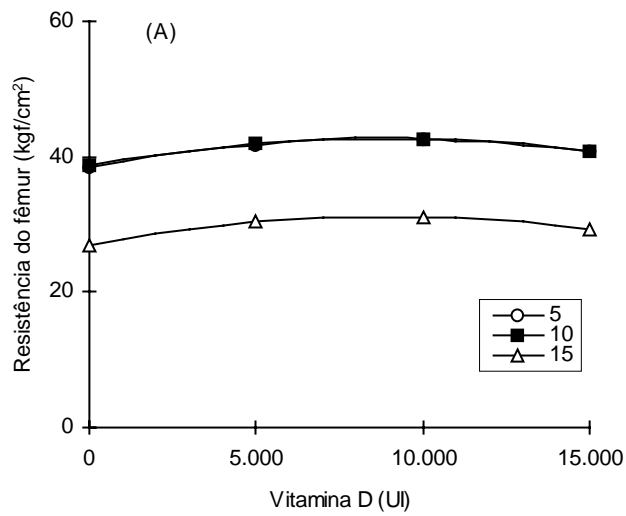
Figura 6B – Cortes na superfície de resposta do diâmetro do fêmur em função de níveis de vitamina D (A) e ácido glutâmico (B).



$$\hat{Y} = 2,4177 + 0,1468 * Glu - 0,006650 ** Glu^2 + 0,00009030 ** VD - 0,000008500 ** GluVD \quad R^2 = 0,90$$

** e * Significativos a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste t.

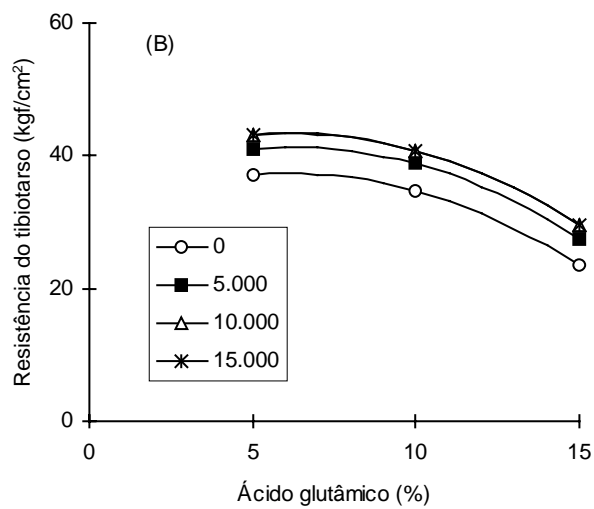
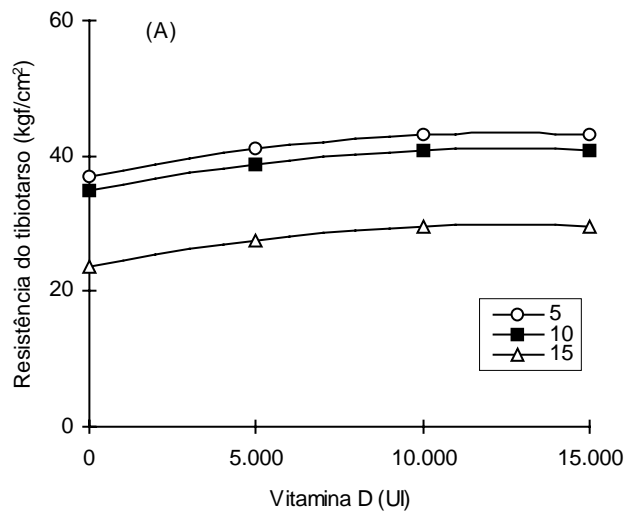
Figura 7B – Cortes na superfície de resposta do diâmetro do tibiotalarso em função de níveis de vitamina D (A) e ácido glutâmico (B).



$$\hat{Y} = 26,5932 + 3,5460 **Glu - 0,2345 **Glu^2 + 0,0009260 **VD + 0,00000005157 **VD^2 \quad R^2 = 0,56$$

** Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste t.

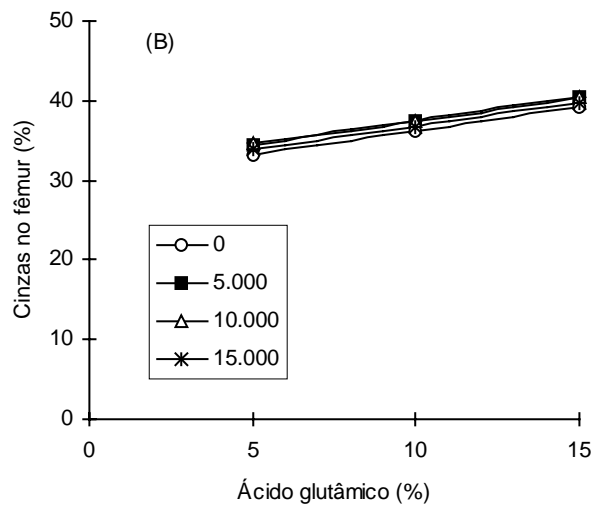
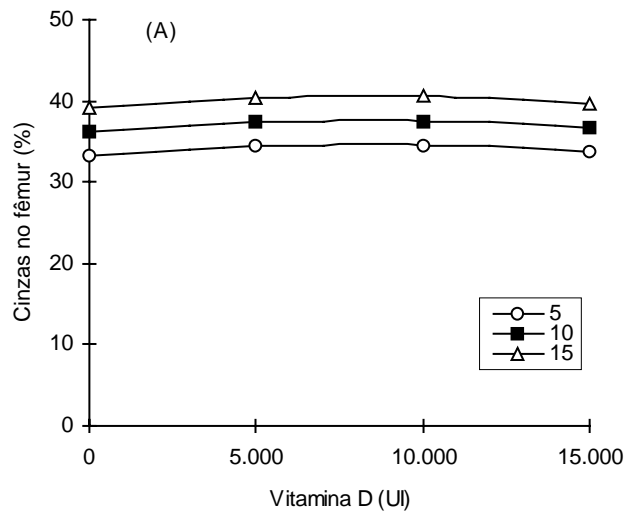
Figura 8B – Cortes na superfície de resposta da resistência do fêmur em função de níveis de vitamina D (A) e ácido glutâmico (B).



$$\hat{Y} = 30,2810 + 2,2424 **Glu - 0,1796 **Glu^2 + 0,001006 **VD - 0,00000003995 **VD^2 \quad R^2 = 0,73$$

** Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste t.

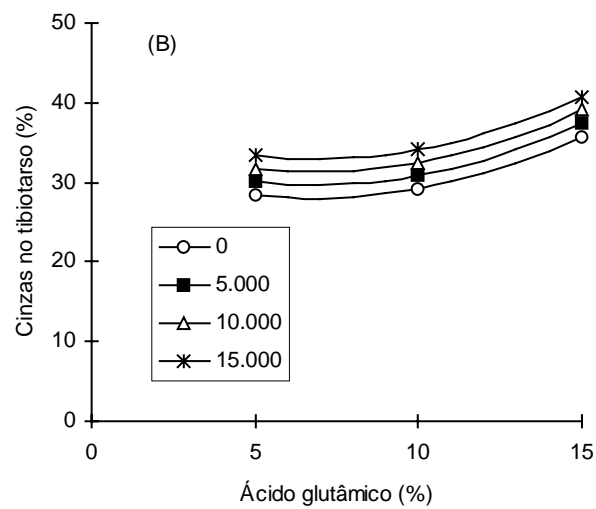
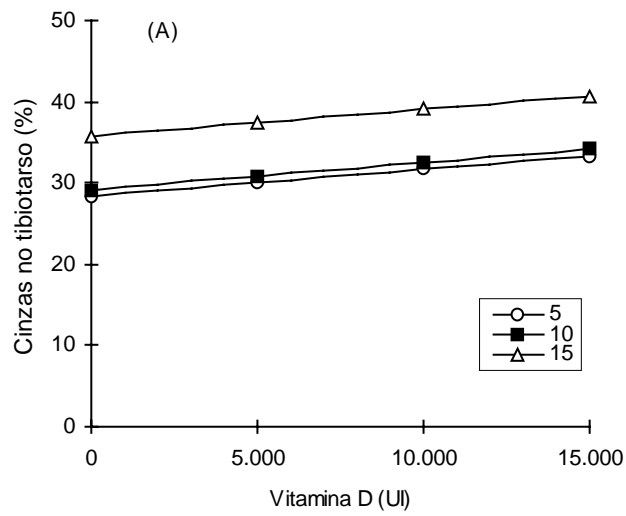
Figura 9B – Cortes na superfície de resposta da resistência do tibiotalso em função de níveis de vitamina D (A) e ácido glutâmico (B).



$$\hat{Y} = 30,2606 + 0,5947 **Glu + 0,0003265 + 0,001006 **VD - 0,00000001920 **VD^2 \quad R^2 = 0,71$$

** Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste t.

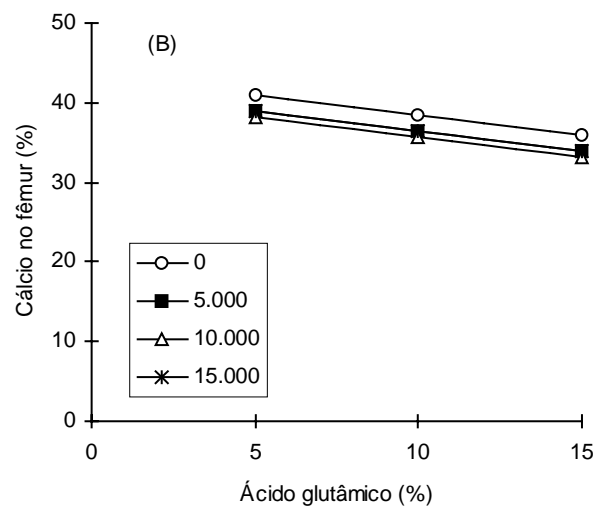
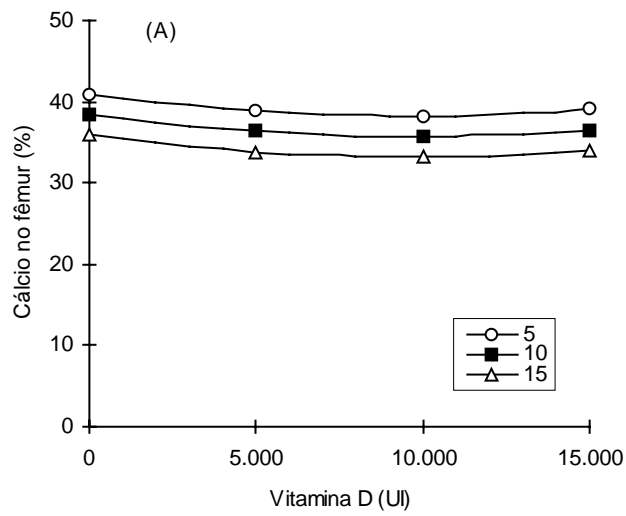
Figura 10B – Cortes na superfície de resposta dos teores de cinzas no fêmur em função de níveis de vitamina D (A) e ácido glutâmico (B).



$$\hat{Y} = 33,3558 - 1,5731 **Glu + 0,1156 **Glu^2 + 0,0003306 **VD \quad R^2 = 0,79$$

** Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste t.

Figura 11B – Cortes na superfície de resposta dos teores de cinzas no tibia-tarso em função de níveis de vitamina D (A) e ácido glutâmico (B).



$$\hat{Y} = 43,5055 - 0,5040 **Glu - 0,0005679 **VDVD + 0,00000002929 **VD^2 \quad R^2 = 0,70$$

** Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste t.

Figura 12B – Cortes na superfície de resposta das concentrações de cálcio no fêmur em função de níveis de vitamina D (A) e ácido glutâmico (B).

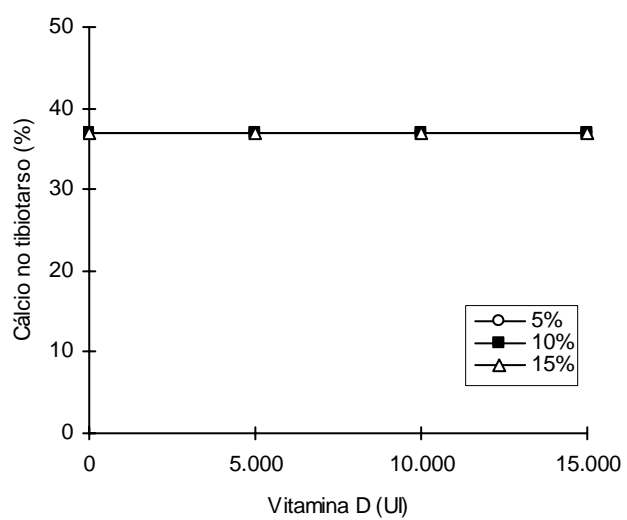
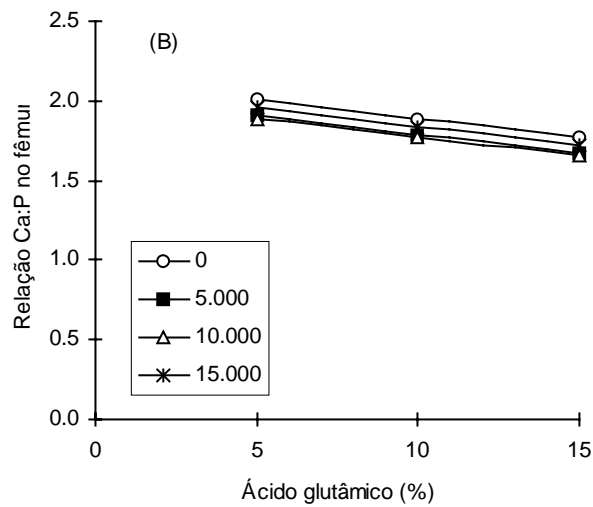
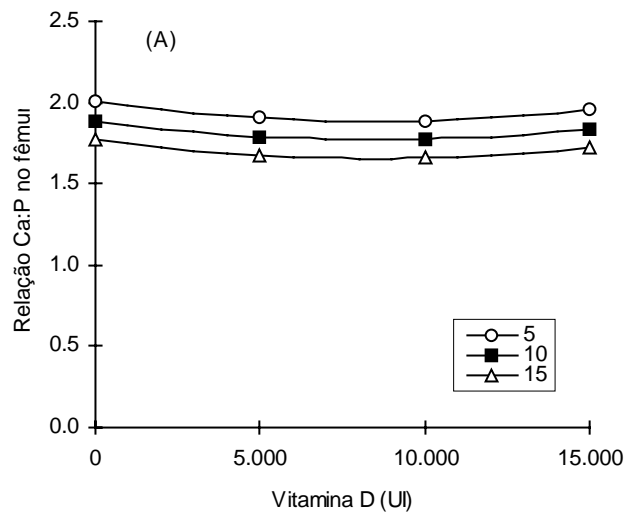


Figura 13B – Cortes na superfície de resposta das concentrações de cálcio no tibia tarso em função de níveis de vitamina D e ácido glutâmico.



$$\hat{Y} = 2,1215 - 0,02313 ** Glu - 0,00002829 ** VD + 0,000000001658 ** VD^2 \quad R^2 = 0,72$$

** Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste t.

Figura 14B – Cortes na superfície de resposta da relação Ca:P no fêmur em função de níveis de vitamina D (A) e ácido glutâmico (B).

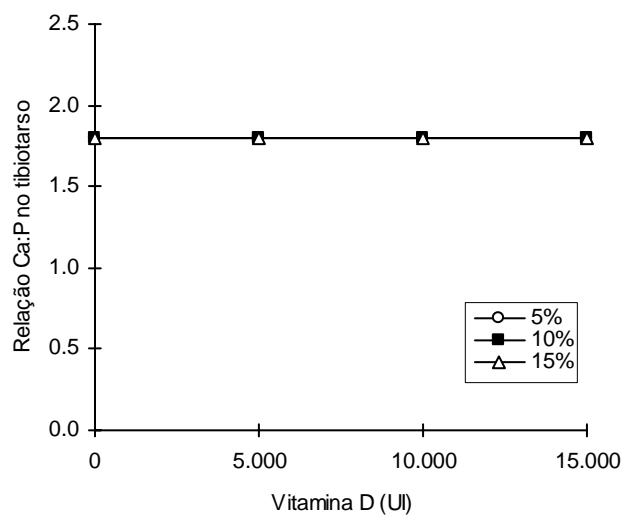
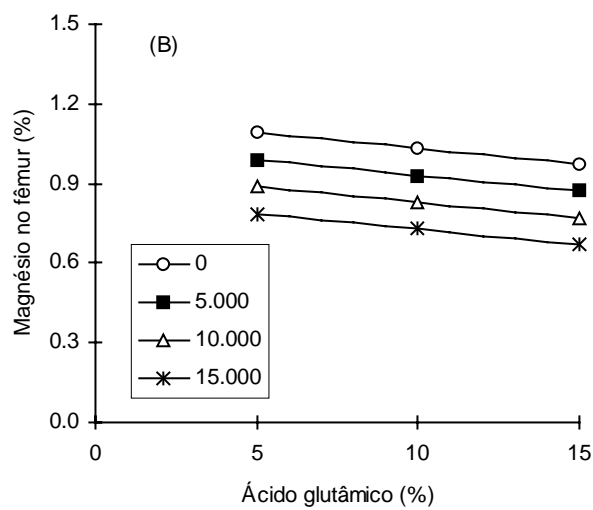
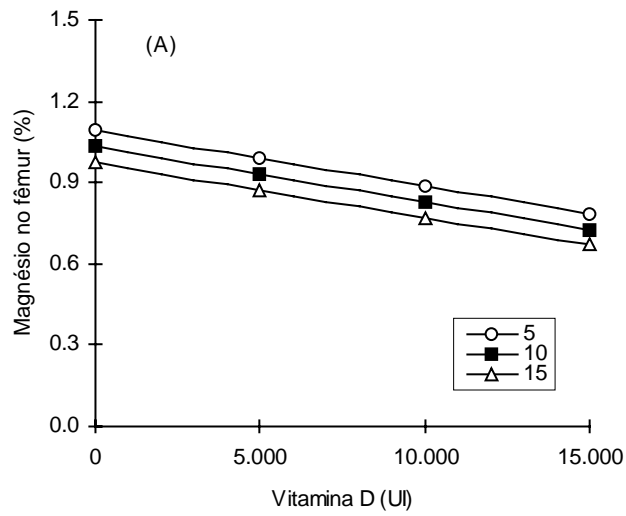


Figura 15B – Corte na superfície de resposta da relação Ca:P no tibiotalso em função de níveis de vitamina D e de ácido glutâmico.



$$\hat{Y} = 1,1504 - 0,01181 * *Glu - 0,00002030 * *VD \quad R^2 = 0,73$$

** Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste t.

Figura 16B – Cortes na superfície de resposta das concentrações de magnésio no fêmur em função de níveis de vitamina D (A) e ácido glutâmico (B).

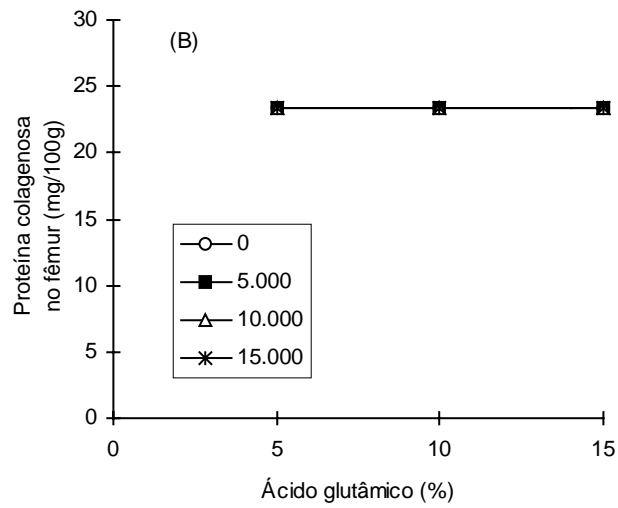
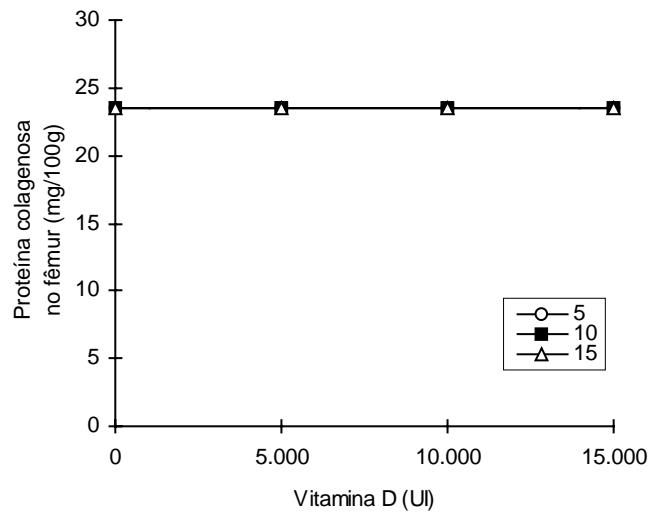
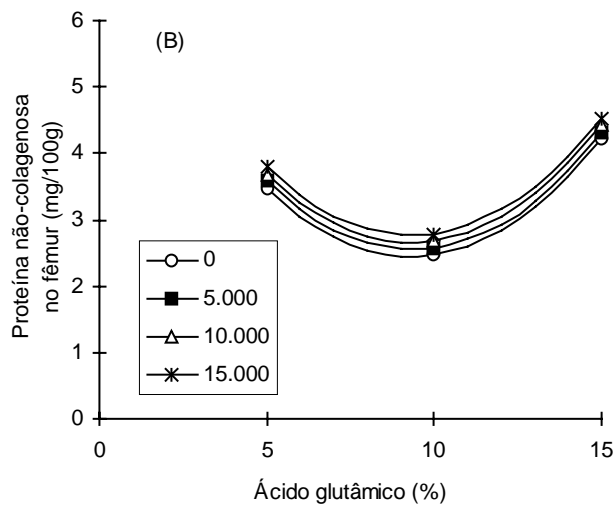
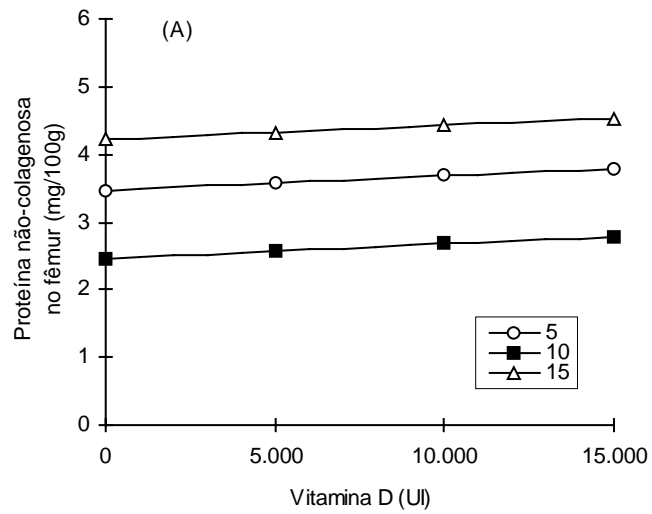


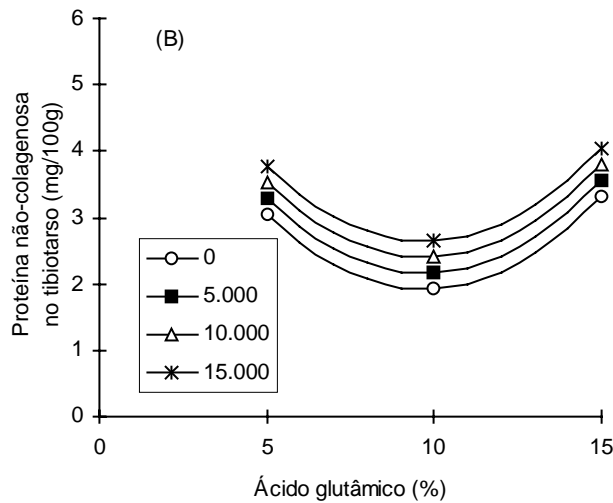
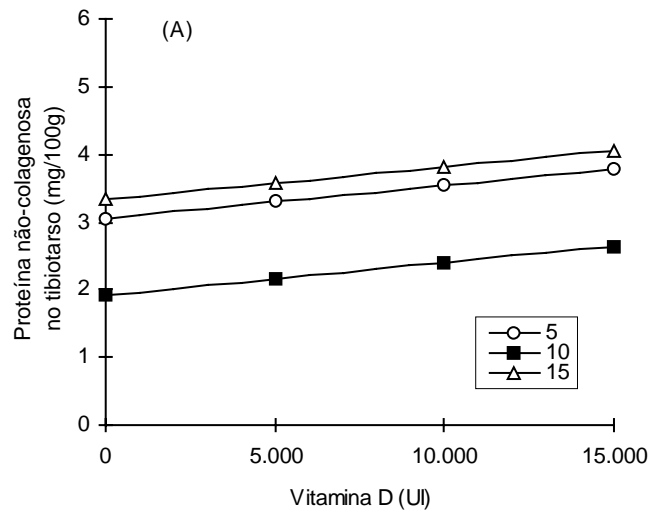
Figura 17B – Cortes na superfície de resposta das concentrações de proteínas colágenas no fêmur em função de níveis de vitamina D (A) e ácido glutâmico (B).



$$\hat{Y} = 7,2425 - 1,0304 **Glu + 0,05525 **Glu^2 + 0,00002117 **VD \quad R^2 = 0,87$$

** Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste t.

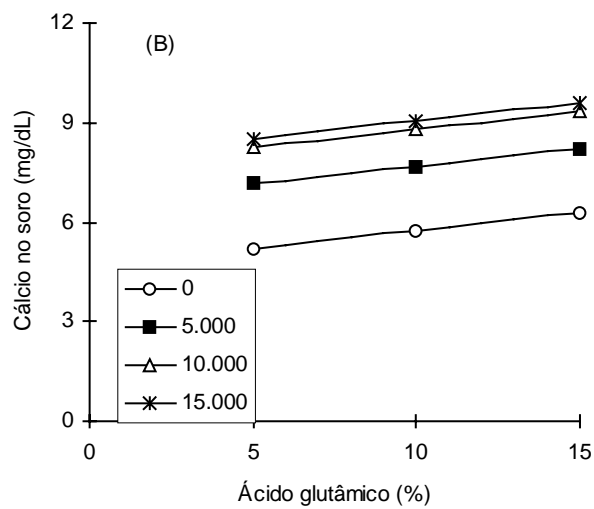
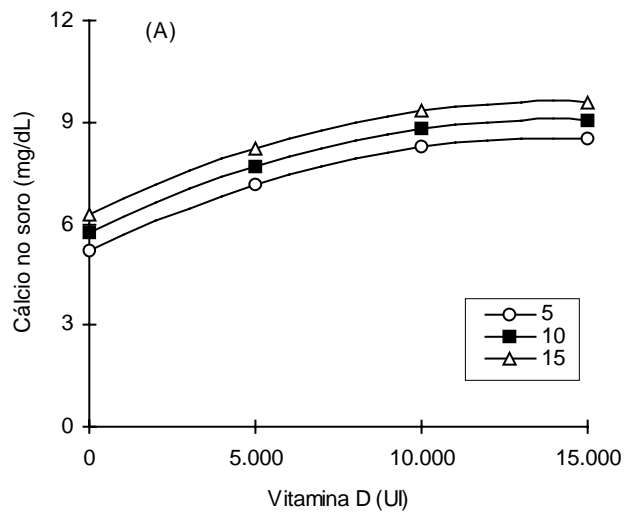
Figura 18B – Cortes na superfície de resposta das concentrações de proteínas não-colagenosas no fêmur em função de níveis de vitamina D (A) e ácido glutâmico (B).



$$\hat{Y} = 6,7408 - 0,9923 **Glu + 0,05099 **Glu^2 + 0,00004840 **VD \quad R^2 = 0,92$$

** Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste t.

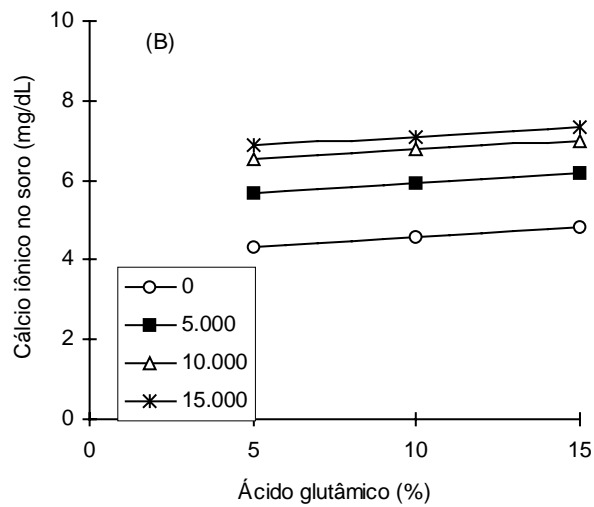
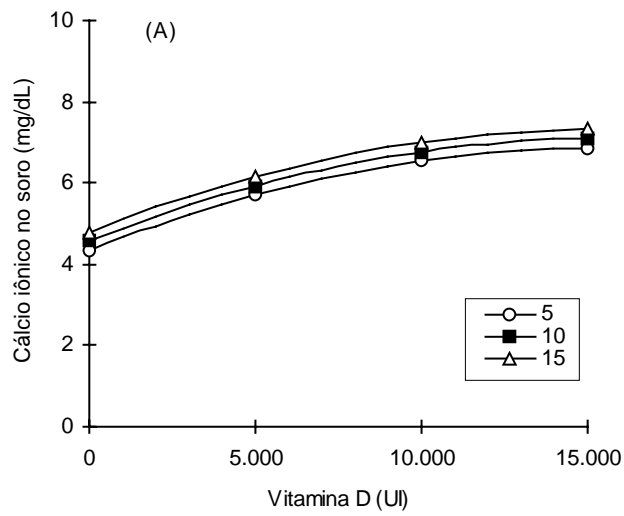
Figura 19B – Cortes na superfície de resposta das concentrações de proteínas não-colagenosas no tibiotalarso em função de níveis de vitamina D (A) e de ácido glutâmico (B).



$$\hat{Y} = 4,6765 + 0,1075 **Glu + 0,0004691 **VD - 0,00000001654 **VD^2 \quad R^2 = 0,82$$

** Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste t.

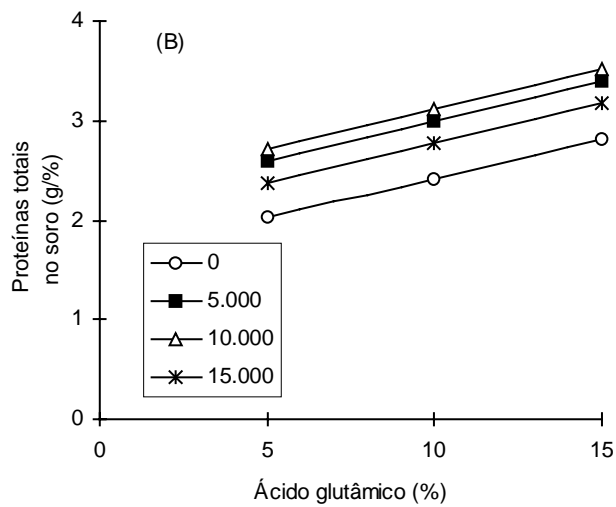
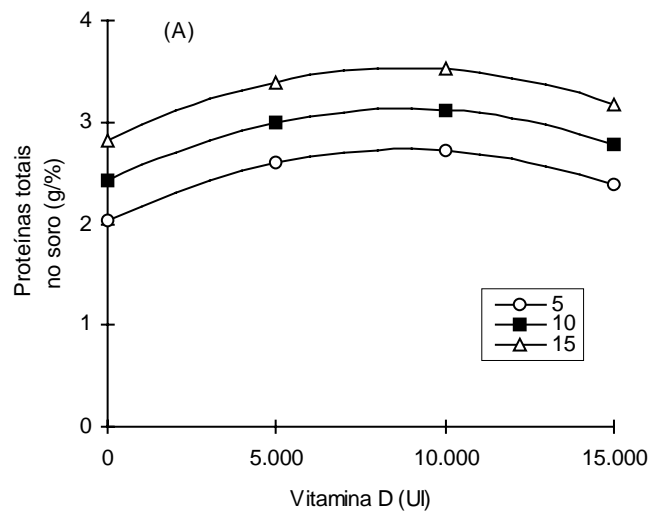
Figura 20B – Cortes na superfície de resposta das concentrações de cálcio no soro, em função de níveis de vitamina D (A) e ácido glutâmico (B).



$$\hat{Y} = 4,1165 + 0,04558 * Glu + 0,0003233 **VD - 0,00000001032 **VD^2 \quad R^2 = 0,79$$

** e * Significativos a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste t.

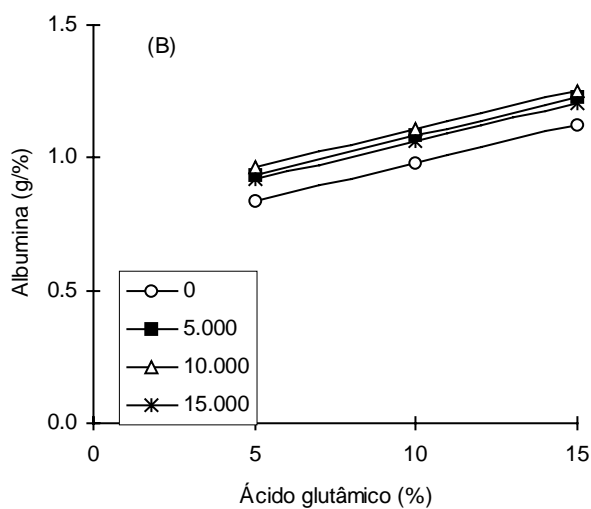
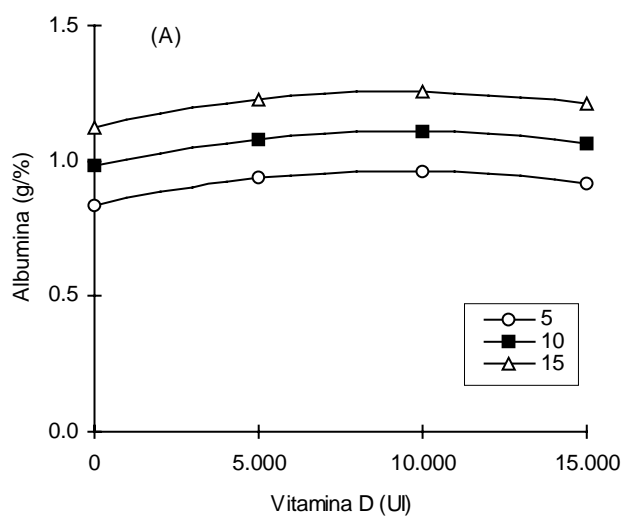
Figura 21B – Cortes na superfície de resposta das concentrações de cálcio iônico no soro, em função de níveis de vitamina D (A) e ácido glutâmico (B).



$$\hat{Y} = 1,6206 + 0,08008 **Glu + 0,0001609 **VD - 0,000000009133 **VD^2 \quad R^2 = 0,71$$

** Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste t.

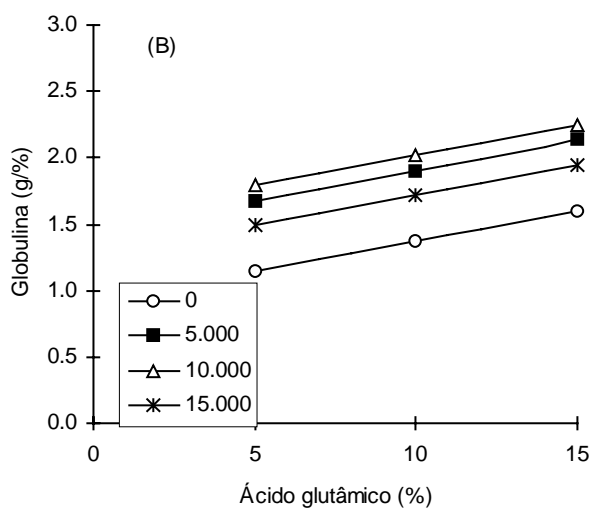
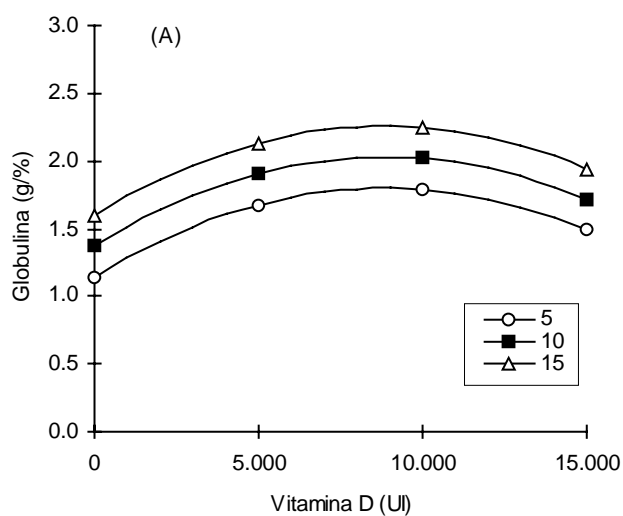
Figura 22B – Cortes na superfície de resposta das concentrações de proteínas totais no soro, em função de níveis de vitamina D (A) e ácido glutâmico (B).



$$\hat{Y} = 0,6904 + 0,02908 **Glu + 0,00002747 * VD - 0,000000001467 **VD^2 \quad R^2 = 0,55$$

** e * Significativos a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste t.

Figura 23B – Cortes na superfície de resposta da albumina no soro, em função de níveis de vitamina D (A) e ácido glutâmico (B).



$$\hat{Y} = 0,9160 + 0,04567 **Glu + 0,0001484 **VD - 0,000000008378 **VD^2 \quad R^2 = 0,62$$

** Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste t.

Figura 24B – Cortes na superfície de resposta da globulina no soro, em função de níveis de vitamina D (A) e ácido glutâmico (B).