

Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S. Paulo
9:107-34, 1972

CONSIDERAÇÕES SOBRE OS TEORES DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS EM BOVINOS ALIMENTADOS COM CONCENTRADOS §

Leonardo Miranda de ARAUJO *
Eduardo Harry BIRGEL **
Paulo de Carvalho PEREIRA ***
Carlos Eduardo REICHMANN ****

RFMVA-8

ARAUJO, L. M. et al. — *Consideração sobre os teores de enzimas proteolíticas em bovinos alimentados com concentrados.* Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S. Paulo, 9: 107-34, 1972.

RESUMO — *Estudou-se, durante o período de engorda (4 meses) em 24 bovinos jovens, machos inteiros da raça holandesa preto e branco, alimentados exclusivamente com concentrados, o comportamento dos teores de enzimas proteolíticas. Observou-se variação da atividade da tripsina, da quimotripsina e da amilase séricas, provavelmente devidas a um efeito específico de adaptação às condições alimentares.*

A atividade da tripsina sérica foi maior do que a da quimotripsina; por outro lado o comportamento da atividade enzimática da tripsina nas fezes e da quimotripsina sofreu ligeira queda durante a fase de engorda. Observaram-se pequenas oscilações nos diferentes grupos de incremento ponderal para as atividades da tripsina e da amilase séricas. Pelo método da digestão da gelatina, a tripsina do suco duodenal e das fezes, apresentou atividade enzimática total até a diluição de 1 : 40 e 1 : 1 respectivamente.

O suco duodenal dosado pelo método colorimétrico apresentou atividade triptica até a diluição 1:200.

Entre os animais e os diferentes grupos de incremento ponderal houve diferenças estatisticamente significantes para os valores da tripsina, quimotripsina e amilase séricas. Os valores médios em termos de desvio padrão da média foram: Tripsina sérica $1,37 \pm 0,066$ mU/ml; Tripsina nas fezes

$0,39 \pm 0,438$ mU/ml; Quimotripsina $1,23 \pm 0,064$ mU/ml; Amilase sérica $154,61 \pm 3,984$ unidades.

UNITERMOS: *Enzimas, proteolíticas *; Bovinos *; Alimentos, concentrados *.*

INTRODUÇÃO E LITERATURA

As enzimas pela sua importância fisiológica e fisiopatológica têm merecido a atenção de um grande número de pesquisadores dos mais variados setores do conhecimento biológico.

Modificações nos níveis normais das enzimas são atualmente de valor, não só para orientação do clínico em uma série de doenças, como também para o reconhecimento de certos desvios metabólicos.

A maioria das enzimas intracelulares, cuja determinação é de grande valor no diagnóstico clínico, pertencem a um sistema básico metabólico e estão sempre presentes em todas as células do organismo. Os diversos órgãos contêm estas enzimas em diferentes concentrações de acordo com suas funções específicas.

Não somente a atividade enzimática varia de órgão para órgão, como também a variação quantitativa individual varia de um órgão a outro.

§ O presente trabalho recebeu auxílio da FAPESP.

* Prof. Assistente Doutor.

** Prof. Assistente Doutor.

*** Prof. Livre Docente.

**** Prof. Assistente.

Departamento de Patologia e Clínica Médicas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP.

O nosso interesse em estudar os teores de algumas das enzimas pancreáticas em ruminantes, além de ser baseado na dificuldade encontrada em realizarmos satisfatoriamente o exame deste órgão, dando-nos uma idéia do seu estado funcional, tem como escopo, por um lado, estabelecer os teores normais destes enzimas e sua ação na digestão entérica de ruminantes e por outro lado, trazer uma contribuição à patologia veterinária, isto levando em consideração que a maioria das afecções que acometem estes animais são quase que exclusivamente devidas a distúrbios digestivos, principalmente dos ruminantes jovens, constituindo um sério problema na criação desta espécie animal, sendo produzidas ora por infecções e infestações, ora por alterações funcionais digestivas, muitas vezes relacionadas à digestão enzimática de alimentos inadequados.

Assim fazendo, poderemos comparar os resultados obtidos nos animais enfermos com aqueles considerados padrões para a espécie, dando uma orientação segura em certos estados mórbidos e assim contar com mais um elemento que facilitará nossos diagnósticos orientando a terapêutica a ser empregada.

Em virtude das possíveis modificações metabólicas que possam ocorrer durante o desenvolvimento do animal, procuramos analisar, neste trabalho, o comportamento das seguintes enzimas: tripsina, quimotripsina e amilase.

No que diz respeito às enzimas estudadas no presente trabalho, há na literatura, série grande de pesquisas relativas à espécie humana; assim é que, HATFALUDI et al.¹⁸ (1966), estudam os efeitos da uréia e do íon cálcio sobre a amilase pancreática. HIRSCH MARIE et al.¹⁹ (1965), fazem um estudo eletro e imunoletroforético das enzimas proteolíticas do suco gástrico normal e patológico. KALSER et al.^{22, 23} (1955, 1960), salientam um inibidor triptico do suco pancreático e fazem um estudo comparativo do quimotripsinogênio alfa e beta; MEYER et al.³⁵ (1948), fazem um estudo pormenorizado da alfa amilase da saliva humana; NARDI³⁷ (1958), determina os

teores séricos de tripsina em afecções pancreáticas; NEURATH & SCHEWERT³⁸ (1950), estudam o mecanismo de ação das enzimas proteolíticas pancreáticas; SHULMAN⁴⁴ (1955), resalta o encontro no plasma e urina humana de um inibidor proteolítico com ação anticoagulante; SZCZEKLIK⁴⁶ (1969) estuda no soro a atividade triptica, assim como, a separação das frações enzimáticas através a electroforese.

Em medicina veterinária têm sido realizados vários estudos sobre as enzimas pancreáticas, através o uso de extrato de pâncreas bovino. Até há pouco tempo todos os conhecimentos relativos às proteases pancreáticas eram baseados em experimentos realizados com enzimas pancreática de bovinos.

Mais recentemente as enzimas proteolíticas de várias espécies animais foram estudadas por ABDELJLIL et al.¹ (1963); GROSSBERG et al.¹⁶ (1952); MARCHIS MOUREN et al.^{32, 33} (1965, 1963); RYAN & TOMIMATSU⁴³ (1965).

Todavia, salienta-se de início, a reduzida literatura existente não só quanto ao objetivo proposto, como também, no que tange à espécie animal referida, na tentativa de estabelecer os teores normais, principalmente no que diz respeito ao tipo de regime alimentar, muito embora seja extensa a bibliografia sobre as pesquisas efetuadas em outras espécies animais quando submetidos a inúmeras e diferentes condições, quer normais, quer patológicas, através os trabalhos de ABDELJLIL e DESNUELLE² (1963), que ressaltam a adaptação das enzimas exócrinas do pâncreas em relação a composição da dieta alimentar; BRICTEUX et al.⁴ (1966), descrevem a estrutura dos peptídeos liberados pela ação do tripsinogênio de caprinos; CROSTON⁷ (1955), faz a separação por cromatografia das endopeptidases de salmão; KELLER & ALLAN²⁴ (1967), fazem um estudo completo sobre a composição do suco pancreático humano; LOEB & EDGE³¹ (1962), determinam a amilase sérica em cães; REBOUD et al.³⁹ (1964), determinam as variações enzimáticas do pâncreas de rato em função da composição alimentar.

Estudos sistemáticos sobre a variação dos inibidores da tripsina foram realizados por GREENE et al.¹⁵ (1966), no suco pancreático bovino; GROSSMAN¹⁷ (1958), KALSER & GROSSMAN²² (1955), no suco pancreático humano; LASKOWSKI et al.^{27, 28} (1951, 1954), no colostro; LASKOWSKI & W²⁹ (1953), no plasma; LASKOWSKI et al.³⁰ (1952), no pâncreas.

Pela análise da literatura especializada, podemos citar os trabalhos de autores que se dedicaram ao estudo das enzimas de bovinos, assim é que FIGARELLA & DESNUELLE⁹ (1962), fizeram um estudo comparativo do equipamento enzimático de pâncreas humano e de diversas outras espécies animais, incluindo a bovina; HUBER et al.²⁰ (1961), ressaltaram a atividade de enzimas digestivas em bezerros, sem contudo fornecerem elementos necessários ao estabelecimento dos teores normais; KELLER & ALLAN²¹ (1967), estudaram as proteínas do suco pancreático de bovinos; KOLB²⁶ (1965), estudou a influência da alimentação sobre a secreção pancreática de bovinos; MARCHIS-MOUREN et al.³⁴ (1961), salientaram as diferenças observadas na composição enzimática do suco pancreático de bovinos, porcos, ratos e cães; ROVERY et al.⁴² (1953), fizeram um estudo sobre a ativação do quimotripsinogênio e do tripsinogênio de bovinos; WALSH et al.⁴⁷ (1964), determinaram a estrutura e a função do tripsinogênio e da tripsina de bovinos; YAMASHINA⁴⁸ (1956), estudou em bovinos a ativação do tripsinogênio, usando preparações puras de enteroquinase do suco duodenal.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais utilizados

Empregamos no presente estudo, 24 bovinos machos não castrados da raça holandesa preto e branco, com idade compreendida entre 5 e 7 meses e com um peso médio de 202 kg (172 a 250 kg). No final do experimento foram constituídos 3 grupos formados de 6, 7 e 11 animais, com um incremento ponderal de até 100 kg (I grupo)

de 100 a 130 kg (II grupo) e de 130 a 165 kg (III grupo).

Os animais tinham assistência veterinária permanente, sendo considerados clinicamente sadios dentro das garantias que o exame clínico oferece. Eram alimentados "ad libitum" com ração concentrada e ensilado da planta de milho à maturação vítrea. Este tipo de alimentação foi empregado durante todo o ciclo produtivo. A ração concentrada e o ensilado eram distribuídos ao animal uma vez ao dia a razão de cerca de 7 kg e 4 kg "per capita", respectivamente.

2. Coleta do material e tratamento subsequente

Para as dosagens da tripsina, quimotripsina e amilase séricas, a coleta do sangue foi feita por punctura da veia jugular e, para a tripsina fecal, as fezes foram colhidas no reto. As coletas destes materiais, foram realizadas sempre no período da manhã, com intervalos bissemanais, até o término do ciclo produtivo, compreendendo 5 coletas por animal.

Para a dosagem da tripsina duodenal, o material foi colhido no duodeno após o abate dos animais. O soro e as fezes foram conservadas em refrigeradores até o instante de proceder a realização das provas, que foram efetuadas sempre no mesmo dia da coleta.

3. Dosagem das enzimas

Os métodos empregados no decorrer do experimento para as dosagens das enzimas foram:

a) Método da digestão da gelatina preconizado por GATES¹⁰ (1926/7), recomendado por COLES⁵ (1967); CORNELIUS & KANEKO⁶ (1963) e JASPER²¹ (1954), para as tripsinas das fezes e do suco duodenal.

b) Método de BIETH et al.³ (1966), utilizando os reativos da Biochemia Test Combination (Boehringer-Biochemia) sendo as leituras realizadas em espectrofotômetro Beckman mod. D.U. para a tripsina sérica e do suco duodenal.

c) Método eletrométrico de NAGEL et al.³⁶ (1965), utilizando os reativos da Biochemia Test Combination (Boehringer-Biochemia) para a quimotripsina.

d) Método de GEACHIN et al.¹¹ (1957), recomendado por RICE⁴¹ (1959), utilizando o teste colorimétrico "SCLAVO" para a amilase sérica.

4. Análise estatística

Foram calculadas medidas estatísticas de posição e variabilidade para todas as provas em cada lote experimental. As verificações da influência dos diferentes grupos de incremento ponderal, entre os animais em cada grupo e, entre os animais nas sucessi-

vas dosagens, foram inicialmente testadas pelo análise de variância de acordo com SNEDECOR¹⁵ (1956). Neste experimento foram considerados como tratamentos os diferentes grupos de incremento ponderal e como blocos, os resultados médios obtidos nas dosagens efetuadas em cada um dos animais pertencentes aos diferentes grupos de incremento ponderal. Para a análise da variância de todos os resultados obtidos o nível de rejeição adotado foi sempre de 1%.

R E S U L T A D O S

Os resultados obtidos nas diferentes provas realizadas encontram-se consubstanciados nas tabelas e gráficos que se seguem.

T A B E L A I

Incremento ponderal de bovinos de 5 a 7 meses de idade, alimentados com ração de concentrados

Número do Animal	Peso inicial em Kg	Peso final em Kg	Incremento Ponderal total em Kg	Incremento Ponderal diário em g
388	250	325	75	0,83
395	205	283	78	0,86
303	187	275	88	0,97
377	179	270	91	1,01
393	191	285	94	1,04
302	200	298	98	1,08
383	190	296	106	1,17
384	196	310	114	1,26
392	210	328	118	1,31
387	195	315	120	1,33
336	188	311	123	1,36
304	172	295	123	1,36
400	222	350	228	1,42
381	226	367	131	1,45
378	200	334	134	1,48
398	190	327	137	1,52
379	206	344	138	1,53
391	200	339	139	1,54
394	220	359	139	1,54
385	184	327	143	1,58
399	190	334	144	1,60
397	219	371	152	1,68
380	201	355	154	1,71
396	230	395	165	1,83
Média	202,12	324,70	126,33	1,35

TABELA II

Características estatísticas referentes ao incremento ponderal de bovinos de 5 a 7 meses de idade, alimentados com ração de concentrados.

Grupo de incremento ponderal		Peso médio inicial	Peso médio final	Incremento Diário	Incremento Total
I) Grupo 0 — 100 Kg	n S.E. S.D. c.v.	6 202,00 ± 10,315 ± 25,2665 12,508%	6 289,33 ± 8,135 ± 19,9265 6,887%	6 0,96 ± 0,040 ± 0,10019 10,382%	6 87,33 ± 3,702 ± 9,0701 10,385%
II) Grupo 100 — 130 Kg	n S.E. S.D. c.v.	7 196,14 ± 6,072 ± 16,0668 8,191%	7 315,00 ± 7,231 ± 19,1311 6,073%	7 1,315 ± 0,030 ± 0,08099 6,158%	7 118,85 ± 2,711 ± 7,1747 6,036%
III) Grupo 130 — 165 Kg	n S.E. S.D. c.v.	11 206,00 ± 4,703 ± 15,6012 7,573%	11 350,18 ± 6,458 ± 21,4187 6,116%	11 1,587 ± 0,033 ± 0,11202 7,058%	11 143,27 ± 3,021 ± 10,0209 6,994%
TOTAL	n S.E. S.D. c.v.	24 202,12 ± 3,708 ± 18,1666 8,988%	24 324,70 ± 6,604 ± 32,3533 9,964%	24 1,352 ± 0,055 ± 0,2743 20,288%	24 122,16 ± 5,032 ± 24,6553 20,181%

TABELA III

Valores de tripsina sérica ($m\mu$ / ml) dos diversos grupos de bovinos do sexo masculino, de 5 a 7 meses de idade. Resultados obtidos nas dosagens realizadas com intervalo de 15 dias

Grupo de incremento	Amostras					Média do Grupo
	I	II	III	IV	V	
I 0 — 100 Kg	2,8	1,2	1,6	1,4	1,6	
	1,2	0,8	1,2	1,0	1,6	
	0,8	1,2	0,6	0,6	1,2	
	1,2	1,2	1,4	1,4	1,6	
	2,8	2,8	3,6	2,4	2,4	
	0,8	0,8	0,8	1,2	1,4	
Média	1,60	1,33	1,53	1,33	1,63	1,48
II 100 — 130 Kg	2,8	1,2	1,8	1,6	1,8	
	0,4	0,4	1,2	0,4	0,8	
	0,4	0,4	0,6	0,6	0,8	
	2,8	1,2	1,4	2,2	1,6	
	1,2	0,4	1,4	0,6	1,2	
	0,8	0,8	1,4	1,6	1,6	
0,4	0,8	0,8	1,0	0,8		
Média	1,25	0,74	1,22	1,14	1,22	1,12
III 130 — 165 Kg	1,2	2,8	2,0	1,6	1,2	
	0,8	0,8	0,6	0,8	0,4	
	0,8	1,2	1,2	1,4	1,6	
	1,2	0,8	1,8	1,2	1,6	
	0,8	0,4	0,6	0,8	1,2	
	1,2	2,8	2,4	3,0	2,0	
	0,8	1,2	2,4	2,2	2,0	
	0,8	1,2	2,4	2,2	1,8	
	0,8	1,2	2,8	2,2	2,4	
	1,6	3,2	1,2	2,0	2,4	
0,8	1,4	0,8	1,2	1,6		
Média	0,98	1,54	1,65	1,69	1,65	1,50
Média Geral	1,21	1,25	1,50	1,44	1,52	1,37
S.D.	0,777	0,811	0,782	0,680	0,520	0,728
S.E.	0,158	0,165	0,159	0,140	0,106	0,066
c.v. %	64,21	64,88	52,13	47,22	34,21	53,13

Análise da variância referente a Tabela III

Causas de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	S	F
Tratamentos	2	3,56	1,780	1,330	7,206+
Blocos	21	34,66	1,650	1,280	6,680+
Resíduo	96	23,73	0,247	0,490	
Total	119	61,95	—	—	

T A B E L A I V

Valores de tripsina das fezes ($m\mu$ / ml) dos diversos grupos de bovinos do sexo masculino, de 5 a 7 meses de idade. Resultados obtidos nas dosagens realizadas com intervalos de 15 dias

Grupo de incremento	I	II	III	IV	V	Média do Grupo
I 0 — 100 Kg	3,2	12,1	8,1	2,8	9,0	
	21,4	16,2	14,2	14,4	12,0	
	16,2	8,1	4,1	4,2	8,6	
	16,2	3,2	3,4	3,2	4,6	
	12,1	16,1	4,6	4,6	3,4	
	16,2	4,6	3,2	4,2	8,1	
Média	14,21	10,05	6,26	5,56	7,61	8,74
II 100 — 130 Kg	24,2	12,1	16,4	8,6	12,1	
	16,2	12,0	14,4	4,6	8,6	
	8,1	8,1	4,0	4,0	4,0	
	24,2	8,1	4,6	10,2	8,1	
	8,1	8,1	8,1	3,6	4,6	
	8,6	8,1	8,1	8,1	8,1	
	8,6	3,2	3,2	2,2	2,0	
	Média	14,00	8,52	8,40	5,90	6,78
III 130 — 165 Kg	16,0	8,1	8,1	4,6	3,6	
	8,1	8,1	4,0	4,0	2,0	
	16,2	12,1	8,1	8,2	8,6	
	4,1	8,1	2,0	4,6	3,2	
	12,1	8,1	8,1	8,6	8,6	
	16,0	8,1	4,6	8,1	4,1	
	4,6	8,1	4,1	2,8	2,6	
	8,1	12,1	8,1	10,2	9,6	
	16,1	8,1	4,2	2,0	2,0	
	16,2	8,1	16,2	12,1	8,1	
	8,6	4,6	4,0	8,1	8,6	
	Média	11,46	8,50	6,50	6,65	5,54
Média Geral	12,89	8,90	6,99	6,16	6,42	8,39
S.D.	5,940	3,400	4,290	3,375	3,187	4,804
S.E.	1,212	0,694	0,875	0,688	0,650	0,438
c.v. %	46,08	38,20	61,37	54,79	49,65	57,25

Análise da variância referente a Tabela IV

Causas de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	S	F
Tratamentos	2	29,65	14,825	3,850	0,853
Blocos	21	1.050,40	50,019	7,070	2,881+
Resíduo	96	1.666,73	17,361	4,160	
TOTAL	119	2.746,78	—	—	—

TABELA V

Valores de quilmotripsina sérica ($m\mu$ / ml) dos diversos grupos de bovinos do sexo masculino, de 5 a 7 meses de idade. Resultados obtidos nas dosagens realizadas com intervalos de 15 dias

Grupo de incremento	Amostras					Média do Grupo		
	I	II	III	IV	V			
I 0 — 100 Kg	0,6	1,6	0,8	1,2	1,0			
	1,2	0,8	3,2	3,6	2,8			
	0,4	0,4	0,6	0,8	1,2			
	0,8	0,8	1,2	0,8	1,2			
	0,8	0,8	0,8	1,2	1,6			
	3,2	1,8	1,6	3,2	2,8			
Média	1,17	1,03	1,37	1,80	1,77	1,43		
II 100 — 130 Kg	0,8	1,6	1,2	1,2	2,0	0,8		
	0,8	0,4	0,8	0,8	1,2			
	0,8	0,8	0,8	0,8	1,2			
	3,2	1,8	1,2	3,6	1,8			
	0,8	0,4	0,8	0,8	1,2			
	1,8	2,8	0,8	0,8	1,2			
	2,0	1,6	0,8	1,2	1,6			
	Média	1,45	1,34	0,91	1,31		1,45	1,30
III 130 — 165 Kg	0,8	0,6	0,8	0,6	0,8			
	0,8	0,8	0,8	0,8	1,2			
	0,8	0,6	0,8	0,8	1,6			
	0,8	0,8	0,6	0,8	0,6			
	2,8	1,2	0,8	1,8	1,6			
	0,8	0,8	0,6	1,0	0,8			
	0,4	0,8	1,0	0,8	0,8			
	0,4	0,4	0,8	0,6	0,6			
	1,2	1,6	1,0	1,0	1,6			
	1,6	0,6	1,6	0,8	1,2			
	1,2	0,8	0,8	1,2	1,6			
	Média	1,05	0,81	0,87	0,93		1,12	0,96
	Média geral	1,20	1,02	1,00	1,26		1,38	1,23
S.D.	0,827	0,599	0,538	0,893	0,569	0,703		
S.E.	0,168	0,122	0,110	0,182	0,116	0,064		
c.v. %	68,97	59,96	53,89	70,96	41,28	57,15		

Análise da variância referente a Tabela V

Causas de variação	G.L	S.Q	Q.M	S	F
Tratamentos	2	4,96	2,480	1,570	9,575+
Blocos	21	29,10	1,385	1,170	5,347+
Resíduo	96	24,91	0,259	0,508	
TOTAL	119	58,97	—	—	—

TABELA VI

Valores de amilase sérica (unidades) dos diversos grupos de bovinos do sexo masculino, de 5 a 7 meses de idade. Resultados obtidos nas dosagens realizadas com intervalos de 15 dias

Grupo de incremento	Amostras					Média do Grupo
	I	II	III	IV	V	
I 0 — 100 Kg	137,5	125,0	200,0	232,0	200,0	
	187,5	162,5	162,5	232,0	187,5	
	162,5	125,0	137,5	150,0	175,0	
	175,0	200,0	162,5	175,0	187,5	
	175,0	87,5	187,5	125,0	137,5	
	75,0	162,5	137,5	125,0	137,5	
Média	152,08	143,75	170,83	173,16	164,58	160,88
II 100 — 130 Kg	162,5	175,0	112,5	162,5	200,0	
	233,5	227,0	187,5	137,5	162,5	
	187,5	112,5	175,0	137,5	137,5	
	112,5	137,5	100,0	118,5	125,0	
	100,0	112,5	137,5	137,5	125,0	
	232,0	125,0	232,0	284,0	232,0	
112,5	75,0	87,5	100,0	100,0		
Média	162,92	137,78	147,42	153,92	154,57	151,32
III 130 — 165 Kg	200,0	175,0	200,0	232,0	200,0	
	137,5	175,0	200,0	137,5	175,0	
	100,0	75,0	137,5	112,5	162,5	
	162,5	137,5	187,5	112,5	232,0	
	175,0	100,0	200,0	175,0	175,0	
	125,0	100,0	125,0	137,5	232,0	
	125,0	175,0	162,5	200,0	175,0	
	137,5	75,0	187,5	162,5	137,5	
	87,5	162,5	87,5	125,0	125,0	
	232,0	112,5	200,0	175,0	137,5	
100,0	87,5	125,0	112,5	135,5		
Média	143,81	125,00	164,77	152,90	171,72	151,64
Média Geral	151,45	133,41	159,66	158,27	166,50	154,61
S. D.	46,432	42,164	40,267	47,338	37,344	43,643
S. E.	9,478	8,606	8,219	9,662	7,622	3,984
c. v. %	30,65	31,60	25,22	29,90	22,42	28,22

Análise da variância referente a Tabela VI

Causas de variação	G.L	S.Q	Q.M	s	F
Tratamentos	2	16.806,73	8.403,36	91.600	7,088+
Blocos	21	96.053,56	4.573,97	67.600	3,858+
Resíduo	96	113.808,70	1.185,50	34.400	
TOTAL	119	226.668,99	—	—	—

T A B E L A V I I
Resumo dos valores obtidos para tripsina, quimotripsina e amilase em bovinos do sexo masculino, de 5 a 7 meses de idade. Resultados obtidos nas dosagens com intervalos bissemanais — Características estatísticas.

Amostras	Tripsina Sérica m μ / ml				Tripsina nas Fezes mu / ml				Quimotripsina sérica m μ / ml				Amilase Sérica unidades			
	Média	S.D.	S.E.	c.v. %	Média	S.D.	S.E.	c.v. %	Média	S.D.	S.E.	c.v. %	Média	S.D.	S.E.	c.v. %
I	1,21	0,77	0,15	64,21	12,89	5,94	1,21	46,08	1,20	0,82	0,16	68,97	151,45	46,43	9,47	30,65
II	1,25	0,81	0,16	64,88	8,90	3,40	0,69	38,20	1,02	0,59	0,12	59,96	133,41	42,16	8,60	31,60
III	1,50	0,78	0,15	52,13	6,99	4,29	0,87	61,37	1,00	0,53	0,11	53,89	159,66	40,26	8,21	25,22
IV	1,44	0,68	0,14	47,22	6,16	3,37	0,68	54,79	1,26	0,89	0,18	70,96	158,27	47,33	9,66	29,90
V	1,52	0,52	0,10	34,21	6,42	3,18	0,65	49,65	1,38	0,56	0,11	41,28	166,50	37,34	7,62	22,42
Média geral	1,37	0,72	0,06	53,13	8,39	4,30	0,43	57,25	1,23	0,70	0,06	57,15	154,61	43,64	3,98	28,22

TABELA VIII

Resumo dos valores obtidos para tripsina, quimotripsina e amilase sérica em bovinos do sexo masculino, de 5 a 7 meses de idade. Resultados obtidos nas dosagens dos grupos de incremento ponderal. — Características estatísticas.

Grupo de incremento	Tripsina Sérica m μ / ml				Tripsina nas Fezes m μ / ml				Quimotripsina sérica m μ / ml				Amilase Sérica unidades			
	Média	S.D.	S.E.	c.v. %	Média	S.D.	1,00	c.v. %	Média	S.D.	S.E.	c.v. %	Média	S.D.	S.E.	c.v. %
I	1,48	0,74	0,13	50,52	8,74	5,31	1,00	63,02	1,43	0,97	0,17	68,52	160,88	36,72	6,70	22,82
II	1,12	0,64	0,10	57,49	8,72	4,03	0,89	60,90	1,30	0,73	0,12	56,51	151,32	50,98	8,61	33,69
III	1,50	0,72	0,09	48,05	7,73	4,95	0,54	52,16	0,96	0,43	0,05	44,90	151,64	42,42	5,72	27,98
Média Geral	1,36	0,70	0,10	52,02	8,43	1,00	0,81	58,69	1,23	0,71	0,11	56,64	154,61	43,37	7,01	28,16

TABELA IX

Atividade triptica das fezes usadas em diferentes diluições verificada pelo método da gelatina em bovinos de 5 a 7 meses de idade, alimentados com ração concentrada de acordo com os grupos de incremento ponderal.

Grupos de Incremento	Amostras		Diluição das fezes														
	1 : 1					1 : 2					1 : 3						
	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V		
I 0 — 100 kg	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	S	S	S	S	S		
	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	S	S	S		
	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	S	S	S	S	S		
	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	S	S	S	S	S		
	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	S	S	S	S	S		
	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	S	S	S	S	S		
II 100 — 130 kg	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	S		
	L	L	L	L	L	L	L	L	S	S	S	S	S	S	S		
	L	L	L	L	L	L	L	L	S	S	S	S	S	S	S		
	L	L	L	L	L	L	L	L	S	S	L	S	S	S	S		
	L	L	L	L	L	L	L	L	S	S	S	S	S	S	S		
	L	L	L	L	L	L	L	L	S	S	S	S	S	S	S		
III 130 — 165 kg	L	L	L	L	L	L	L	S	S	S	S	S	S	S	S		
	L	L	L	L	L	L	S	S	S	S	S	S	S	S	S		
	L	L	L	L	L	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S		
	L	L	L	L	L	L	S	S	S	S	S	S	S	S	S		
	L	L	L	L	L	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S		
	L	L	L	L	L	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S		
	L	L	L	L	L	L	L	L	S	S	L	L	S	S	S		
	L	L	L	L	L	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S		
	L	L	L	L	L	L	S	S	S	S	L	L	S	S	S		
	L	L	L	L	L	S	S	S	S	S	L	S	S	S	S		

S = solidificação da mistura — ausência de tripsina.

L = mistura permanece líquida — presença de tripsina.

TABELA X

Atividade triptica do suco duodenal usado em diferentes diluições detectada pelo método da gelatina, verificada em bovinos do sexo masculino de 5 a 7 meses de idade. Resultados obtidos nos grupos de incremento ponderal.

Grupo de incremento	Amostras	Diluição do suco duodenal					
		1 : 10	1 : 20	1 : 40	1 : 80	1 : 160	1 : 320
I 0 — 100 Kg		L	L	L	±L	S	S
		L	L	L	L	±L	S
		L	L	L	L	L	S
		L	L	L	±L	S	S
		L	L	L	S	S	S
		L	L	L	L	S	S
II 100 — 130 Kg		L	L	L	±L	S	S
		L	L	L	L	L	S
		L	L	L	S	S	S
		L	L	L	L	S	S
		L	L	L	S	S	S
		L	L	L	L	S	S
III 130 — 165 Kg		L	L	L	L	L	S
		L	L	L	S	S	S
		L	L	L	L	S	S
		L	L	L	S	S	S
		L	L	L	L	S	S
		L	L	L	S	S	S
		L	L	L	L	L	S
		L	L	L	S	S	S
		L	L	L	L	S	S

S = solidificação da mistura — ausência de tripsina.

L = mistura permanece líquida — presença de tripsina.

ARAÚJO, L. M. et al. — Consideração sobre os teores de enzimas proteolíticas em bovinos alimentados com concentrados. *Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, 9:107-34, 1972.

TABELA XI

Valores de tripsina ($m\mu$ / ml) para o suco duodenal de bovinos do sexo masculino de 5 a 7 meses de idade, usado nas diluições 1 : 20 e 1 : 200.

Grupo de incremento \ Amostras	Diluição do suco duodenal		Média do grupo
	1 : 20	1 : 200	
I 0 — 100 Kg	20,2	4,0	
	12,1	2,0	
	32,3	6,5	
	28,3	3,2	
	16,2	5,7	
	36,4	7,3	
	Média	24,25	
II 100 — 130 Kg	24,2	3,6	
	28,3	3,2	
	24,2	3,8	
	16,2	3,1	
	12,1	2,4	
	20,2	2,8	
	32,3	6,5	
Média	22,50	3,62	13,06
III 130 — 165 Kg	40,4	4,8	
	40,4	4,0	
	4,1	0,9	
	18,2	1,2	
	28,3	3,2	
	16,2	4,8	
	5,7	1,2	
	4,1	0,9	
	40,4	4,1	
	4,0	1,6	
	18,2	1,2	
Média	20,00	2,53	11,26
Média Geral	21,79	3,42	12,94
S.D.	11,657	1,851	12,420
S.E.	2,379	0,377	2,066
c.v. %	53,79	54,12	95,98

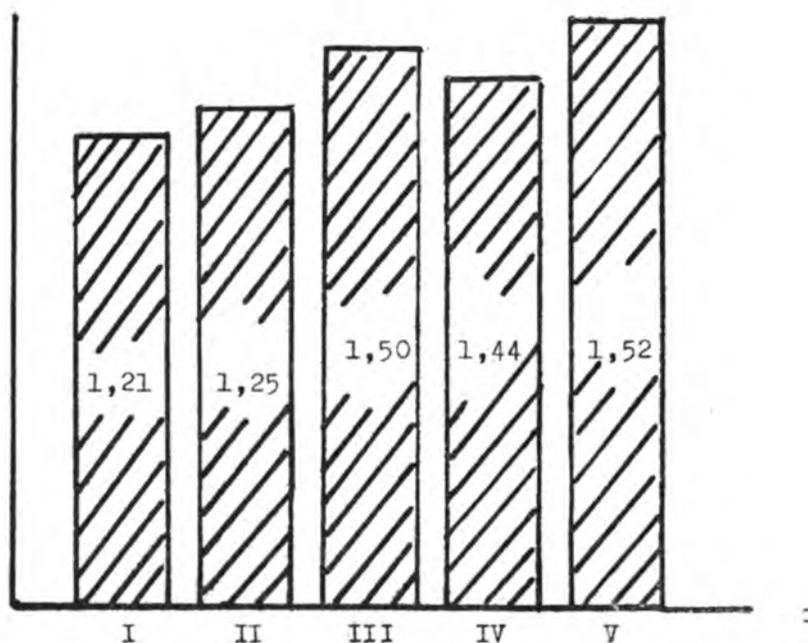


Figura 1 — Representação gráfica dos valores médios de tripsina verificados no soro de bovinos de 5 a 7 meses de idade (expressos em mU/ml). Doseamentos praticados com intervalos de 15 dias.

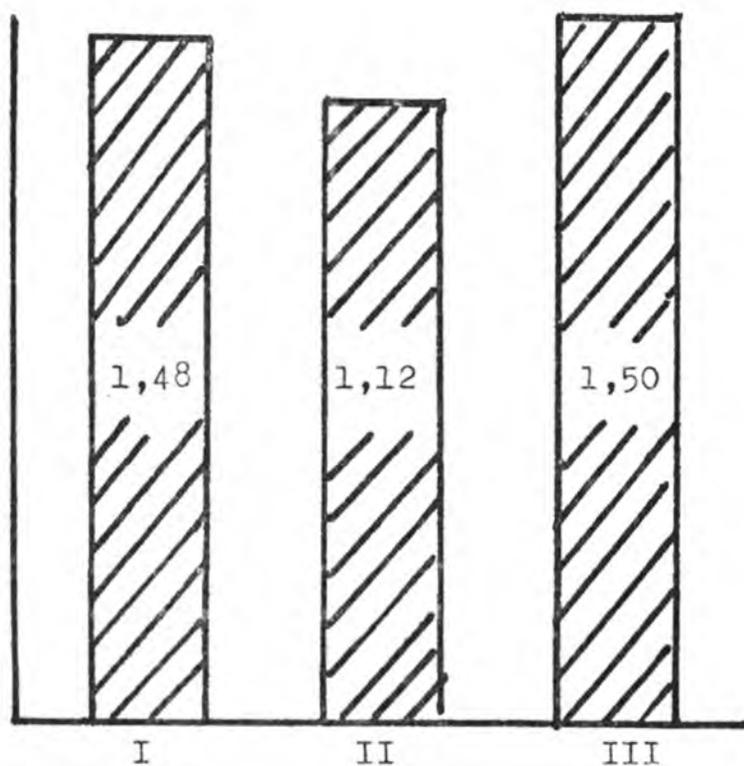


Figura 2 — Tripsina no soro de bovinos de 5 a 7 meses de idade nos diferentes grupos de incremento ponderal. Gráfico obtido com os valores médios (expressos em mU/ml) registrados na tabela VIII.

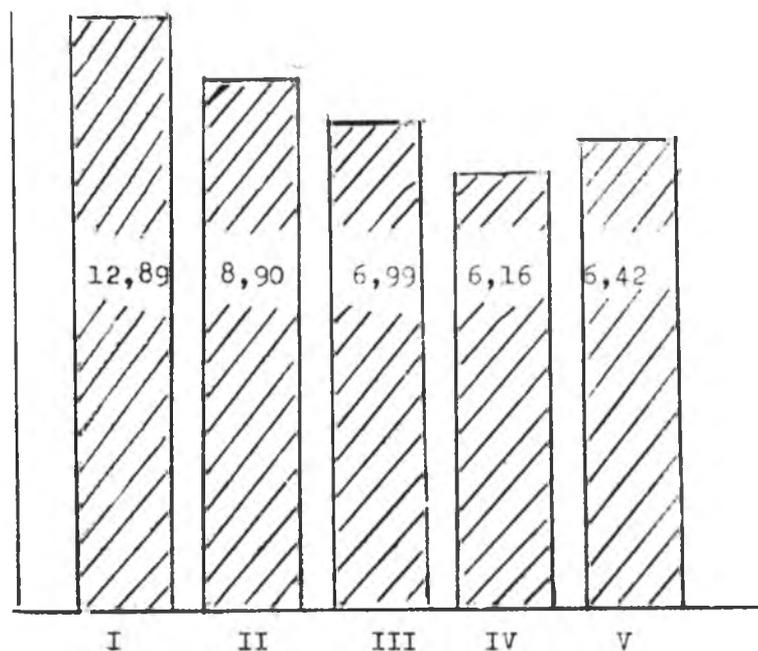


Figura III — Representação gráfica dos valores médios de tripsina verificados nas fezes de bovinos de 5 a 7 meses de idade (expressos em mU/ml). Doseamentos praticados com intervalos de 15 dias.

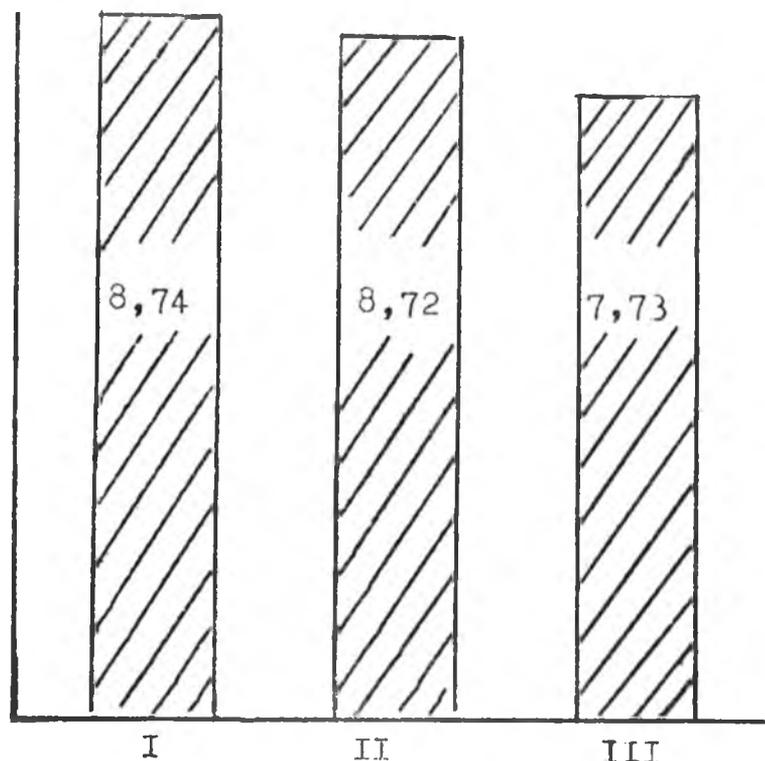


Figura IV — Tripsina nas fezes de bovinos de 5 a 7 meses de idade nos diferentes grupos de incremento ponderal. Gráfico obtido com os valores médios (expressos em mU/ml) registrados na tabela VIII

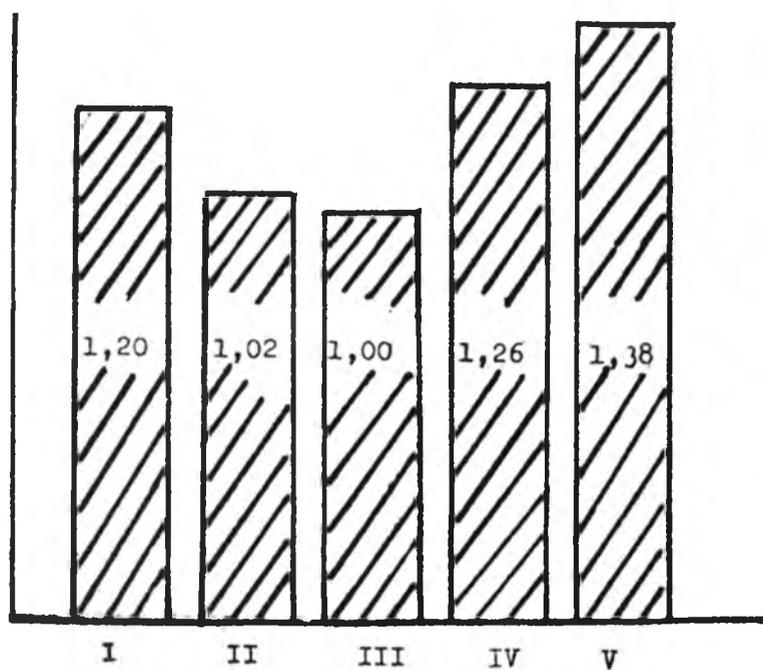


Fig. V — Representação gráfica dos valores de quimotripsina verificados no soro de bovinos de 5 a 7 meses de idade (expressos em mU/ml). Doseamentos praticados com intervalos de 15 dias.

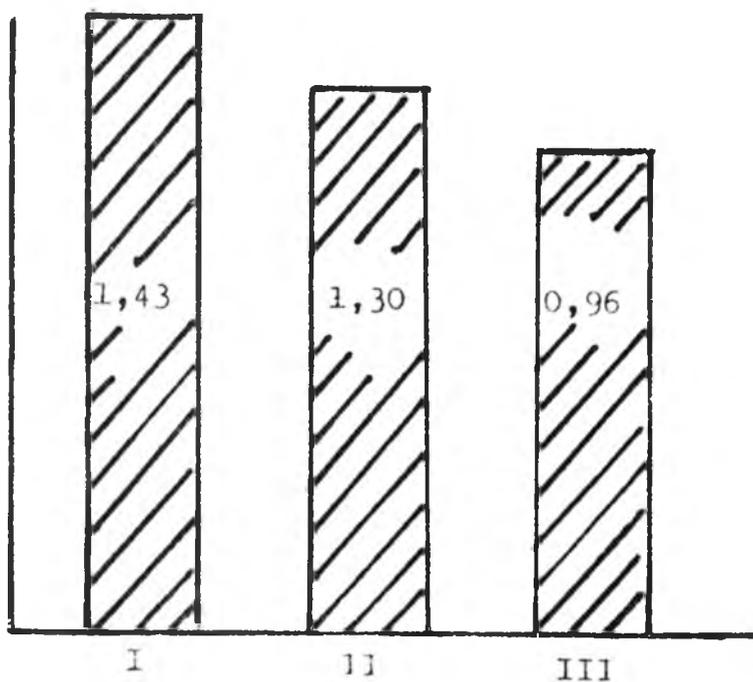


Figura VI — Quimotripsina no soro de bovinos de 5 a 7 meses de idade nos diferentes grupos de incremento ponderal. Gráfico obtido com os valores médios (expressos em mU/ml) registrados na tabela VIII.

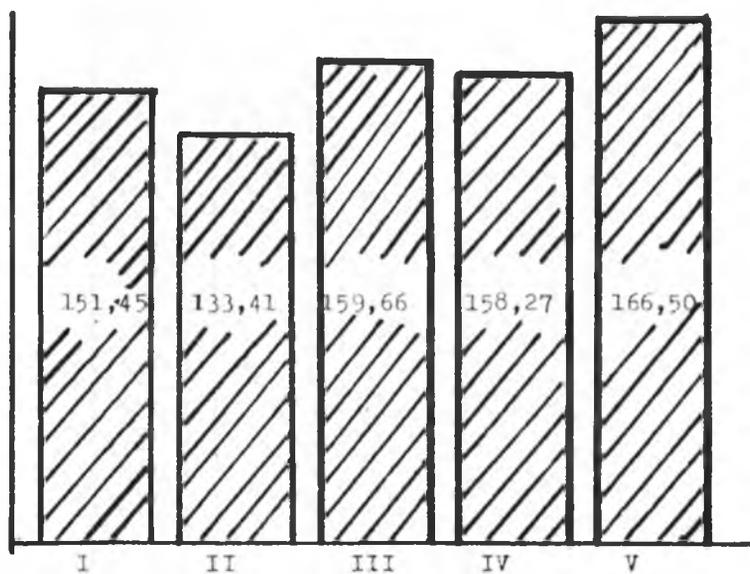


Fig. VII — Representação gráfica dos valores médios de amilase verificados no soro de bovinos de 5 a 7 meses de idade (expressos em unidades). Dosamentos praticados com intervalos de 15 dias.

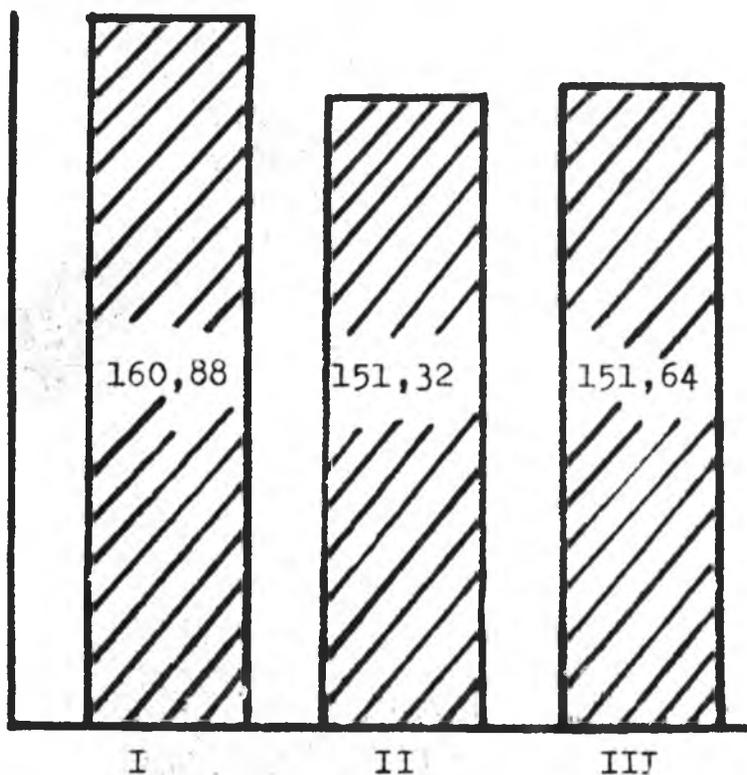


Figura VIII — Amilase no soro de bovinos de 5 a 7 meses de idade nos diferentes grupos de incremento ponderal. Gráfico obtido com os valores médios (expressos em unidades) registrados na tabela VIII.

D I S C U S S Ã O

Tendo em vista que a premissa inicial deste trabalho foi o estudo do estabelecimento dos teores normais das enzimas proteolíticas, assim como o estudo das modificações que poderiam ocorrer nestes teores enzimáticos durante o desenvolvimento do animal, os primeiros cuidados tiveram por objetivo a escolha adequada do material. Dessarte, antes da análise específica dos resultados, devemos tecer algumas considerações preliminares acerca de uma série de fatores que possam interferir nos resultados obtidos. Assim, a amostragem e coleta do material foram orientadas com o máximo cuidado, visando diminuir ou evitar a influência de tais fatores.

Por estas razões, preferimos trabalhar com os animais submetidos a idênticas condições de manejo e alimentação.

Um outro fato, que deve ser ressaltado, é o que diz respeito à padronização da técnica por nós realizada, para o método da digestão da gelatina preconizada por GATES¹⁰ (1926/7).

Na avaliação da prova, o tempo e a temperatura ideal para a refrigeração, assim como a concentração da gelatina, são fatores de grande importância para a interpretação dos resultados. A diluição de 50% das fezes, e usando a gelatina (Difcercertified 1:250) à 7,5% e refrigeração na temperatura de 10°C, obtivemos uma digestão total em 10 minutos. Para o suco duodenal, por ter uma forte atividade proteolítica, a digestão foi constatada até na diluição de 1/40.

Além destes fatores, acresce ainda, conforme pode ser constatado pela literatura especializada, a despreocupação dos diversos autores em selecionar as amostras convenientemente, como também não fizeram um estudo sistemático sobre a ação dessas enzimas na digestão de ruminante. A maioria deles preocupou-se somente com a atividade destas enzimas, outros fizeram experiências "in vitro", outros prenderam-se à uma série de metódicas, procurando estabelecer as atividades enzimáticas de extrato de pâncreas de boi, porco cão e rato;

outros estudaram os inibidores da tripsina. Com exceção de NARDI³⁷ (1958), que fez um estudo sobre a determinação dos teores séricos de tripsina, em indivíduos normais, indivíduos acometidos de pancreatite e carcinoma do pâncreas, nenhum dos demais autores citados fixaram os teores normais destas enzimas.

Feitas estas considerações iniciais, podemos sugerir (isto porque, até o presente não foram fixados os padrões séricos destas enzimas proteolíticas em bovinos), que os resultados experimentais revelaram que bovinos normais da raça holandesa preto e branco submetidos à uma alimentação hipercalórica, trazendo como conseqüência um maior empenho metabólico, apresentam um ligeiro aumento de tripsina sérica para os animais que tiveram um ganho de peso maior.

Resultados inversos foram observados nos teores desta enzima nas fezes, onde os valores encontrados demonstram um ligeiro aumento para os animais do grupo I; fato idêntico foi observado para os teores séricos da quimotripsina e da amilase.

Por outro lado, no que diz respeito aos resultados obtidos nas dosagens bisemanais, observa-se que a tripsina sérica sobre um ligeiro aumento nas sucessivas dosagens; fato semelhante foi constatado para a quimotripsina e amilase, o que é observado inversamente no que diz respeito aos resultados verificados nas dosagens desta enzima nas fezes.

Provavelmente, este fato poderá ser explicado segundo as observações de REBOUD³⁹ (1964), que ressalta que o teor global em enzimas do tecido pancreático de uma determinada espécie animal e aquele do suco correspondente varia notavelmente segundo a freqüência e a natureza dos estímulos e que essas variações parecem interferir da mesma maneira em todas essas enzimas de sorte que suas proporções relativas permanecem invariáveis.

De outro lado, Babkin cit. por REBOUD³⁹ (1964), admite que a composição em enzimas do suco pancreático é independente da ação de estímulos, mas que ela

“se adapta” de uma certa maneira ao constituinte principal do regime alimentar.

FIGARELLA & DESNUELLE⁹ (1962), admitem que a atividade específica da quimotripsina bovina é muito mais elevada do que a tripsina, fato este não constatado em nossos trabalhos. Nas condições experimentais e pela análise da literatura especializada, verifica-se que há dificuldade em se procurar estabelecer relação entre as observações colhidas no presente trabalho com outras pesquisas efetuadas a esse respeito em bovinos. Uma comparação somente é possível quando os métodos forem estritamente iguais e quando o material (animal e seu meio) forem exatamente os mesmos. Assim os dados obtidos por nós podem ser sintetizados como se segue abaixo.

O valor médio da tripsina sérica variou de $1,21 \pm 0,15$ m U/ml (1.^a dosagem) a $1,52 \pm 0,10$ m U/ml (5.^a dosagem) com média geral de $1,37 \pm 0,06$ m U/ml e coeficiente de variabilidade de 53,13%.

As médias dos grupos de incremento foram respectivamente: $1,48 \pm 0,13$; $1,12 \pm 0,10$ e $1,50 \pm 0,09$ m U/ml.

A análise estatística revelou-se altamente significativa, entre os grupos de incremento ponderal e entre os animais em cada um dos grupos considerados.

O valor médio da tripsina nas fezes variou de $12,89 \pm 1,21$ m U/ml (1.^a dosagem) a $6,42 \pm 0,65$ m U/ml (5.^a dosagem) com média geral $8,39 \pm 0,43$ e coeficiente de variabilidade de 57,25%. Os valores médios dos grupos de incremento foram respectivamente: $8,74 \pm 1,00$; $8,72 \pm 5,31$ e $7,73 \pm 0,54$ m U/ml.

As médias dos níveis encontrados não diferiram significativamente entre os grupos de incremento ponderal, mas diferiram significativamente entre os animais em cada um dos grupos.

O valor médio da quimotripsina apresenta oscilação com variações extremas de $1,00 \pm 0,11$ m U/ml (3.^a dosagem) a $1,38 \pm 0,11$ m U/ml (5.^a dosagem), com média geral $1,14 \pm 0,06$ m U/ml e coeficiente de variabilidade de 57,15%. As médias dos grupos de incremento foram respectivamente: $1,43 \pm 0,17$; $1,30 \pm 0,12$ e $0,96 \pm 0,05$ m U/ml.

Os resultados obtidos diferiram estatisticamente entre os grupos de incremento ponderal e entre os animais em cada um dos grupos.

Para a amilase, enzima tipicamente digestiva, houve oscilação com variações extremas de $133,41 \pm 8,60$ unidades (2.^a dosagem) a $166,50 \pm 7,62$ unidades (5.^a dosagem), havendo oscilações nas sucessivas dosagens. Torna-se para nós dificultoso argumentar a respeito da oscilação aludida. Segundo citação de GERBER¹² (1963), ainda que a amilase seja considerada como pâncreo-específica, parece que 75% de sua atividade sérica é proveniente do fígado.

Os valores médios dos grupos de incremento ponderal foram respectivamente: $160,88 \pm 6,70$; $151,32 \pm 8,61$ e $151,64 \pm 5,72$ unidades.

Os resultados obtidos diferiram de forma estatisticamente significantes entre as médias dos níveis obtidos.

Para a dosagem da tripsina nas fezes pelo método da digestão da gelatina e no suco duodenal, não foi realizada a análise estatística dos resultados, pois o nosso interesse em estudá-las, foi tão somente o de demonstrar a atividade triptica e até em que diluição esta atividade triptica é demonstrada.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nas diversas dosagens enzimológicas realizadas em bovinos do sexo masculino de 5 a 7 meses de idade e as comparações efetuadas entre os diferentes grupos de incremento e entre os animais pertencentes a estes grupos, ao nível de rejeição de 1% nos permitem as seguintes conclusões:

1. Os resultados observados sugerem que os valores médios obtidos em bovinos de 5 a 7 meses de idade alimentados com concentrados, verificados em intervalos bissemanais é capaz de variar a atividade específica da tripsina, da quimotripsina e da amilase. As variações constatadas parecem não serem devidas ao desequilíbrio do regime alimentar porque todos os animais eram submetidos a idênticas condições de manejo e

alimentação e em excelente estado de saúde, entretanto elas podem ser devidas a um efeito específico de adaptação às condições alimentares.

2. Examinando os resultados médios obtidos para a tripsina e quimotripsina, nota-se que a atividade específica da tripsina é muito maior.

3. O comportamento da atividade enzimática da tripsina nas fezes e da quimotripsina foi idêntico no que diz respeito aos grupos de incremento ponderal, isto é, houve uma ligeira queda nos respectivos grupos.

4. As atividades da tripsina e da amilase séricas sofrem ligeira oscilação nos grupos de incremento ponderal, sendo os menores valores observados no grupo II.

5. A tripsina do suco duodenal e das fezes, detectada pelo método da digestão da gelatina apresenta atividade enzimá-

tica total até a diluição de 1:40 e 1:1 respectivamente.

6. O suco duodenal apresenta atividade triptica até a diluição de 1:200, quando dosado por método colorimétrico.

7. As enzimas proteolíticas de bovinos do sexo masculino de 5 a 7 meses de idade alimentados com ração concentrada, sofrem influências devidas aos grupos de incremento ponderal e entre os animais em cada um dos grupos considerados. As variações foram estatisticamente significantes para a tripsina sérica, quimotripsina e amilase.

8. Com relação aos níveis de tripsina nas fezes, não houve variação significativa para os grupos de incremento ponderal, apesar de se encontrarem valores menores no grupo III.

9. As estimativas dos valores populacionais médios termos de desvio padrão da média foram:

a) *Geral*

Tripsina sérica	1,37 ± 0,066 mU/ml
Tripsina nas fezes	8,39 ± 0,438 mU/ml
Quimotripsina	1,23 ± 0,064 mU/ml
Amilase sérica	154,61 ± 3,984 unidades

b) Resultados das dosagens verificadas em intervalos bissemanais:

1) Para tripsina sérica

I —	1,21 ± 0,15 mU/ml
II —	1,25 ± 0,16 mU/ml
III —	1,50 ± 0,15 mU/ml
IV —	1,44 ± 0,14 mU/ml
V —	1,52 ± 0,10 mU/ml

3) Para quimotripsina

I —	1,20 ± 0,16 mU/ml
II —	1,02 ± 0,12 mU/ml
III —	1,00 ± 0,11 mU/ml
IV —	1,26 ± 0,18 mU/ml
V —	1,38 ± 0,11 mU/ml

2) Para tripsina nas fezes

I —	12,89 ± 1,21 mU/ml
II —	8,90 ± 0,69 mU/ml
III —	6,99 ± 0,87 mU/ml
IV —	6,16 ± 0,68 mU/ml
V —	6,42 ± 0,65 mU/ml

4) Para amilase sérica

I —	151,45 ± 9,47 unidades
II —	133,41 ± 8,60 unidades
III —	159,66 ± 8,21 unidades
IV —	158,27 ± 9,66 unidades
V —	166,50 ± 7,62 unidades

c) Para bovinos do grupo de incremento I (0 — 100 Kg)

Tripsina sérica	1,48 ± 0,13 mU/ml
Tripsina nas fezes	8,47 ± 1,00 mU/ml
Quimotripsina	1,43 ± 0,17 mU/ml
Amilase sérica	160,88 ± 6,70 unidades

d) Para bovinos do grupo de incremento II (110 — (130-165 Kg)

Tripsina sérica	1,12 ± 0,10 mU/ml
Tripsina nas fezes	8,72 ± 0,89 mU/ml
Quimotripsina	1,30 ± 0,12 mU/ml
Amilase sérica	151,32 ± 8,61 unidades

e) Para bovinos do grupo de incremento III (130-165 Kg)

Tripsina sérica	1,50 ± 0,09 mU/ml
Tripsina nas fezes	7,73 ± 0,54 mU/ml
Quimotripsina	0,96 ± 0,05 mU/ml
Amilase sérica	151,64 ± 5,72 unidades

RFMVA-8

ARAUJO, L. M. et al. — Considerations on the levels of proteolytic enzymes in cattle fed concentrates. *Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, 9:107-34, 1972.

SUMMARY — During the fattening period (4 months) of 24 young bovines, male, Friesian, fed only concentrates, the behaviour of the levels of proteolytic enzymes was studied. The variation of the serical trypsin, chymotrypsin and amylase activity was observed, and it is probably due to the specific effect of adaptation to the nutrition conditions.

The serical trypsin activity was larger than the chymotrypsin's. On the other hand, the behaviour of the enzymatic activity of trypsin and chymotrypsin in the feces decreased during the fattening. Small variations were observed in the groups of ponderal increment of the serical trypsin and amylase activities. By the method of gelatin digestion, the trypsin from the duodenal juice and feces presented total enzymatic activity up to the dilutions 1 : 40 and 1 : 1, respectively.

By the colorimetric method the duodenal juice presented tryptical activity up to the dilution 1 : 200.

Between the animals and the different groups of ponderal increment there were differences statistically significant for the values of serical trypsin, chymotrypsin and amylase. The mean values in terms of standard deviations were: serical trypsin $1,37 \pm 0,066$ mU/ml; trypsin in feces $8,39 \pm 0,438$ mU/ml; chymotrypsin $1,23 \pm 0,064$ mU/ml and serical amylase $154,61 \pm 3,984$ units.

UNITERMS: Enzymes, proteolytic*; Bovines*; Fed, concentrates*.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. ABDELJLIL, A. B. & DESNUELLE, P. — Sur l'adaptation des enzymes exocrines du pancreas à la composition du regime. *Biochim. biophys. Acta.* (Amst.), 81:136-49, 1964.
2. ABDELJLIL, A. B. et al. — Adaptation of the exocrine secretion of rat pancreas to the composition of the diet. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 10: 112-6, 1963.
3. BIETH, J. et al. — Étude des proteases pancreatiques. I Dosage de la trypsin par la benzoylagénine — P. Nitroanilide et ses applications. *Ann. Biol. clin.*, 24:787, 1966.
4. BRICTEUX GREGOIRE, S. et al. — Structure des peptides libérés au cours de l'activation du trypsinogène de mouton. *Biochim. biophys. Acta.* (Amst.), 127:277-9, 1966.
5. COLES, E. H. — *Veterinary clinical pathology.* Philadelphia, Saunders, 1967.
6. CORNELIUS, C. E. & KANEKO, J. J. — *Clinical biochemistry of domestic animals.* New York, Academic Press, 1963.
7. CROSTON, C. B. — Endopeptidases of salmon ceca: chromatographic separation and some properties. *Arch. Biochem.*, 112:218-23, 1955.
8. DAVIS, N. C. & SMITH, E. L. — *Assay of proteolytic enzymes in methods of biochemical analysis.* New York. Interscience, 1955. v. 2, p. 215-57.

9. FIGARELLA, C. & DESNUELLE, P. — Premier essai de comparaison entre l'équipement enzymatique du pancreas humain et celui du pancreas de diverses espèces animales. *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, 156:699-702, 1962.
10. GATES, F. L. — A method of proteolytic enzyme titration. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)*, 24:936-7, 1926/7.
11. GEACHIN, M. C. et al. — The effect of blood anticoagulants on serum and plasma amylase activities. *Ch. cvhim. Acta*, 2:75-7, 1957.
12. GERBER, H. — Aktivitätsbestimmungen von Serumenzymen in der veterinärmedizin. *Schweiz. Arch. Tierheilk.*, 105:529-50, 1963.
13. GILMAN, A. & COWGILL, G. R. — The determination of peptic activity: its examination and application of the Gates method of proteolytic enzyme titration. *J. biol. Chem.*, 88:743, 1930.
14. GREEN, N. M. & NEURATH, H. — Proteolytic enzyme In: NEURATH, H. & BAILLEY, K. — *The proteins*. New York, 1954. v. 2, pt. 13, p. 1057-198.
15. GREENE, I. J. et al. — Trypsin inhibitor from bovine pancreatic juice. *Fed. Proc.*, 25:790, 1966.
16. GROSSBERG, A. L. et al. — Distribution of proteins and enzymatic activities in electrophoresis component of canine pancreatic juice. *Amer. J. Physiol.*, 168:262-9, 1952.
17. GROSSMAN, M. I. — Some properties of trypsin inhibitor of pancreatic juice. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)*, 99:304-6, 1958.
18. HATFALUDI, F. et al. — Effect of urea and Ca ions on pancreatic amylase. *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.*, 1:39-44, 1966.
19. HIRSCH MARIE, H. P. et al. — Étude électrophorétique et immunoelectrophorétique des enzymes proteolytiques du suc gastrique normal et pathologique. *Acta Gastro-ent. belg.*, 28:373-81, 1965.
20. HUBER, J. T. et al. — Digestive enzyme activities in the young calf. *J. Dairy Sci.*, 44:1494-501, 1961.
21. JASPER, D. E. — A simple diagnostic test for pancreatic enzyme deficiency in dogs. *N. Amer. Vet.*, 35:523, 1954.
22. KALSER, M. H. & GROSSMAN, M. I. — Secretion of trypsin inhibitor in pancreatic juice. *Gastroenterology*, 29:35-45, 1955.
23. KALSER, B. & LASKOWSKI, M. — Comparison of chymotrypsinogen and *Fed. Proc.*, 19:332, 1960.
24. KELLER, P. J. & ALLAN, B. J. — The protein composition of human pancreatic juice. *J. biol. Chem.*, 242:281, 1967.
25. KELLER, P. J. et al. — The proteins of bovine pancreatic juice. *J. biol. Chem.*, 233:344-9, 1958.
26. KOLB, E. — *Physiologie des animaux domestiques*. Paris, Vigot Frères, 1965.
27. LASKOWSKI, M. Jr. & LASKOWSKI, M. — Crystalline trypsin inhibitor from colostrum. *J. biol. Chem.* 190:563-73, 1951.
28. LASKOWSKI, M. Jr. & LASKOWSKI, M. — Naturally occurring trypsin inhibitors. *Advanc. Protein Chem.*, 9:203-42, 1954.
29. LASKOWSKI, M. & WU, F. C. Temporary inhibition of trypsin. *J. biol. Chem.*, 204:797-805, 1953.
30. LASKOWSKI, M. Jr. et al. — Comparison of trypsin inhibitor from colostrum with other crystalline trypsin inhibitors. *J. biol. Chem.*, 198:745-52, 1952.
31. LOEB, W. F. & EDGE, L. L. — A method for the determination serum amylase in the dog. *Amer. J. vet. Res.*, 23:1117, 1962.
32. MARCHIS-MOUREN, G. & MEMOIRE, G. — Etude comparée de l'équipement enzymatique du suc pancréatique de diverses espèces. *Bull. Soc. Chim. biol. (Paris)* 42:2207-17, 1965.
33. MARCHIS-MOUREN, G. et al. — Further studies on amylase biosynthesis by pancreas of rats fed on a starch-rich or a Casein-rich diet. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 13:262-6, 1963.
34. MARCHIS-MOUREN, G. et al. — Sur l'équipement en enzymes du suc pancréatique de porc et chien. *Biochim. biophys. Acta. (Amst.)*, 53:186-8, 1961.

ARAÚJO, L. M. et al. — Consideração sobre os teores de enzimas proteolíticas em bovinos alimentados com concentrados. *Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, 9:107-34, 1972.

35. MEYER, K. H. et al. — Sur les enzymes amylolytiques. Isolement et cristallisation de l' — amylase de salive humaine. *Helv. chim. Acta.*, 31:2158-64, 1948.
36. NAGEL, W. et al. — Über die Bestimmung von trypsin und chymotrypsin mit Aminosäure-p-ni troaniliden. *Hopps — Seylers Z. physiol. Chemo.*, 340: 1-10, 1965.
37. NARDI, G. L. — Serum trypsin determination in pancreatic disease. *J. Lab. clin. Med.*, 52:66, 1958.
38. NEURATH, H. & SCHWERT, G. W. — The mode of action of the crystalline pancreatic proteolytic enzymes. *Chem. Rev.*, 46:69-153, 1950.
39. REBOUD, J. P. et al. — On chymotrypsinogen and trypsinogen biosyntheses by pancreas of rats fed on a starch-rich or a casein-rich diet. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 17:347-51, 1964.
40. REBOUD, J. P. et al. — Variations de la teneur en enzymes du pancreas de rat en fonction de la composition des regimes. *Biochim. biophys. Acta. (Amst.)*, 58:326-37, 1962.
41. RICE, E. W. — Improved Spectrophotometric Determination of Amylase with a new Stable Starch substrate solution. *Clin. Chem.*, 5:592, 1959.
42. ROVERY, M. et al. — Etude de l'activation du chymotrypsinogene et du tripsinoge de boeuf par determinations des residues n. termineaux dans les proteines et les enzymes correspondants. *Bioch. biophys. Acta. (Amst.)*, 12:547-50, 1953.
43. RYAN, C. A. & TOMIMATSU, Y. — A crystalline avian pancreatic optrein. *Arch. Biochem.*, 111:461-6, 1965.
44. SHULMAN, N. R. — A proteolytic inhibitor with anticoagulant activity separated from human urine and plasma. *J. biol. Chem.*, 213:655-71, 1955.
45. SNEDECOR, G. W. — *Statistical methods* 5 th. ed. Ames, Iowa, State College Press, 1956.
46. SZCZEKLIK, A. — Trypsin-Like activity of serum: Its origin and Electrophoretic separation. *Clin. chim. Acta.*, 23:219-29, 1969.
47. WALSH, K. A. et al. — On the structure and function of bovine trypsinogen and trypsin. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 51:301-8, 1964.
48. YAMASHIMA, I. — The action of enterokinase in trypsinogen. *Acta chem. scand.*, 10:739-43, 1956.
- Recebido em
Acelto para