UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO E PRODUÇÃO ANIMAL

RÔMULO GODIK ANTUNES

Avaliação histopatológica da interferência do uso de enzimas exógenas nas células pancreáticas de frangos de corte

Pirassununga

2015

RÔMULO GODIK ANTUNES

Avaliação histopatológica da interferência do uso de enzimas exógenas nas células pancreáticas de frangos de corte

Dissertação/Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre/Doutor em Ciências.

Departamento:

Nutrição e Produção Animal

Área de concentração:

Nutrição e Produção Animal

Orientador:

Prof. Dr. Ricardo de Albuquerque

De acordo: Ricardo de Albuquerque

Orientador

São Paulo
2015

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.3191
FMVZ

Antunes, Rômulo Godik

Avaliação histopatológica da interferência do uso de enzimas exógenas nas células pancreáticas de frangos de corte / Rômulo Godik Antunes. -- 2015.
46 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, São Paulo, 2015.

Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal.

Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Albuquerque.

1. Amilase. 2. Protease. 3. Fitase. 4. Pâncreas. 5. Frangos de corte. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeito da utilização de níveis de enzimas exógenas na alimentação de frangos de corte sobre o desempenho, digestibilidade e morfometria do trato digestório, atividade e produção enzimática e expressão de genes de enzimas digestivas", protocolado sob o nº 2644/2012, utilizando 1728 (mil setecentos e vinte e oito) frangos de corte, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Ricardo de Albuquerque, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 20/6/2012.

We certify that the Research "Effect of levels of exogenous enzyme in feed for broiler chickens on performance, digestibility, enzyme production and activity and gene expression of digestive enzymes", protocol number 2644/2012, utilizing 1728 (one thousand seven hundred twenty-eight) broiler chickens, under the responsibility Prof. Dr. Ricardo de Albuquerque, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 6/20/2012.

São Paulo, 21 de junho de 2012.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: ANTUNES, Rômulo Godik

Título: Avaliação histopatológica da interferência do uso de enzimas exógenas nas células pancreáticas de frangos de corte

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

Á minha mãe, que é a razão do meu viver.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me mostrar o caminho e me guiar nesta caminhada.

Aos meus pais agradeço ao eterno apoio nas minhas decisões.

A minha esposa agradeço pela sua parceria durante as diversas fases desta caminhada.

Ao Professor Ricardo, pelo acolhimento, compreensão e apoio prestado.

Aos amigos e colegas que foram fundamentais nesta etapa oferecendo seu apoio e companheirismo.

A todos, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

ANTUNES, R. G. **Avaliação histopatológica da interferência do uso de enzimas exógenas nas células pancreáticas de frangos de corte.** [Histopathology evaluation between in feed enzymes and pancreatic cells of broilers]. 2015. 43 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP., 2015.

O projeto teve como objetivo avaliar o efeito do uso de enzimas exógenas sobre os grânulos de zimógenos no pâncreas. O projeto foi dividido em três experimentos, sendo o experimento I para avaliação do uso da protease via ração nas dosagens de 50, 100 e 150% das recomendações do fabricante. O experimento II, foi realizado avaliando-se o uso da enzima amilase nas dosagens de 50, 100 e 150% das recomendações do fabricante e o experimento III foi realizado avaliando-se as dosagens de amilase, amilase + fitase, protease e protease + fitase sobre os grânulos de zimógenos. Em cada experimento, foi utilizado delineamento inteiramente casualizado sendo um total de nove tratamentos com oito repetições.

Aos 21 e 42 dias de idade, as aves foram sacrificadas por deslocamento cervical para coleta e processamento do pâncreas para análise histopatológica e posterior análise pelo programa Image Pro Plus®. Este programa permitiu a mensurar a porcentagem dos grânulos de zimógenos nas imagens obtendo-se um índice matemático da presença dos grânulos de zimógenos no pâncreas, o qual pode ser avaliado estatisticamente e submetidos a regressão polinomial os experimentos I e II e ao teste de Tukey o experimento III. Uma redução significativa ($P < 0,05$) com efeito quadrático na presença dos grânulos de zimógenos pode ser observada nos experimentos I e II. O experimento III apresentou diferença estatística ($P < 0,05$) entre o uso de fitase 100% + Protease 100% quando comparado com o controle.

Palavras-chave: Amilase. Fitase. Frangos de corte. Pâncreas. Protease.

ABSTRACT

ANTUNES, R. G. **Histopathology evaluation between in feed enzymes and pancreatic cells of broilers.** [Avaliação histopatológica da interferência do uso de enzimas exógenas nas células pancreáticas de frangos de corte]. 2015. 43 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP., 2013.

This research project was conducted in the poultryhouse of the Faculty of Veterinary Medicine USP - Department of Nutrition and Animal Production, Pirassununga Site. Thus, this present study aimed to evaluate the effect of exogenous enzymes on the zymogenes granules of pancreas. It was performed three experimental trials; the first experiment has evaluated the addition of 50, 100 and 150% of protease manufactory recommendation in the feed. The trial two was conducted to evaluate the addition of 50, 100 and 150% of amylase manufactory recommendation in feed, and the experiment three was conducted to evaluated the addition of amylase, amylase + phytase, protease and protease + phytase in the feed on the zymogens granules. Each experiment was designed totally randomized with a total of nine treatments with eight replicates each. The birds were killed by cervical dislocation at days 21 e 42 to collect the pancreas for histopathology analysis followed by the Image Pro Plus® program analysis, this program allowed to transform the image into a mathematic number, which could be used in statistical analysis. At the experiments I and II, the statistical analysis were conducted by the polynomial regression method and the experiment three was evaluated by Tukey test. A significant reduction ($P < 0,05$) with quadratic effect was observed on the zymogens granules at the experiments I and II. The experiment III show a significant difference between the treatment with phytase 100% + Protease 100% and the control group.

Keywords: Amylase. Broilers. Pancreas. Phytase. Protease.

LISTA DE ABREVIATURAS

cP Centipoese

Ca⁺⁺ Cálcio

FMVZ-USP Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

FTU Unidades de Fitase

g Grama

IP₆ Inositol Fosfato

kg Quilograma

K⁺ Potássio

Mg⁺⁺ Magnésio

mg miligrama

Na⁺ Sódio

% Porcentagem

PNAs Polissacarídeos não amiláceos

Zn⁺⁺ Zinco

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Inclusão para cada 100 quilograma de ração das enzimas (produto comercial) e/ou inerte de acordo com o tratamento.....	29
Tabela 2 -	Fórmulas das rações experimentais e composição calculada de acordo com Rostagno et al. (2011)	29
Tabela 3 -	Avaliação do efeito da adição da enzima protease na ração sobre os grânulos de zimógenos.....	36
Tabela 4 -	Avaliação do efeito da adição da enzima amilase na ração sobre os grânulos de zimógenos.....	37
Tabela 5 -	Avaliação do efeito da adição da associação das enzimas amilase + fitase e protease + fitase na ração sobre os grânulos de zimógenos	38

LISTA DE FOTOGRAFIAS

Fotografia 1 - Instalações experimentais FMVZ-USP. Pirassununga-SP	27
Fotografia 2 - Avaliação histopatológica dos grânulos de zimógenos	33
Fotografia 3 - Marcação dos grânulos de zimógenos pelo programa Image Pro Plus®	35
Fotografia 4 - Visualização dos grânulos de zimógenos no programa Image Pro Plus® ..	36

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	HIPÓTESE.....	17
3	REVISÃO DE LITERATURA E JUSTIFICATIVAS.....	18
3.1	Anatomofisiologia do pâncreas.....	18
3.2	Interferências patofisiológicas no pâncreas.....	18
3.3	Interferência do calor sobre a produção de enzimas pancreáticas.....	19
3.4	Uso de enzimas nas dietas de frango de corte.....	20
3.5	Protease.....	23
3.6	Amilase.....	24
3.7	Fitase.....	25
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1	Local, instalações, equipamentos e animais	27
4.2	Delineamento experimental e tratamentos	29
4.3	Dieta Experimental.....	30
4.4	Avaliação quantitativa dos grânulos de zimógenos	32
4.5	Protocolo de preparação da hematoxilina fosfotúngstica de mallory.....	33
4.6	Desparafinização.....	34
4.7	Análises das imagens.....	34
4.8	Análise estatística.....	36
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1	Experimento I.....	37
5.2	Experimento II.....	38
5.3	Experimento III.....	39

6	CONCLUSÃO.....	40
	REFERÊNCIAS.....	41

1 INTRODUÇÃO

A avicultura brasileira se destaca no cenário mundial como o maior exportador de carne de frango do mundo, garantir excelentes resultados zootécnicos e a sanidade do seu plantel tornam se fundamentais na manutenção deste título.

Com o objetivo de maximização dos lucros do setor avícola, a inclusão de enzimas exógenas nas rações de aves de produções vem se tornando mais uma das excelentes opções no aumento dos lucros para o setor. Para tanto, estas devem ser capazes de atuar sob condições adversas que ocorrem durante o processo de preparo da ração, como peletização ou extrusão e até mesmo durante a sua passagem pelo sistema digestório, visto que o baixo pH do proventrículo e da moela pode levar a inativação das enzimas (MCCLEARY, 2001), o que não ocorre devido a rápida velocidade que os alimentos passam por estes compartimentos.

A eficácia no uso das enzimas também está relacionada com a presença de viscosidade na digesta, a qual dificulta a ação das enzimas sobre os nutrientes e resulta da quantidade de fatores antinutricionais presentes nos alimentos (MARQUARDT, 1996; ODETALLAH, 2003).

Nos primeiros estudos as enzimas eram utilizadas apenas em alimentos com elevada quantidade de polissacarídeos não amiláceos (PNAs) como o trigo, o centeio, a cevada, o triticale e a aveia. No entanto, tem se observado a viabilidade econômica do uso dessas enzimas em rações com cereais com baixa viscosidade como o milho, o sorgo e o farelo de soja, possibilitando um melhor aproveitamento do amido e proteína desses alimentos, tendo como resultado um menor impacto ambiental pela redução da excreção de elementos como fósforo e nitrogênio no ambiente (FIALHO, 2003).

O uso de enzimas exógenas nas rações das aves tem como objetivo eliminar ou reduzir os fatores antinutricionais presentes nos alimentos fazendo com que estes sejam melhor aproveitados pelas aves (GUENTER, 1997).

As enzimas exógenas tornam-se necessárias para atuarem sobre os PNAs reduzindo o seu tamanho, para que perca sua capacidade de retenção de água e permita a ação das enzimas que irão liberar os nutrientes que serão absorvidos. A quebra dos PNAs pelas enzimas também está relacionada a menor quantidade de água nas fezes visto que ocorre um aumento na digestibilidade na matéria seca, tendo como consequência uma melhor qualidade de cama,

menor incidência de lesão em coxim plantar e uma redução na quantidade das excretas, diminuindo o manejo e o impacto ambiental. O melhor aproveitamento dos nutrientes associados a menor umidade da cama, reduz a produção de amônia no aviário melhorando o bem estar das aves (MARQUARDT, 1996; CHOCT, 2001; SANTOS JR. et al., 2004; OPALINSKI, 2006).

2 HIPÓTESE

O uso de enzimas incorporadas na ração causam uma redução na síntese de enzima pelo organismo, este mecanismo está relacionado ao aumento de concentração de enzimas na luz intestinal, a qual em conjunto com a presença de substratos e produtos da hidrólise dos substratos são responsáveis por um mecanismo de feedback negativo na síntese de enzimas pancreáticas que localizam-se no interior dos grânulos de zimógenos.

Outra teoria para a redução de síntese de enzima pancreática é que após o fornecimento de enzima exógena poderá haver um aumento no nível de enzima circulante que, através da circulação enteropancreática, poderá gerar um mecanismo de feedback negativo na síntese de enzima pancreática (ROTHMAN, 2002).

3 OBJETIVO

Avaliar através de microscopia óptica de luz a redução da presença de grânulos de zimógenos em frangos de corte submetidos a tratamentos com enzimas exógenas.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Anatomofisiologia do pâncreas

O pâncreas das aves está inserido entre as alças ascendente e descendente do duodeno, podendo ser dividido entre os lóbulos dorsal, ventral e esplênico. O pâncreas apresenta uma porção endócrina e outra exócrina, sendo a primeira formada por células esféricas, rugosas ou irregulares que são responsáveis por formar as ilhotas que são distribuídas nesta região. A função das células das ilhotas é a secreção de hormônios como a insulina, o glucagon e a somatostatina. A porção exócrina do pâncreas é formada por glândulas tubuloacinares e ductos intralobulares e possui como função a produção do suco pancreático que é composto por enzimas digestivas como a amilase, a lipase, a tripsina e outras enzimas proteolíticas. Estas enzimas ficam armazenadas na forma de precursores dentro de grânulos eosinofílicos (grânulos de zimógenos) localizados na porção apical das células glandulares (ABDUL-AZIZ, 2008). O estímulo para a liberação do suco pancreático envolve o sistema nervoso autônomo e o hormônio colecistoquinina, o qual é estimulado pela presença de gordura, proteína e carboidrato no duodeno (FURLAN, 2002).

Enzimas como amilase, lipase e protease são liberadas no trato digestivo das aves após serem armazenadas na forma de precursores de enzimas nos grânulos de zimógeno, os quais estão localizados na porção apical das células glandulares do pâncreas exócrino (ABDUL-AZIZ, 2008).

3.2 Interferências patofisiológicas no pâncreas

As alterações no pâncreas decorrentes de falha na alimentação das aves, a qual pode ser desde uma restrição alimentar prolongada até uma deficiência de vitamina na dieta podem variar entre diminuição das células acinares, degeneração, depleção dos grânulos de zimógenos e apoptoses de algumas células (ABDUL-AZIZ, 2008).

Deficiência de selênio e intoxicação por zinco são algumas das diversas causas que geram uma alteração da estrutura microscópica do pâncreas com presença de fibrose (ABDUL-AZIZ, 2008).

Aves submetidas a restrição alimentar por 24 horas apresentaram uma quantidade maior de grânulos de zimógenos no pâncreas em relação as aves que tiveram ração “ad libitum” (DANDRIFOSSE, 1975)

Aves desafiadas com aflatoxina apresentaram um pâncreas com infiltração linfocítica, vacuolização e degeneração de células acinares (MARCHIORO, 2013; SIMSEK et. al., 2007). A interferência das micotoxinas sobre o pâncreas também foi observada por Simsek et al. (2007), ao observar diminuição na produção de grânulos de zimógenos, formações de vacúolos nas células acinares e perda da integridade celular do pâncreas, estas alterações na estrutura do pâncreas são associadas pelas alterações das micotoxinas sobre o metabolismo de gorduras, carboidratos e proteínas.

Presença de corpúsculo de inclusão basofílico no epitélio das células acinares e necrose difusa com tamanhos variados podem ser observados na infecção pelo Adenovírus (hepatite por corpúsculo de inclusão). As causas de alterações na estrutura do pâncreas são diversas e devem ser avaliadas junto com os sinais clínicos e exames auxiliares, visto que são raras as doenças em que a conclusão do diagnóstico é realizada apenas com a leitura histopatológica (ABDUL-AZIZ, 2008).

3.3 Interferência do calor sobre a produção de enzimas pancreáticas

O efeito do estresse calórico na produção avícola reduzindo o consumo de alimento e prejudicando o desempenho zootécnico é de amplo conhecimento. Ademais, os impactos sobre as enzimas pancreáticas tem sido bastante estudados e evidenciando que o calor causa uma diminuição na atividade da amilase, quimiotripsina e tripsina, alterando diretamente a digestibilidade do alimento. Esta redução das enzimas pode ser explicada pela maior ingestão de água durante o período quente, diluindo desta forma as enzimas presentes no intestino (HAI et al., 2000). Comparando os efeitos da exposição crônica e cíclica ao estresse calórico, Souza (2008) observou um aumento da atividade da enzima amilase aos 29 dias de idade e uma redução da atividade da enzima tripsina aos 36 dias de idade. Neste experimento a enzima lipase apresentou um aumento nas aves submetidas a exposição crônica ao calor nas idades de 36 e 42 dias; porém, a exposição cíclica ao calor não apresentou interferência nas enzimas pancreáticas.

3.4 Uso de enzimas nas dietas de frango de corte

A produção de enzimas endógenas consome cerca de 25% das necessidades diárias de nitrogênio, substituir parte do uso deste nitrogênio utilizado para síntese de enzimas em nitrogênio muscular é apenas mais um dos benefícios do uso de enzimas exógenas (LIMA, 2007). Jiang et al., 2008 observaram uma redução na síntese de amilase endógena após concentrações de amilase adicionada a dieta na faixa de 250mg/kg à 2250 mg/kg. Marquardt et. al (1996) mostrou que frangos alimentados com dieta a base de trigo, suplementada com xilanase e glucanase, apresentaram uma redução no peso do pâncreas de 24%, sendo que outros órgãos como fígado, proventrículo, duodeno, jejuno, íleo e cólon, apresentaram uma redução de peso de 8%, 39%, 16%, 20%, 18% e 29%, respectivamente. Um aumento na síntese de amilase, tripsina, lipase, pepsina e maltase pancreática foi observado por Zhu et al. (2014) após suplementação da ração com enzima, no entanto ao associar o uso de enzima exógena com ração com baixo valor de energia metabolizável foi possível observar um aumento de lipase e pepsina pancreática.

Com o objetivo de maximizar a ação das enzimas nas rações, as agroindústrias vem trabalhando com associação de produtos como xylanases (que apresentam excelente ação em dietas a base de trigo, triticales e arroz) e β -glucanases ou celulase (as quais apresentam uma excelente eficiência sobre cevada e aveia), visto que os fatores antinutricionais sensíveis as enzimas presentes nos diferentes cereais variam em tipo e quantidade (MARQUARDT, 1996).

As enzimas exógenas atuam sobre os PNAs reduzindo a viscosidade intestinal que é responsável por um menor aproveitamento da energia metabolizável da dieta, o que leva a uma redução no ganho de peso e aumento da conversão alimentar. As enzimas exógenas também foram capazes de eliminar a fermentação intestinal causada pelo uso de PNAs (CHOCT et al. 1995). O uso de α -amilase na ração não afetou a viscosidade intestinal, a qual teve uma redução com 7 dias de idade de 2,34 cP para 1,69 cP com 28 dias (GRACIA,

2003), sendo que resultados semelhantes podem ser observados por Zanella (1999).

O uso de cereais como milho na ração não apresentam um significativo efeito no aumento da viscosidade intestinal como trigo e cevada devido sua baixa quantidade de beta glucanos e pentosanas solúveis presentes nas sementes; no entanto, o uso de glucanase e endoxilanse nas rações tornam a viscosidade intestinal de aves alimentadas com trigo similar às aves alimentados com milho, possibilitando um desempenho zootécnico semelhante (GARCIA et al. 2003; SANTOS, 2004)

Os ganhos oferecidos pelas enzimas não podem ser obtidos apenas pelo uso das enzimas exógenas via ração. Utilizando a técnica de restrição alimentar foi possível observar um aumento das enzimas sucrase, um aumento não observado das enzimas amilase e lipase nas aves com 42 dias logo após o período de restrição revela a capacidade das aves em adaptar se às condições ambientais impostas e em manter uma concentração ideal de enzimas no trato intestinal de acordo com o nível de substrato presente no intestino (PINHEIRO et al. 2004).

O período de adaptação pode ser observado nos pintainhos que apresentam baixa secreção de amilase nos primeiros quatro dias de vida, aumentando até os vinte e um dias de vida, o uso de amilase exógena nos primeiros sete dias de vida auxiliam na digestibilidade do amido, no ganho em conversão alimentar em 4,2% e no ganho de peso diário em 9,4%, tendo um melhor aproveitamento da energia da dieta. No entanto, uma melhora na digestibilidade, observada com o uso de α -amilase com 28 dias, deixa evidente que esta enzima pode proporcionar um melhor resultado zootécnico mesmo em períodos em que o sistema digestório das aves já esteja completamente desenvolvido (GARCIA et. al., 2003).

O uso de amilase exógena foi capaz de causar uma redução no peso do pâncreas devido a interação entre a presença de amido, os PNAs presentes no intestino e a síntese de enzimas pelo pâncreas. Da mesma forma que pode ser constatado que o aumento na síntese de enzimas está diretamente relacionado com o tamanho do pâncreas.

A redução no peso do pâncreas foi evidenciada por Onderci et al. (2006) após contaminação de *E. coli* produtora de amilase nas rações de frango de corte, a qual foi capaz de melhorar a conversão alimentar, consumo de alimento e digestibilidade dos nutrientes que pode ser explicada pela melhora da morfologia intestinal da bactéria atuando como um probiótico aumentando a área de absorção de nutriente. A redução no peso do pâncreas, observada por Onderci et al. (2006), pode ser explicada pela depressão do RNA mensageiro para α -amilase após administração de amilase exógena, como observado por Jiang (2008), assim como observado por Marquardt (1996), o peso e o tamanho do intestino e órgãos como fígado e pâncreas mostraram uma redução após a associação de enzimas exógenas com dietas a base de cereais.

O peso do pâncreas está relacionado com a qualidade do processamento da soja fornecida às aves, sojas extrusadas subprocessadas ou superprocessadas apresentaram maior peso de pâncreas

quando comparado com o uso de soja extrusada normal, essa hipertrofia pancreática pode ser explicada como uma compensação a menor absorção de nutrientes provocadas pelos fatores antinutricionais como lecitinas, inibidores de tripsina e saponinas ou pela perda de qualidade devido ao processamento errado da soja (BRITO, 2006).

A associação de enzimas como proteases, celulase e amilase promoveu uma melhora de 3,8% no ganho de peso e 4,2% na conversão alimentar quando esta foi adicionada a dieta de pintos de corte de 1 a 21 dias de idade. No entanto, a suplementação com 250 ou 1000 mg/Kg na ração com sorgo e soja de 1 a 14 dias não influenciou a ingestão de alimento ou a taxa de ganho de peso (BRITO et al. 2006). Com a inclusão de um complexo enzimático contendo proteases Torres et al. (2003), pode verificar que 0,5 g/Kg não apresentou diferença significativa enquanto o uso de 1,0 e 1,5 g/Kg apresentou diferenças significativas que melhoraram proporcionalmente ao menor nível de proteína na dieta. Com o uso de uma dieta baseada em trigo e farelo de soja Madrid et al. (2010) evidenciaram que dietas com níveis nutricionais acima dos recomendados pela linhagem, não mostrou diferença significativa com o uso de complexo enzimático com proteases e carboidrases, no entanto uma melhora na digestibilidade fecal e ileal de matéria seca e proteína bruta pode ser observada em aves mais velhas devido a maior maturidade intestinal com relação a capacidade de síntese de enzimas e pela presença de bactérias com maior habilidade de hidrolizar substratos. As dietas a base de triticle necessitam de uma suplementação com xilanases exógenas para reduzir os efeitos dos fatores antinutricionais xilanos e arabinoxilanos, que são os PNAs presentes nestes grãos e liberar nutrientes que poderão ser utilizados pelas aves garantindo desta forma melhores resultados de conversão alimentar e ganho de peso (MARQUARDT et al., 1996; POURREZA et al., 2007; BALAMURUGAN; CHANDRASEKARAN, 2009).

Uma redução na ingestão de alimentos, tendo como base farelo de soja e milho, foi observada nos animais submetidos a tratamento com enzimas exógenas (celulase, xilanase, pectinase e fitase), porém o aumento no consumo de ração entre os animais que receberam enzimas esteve relacionado com o aumento da sua dosagem. A melhor eficiência alimentar pode ser observada no tratamento com

1000g/ton de enzima associado a redução de 2,5% de energia metabolizável, proteína bruta, lisina e metionina (BALAMURUGAN, 2009).

Embora o uso de enzimas exógenas aumentem a digestibilidade de proteína bruta em 2,9% deve sempre ser levado em consideração que este aumento não são iguais para todos os aminoácidos, sendo que lisina, metionina e arginina não apresentam um aumento de digestibilidade em níveis a serem considerados na formulação da ração (ZANELLA, 1999).

O uso de enzimas nas rações de frango de corte tornam se viáveis quando estas apresentam níveis de proteínas abaixo das recomendadas por Rostagno et al. (1996) tendo como resultado um melhor índice de eficiência produtiva especialmente pela melhora no ganho de peso, sendo assim existe uma limitada melhora no desempenho das aves ao adicionar enzimas em rações com valores acima das tabelas de referência (TORRES, 2003).

Os PNAs, antes conhecidos como fibra bruta, não são digeridos pelas enzimas endógenas dos monogástricos e apresentam um fator antinutricional por aumentar a viscosidade intestinal ao formar complexos de água e nutrientes, dificultando a ação das enzimas sobre os mesmos e interferindo na microflora intestinal e nas funções fisiológicas do intestino (CHOCT et al., 2004).

Os PNAs presentes no trigo interferem negativamente na resposta imune das aves, sendo observado uma redução nos títulos de anticorpos para doença de Newcastle de 42,3% e 20% nas aves com 21 e 42 dias de vida respectivamente após o fornecimento de dietas com 25% de trigo ao invés de milho (EL-KATCHA, 2014).

3.5 Protease

A proteína nas dietas dos frango de corte representa o maior custo na formulação da ração, sendo a soja responsável por 70% da proteína da dieta. A presença de elevadas quantidades de substâncias pécticas na estrutura de sua parede celular faz com que grande parte da proteína fornecida não seja aproveitada pelas aves. O uso de um processo térmico adequado na soja auxilia a inativação da maior parte de seus fatores antinutricionais melhorando a absorção de aminoácidos, proteínas e principalmente os aminoácidos sulfurados que possuem sua absorção fortemente afetada pelos fatores antinutricionais da soja (ZANELLA et al., 1999).

O uso de enzimas exógenas nas rações de aves de produção tem sido visto como mais uma ferramenta no controle dos gastos na formulação de rações. As proteases exógenas são capazes de hidrolisar certos tipos de proteínas que não seriam aproveitadas pelas aves o que permite a menor inclusão de certos alimentos como aminoácidos e minerais, sendo ainda possível melhoras significativas no crescimento das aves (TORRES et al., 2003, ODETALLAH et al., 2003).

Enzimas proteolíticas, como as queratinases, apresentam amplo espectro de ação sobre as proteínas e podem ser produzidas através da purificação de meios do *Bacillus licheniformis*, seu uso associado a dietas com concentração reduzida de proteína mostrou uma melhora significativa no ganho de peso das aves com 26 dias, o que pode ser explicado pela redução na viscosidade do jejuno, sendo que esta foi proporcional a quantidade de enzima utilizada na dieta (ODETALLAH, 2003).

O uso das proteases apresentam uma melhor resposta sobre o desempenho e rendimento de carcaça quando adicionadas em dietas com baixos níveis de aminoácidos essenciais ou de proteína total, reduzindo desta forma a excreção de nitrogênio.

As proteases exógenas podem ser oriundas de diversas fontes como microorganismos ou plantas, entretanto as proteases produzidas a partir de bactérias, tem apresentado uma melhor eficácia quando comparada com proteases sintetizadas por fungos (THORPE, 2001).

3.6 Amilase

A produção de amilase exógena tem sido realizada através de fungos (ex. *Aspergillus*) e bactérias (*Bacillus sp.*), as amilases degradam o amido em sacarídeos menores, tendo como função auxiliar a digestão do amido no intestino delgado (SHEPPY, 2001). Este aumento na digestibilidade do amido e na energia metabolizável com o uso de α -amilase pode ser o grande responsável pela melhora na eficiência alimentar observada com o uso desta enzima (GARCIA, 2003).

O amido é uma fonte importante de energia para as aves, grande parte de sua digestão ocorre no intestino delgado com formação de glicose, no entanto quando o amido chega intacto no intestino grosso, este passa por um processo de fermentação microbiana sendo produzido ácidos graxos com perda na geração de energia (NOBLET et al., 1994).

O uso da amilase pode apresentar os mais diversos resultados dependendo da sua concentração na ração, a inclusão de 2,250mg/kg gerou um aumento no ganho de peso diário de 4,5% e um aumento na ingestão diária de alimento de 3,6%, o aumento na concentração de protease e tripsina na porção proximal do intestino após o fornecimento de amilase em uma concentração não superior a 2,250mg/kg pode estar relacionada ao aumento do desempenho zootécnico obtido com o uso desta enzima (JIANG, 2008). A variação dos resultados obtidos com o uso da amilase também podem ser influenciados pela espécie de *Bacillus sp.* responsável pela síntese da amilase, pelo tipo de cereal utilizado na ração, se a ração será oferecida na forma peletizada ou farelada ou pela idade da ave visto que a amilase apresenta uma baixa síntese pelo pâncreas do terceiro ao sexto dia de vida do pintinho, aumentando de 10 a 20% no décimo primeiro dia de vida (NITSAN et al. 1991; GARCIA et al. 2003).

3.7 Fitase

O fitato atua como um reservatório de energia para o processo de germinação das sementes, a característica polianiónica do fitato permite a ligação do ácido fítico com elementos positivamente carregados comprometendo a absorção de proteínas, energia e íons como Na^+ , Mg^{++} , K^+ , Ca^{++} e Zn^{++} (SELLE; RAVINDRAN, 2007).

Além de disponibilizar o fósforo pela reação de catálise do fitato, a fitase é capaz de liberar outros elementos como cálcio, ferro, zinco, magnésio e aminoácidos devido sua ação sobre o inositol fosfato (IP_6). O IP_6 atua sobre enzimas e cofatores inibindo suas reações e forma sais insolúveis no intestino, reduzindo a disponibilidade destes minerais e aminoácidos como alanina, serina, ácido aspártico e treonina, o que leva a uma maior produção endógena de aminoácidos e minerais que são indispensáveis para garantir um equilíbrio osmótico no intestino (COWIESON, 2006; ROLAND et al., 2006).

Devido a capacidade da fitase em impedir que ocorra ligações entre as proteínas e o ácido fítico, o uso de fitase exógena garante uma melhor utilização de proteínas e aminoácidos da dieta, além de eliminar os gastos com o uso de fósforo inorgânico (SELLE; RAVINDRAN, 2007). O ácido fítico reduz a disponibilidade das proteínas pela alteração na sua solubilidade e estrutura, dificultando a ação das enzimas proteolíticas.

As fitases tem sido amplamente utilizadas nas rações de frango de corte com recomendações de 500FTU/Kg tendo como objetivo liberar em média 0,1% de fósforo disponível (DARI, 2006). No entanto, a fitase têm mostrado um melhor custo benefício quando utilizada na dosagem de 1000FTU/Kg, possibilitando melhor aproveitamento do fósforo e de outros aminoácidos como treonina, cisteína, arginina e serina, tendo a fitase pouco efeito sobre a metionina, ou seja, a fitase além de liberar os nutrientes disponíveis nos alimentos, também é capaz de inibir os efeitos antinutricionais do fitato (FORSTNER, 1994).

O fitato causa um aumento do turnover e da produção das células intestinais, o que gera uma excessiva perda endógena de aminoácido, que poderia estar sendo utilizado na formação de musculatura (COWIESON, 2006).

A proibição no uso de farinhas de origem animal por alguns países foi importante para acelerar a utilização e aceitação da fitase como ferramenta para aumentar a disponibilidade de fósforo dos alimentos, sua capacidade em aumentar a capacidade da digestibilidade do fitato vai de 25% para 50 a 70% em aves (CHOCT, 2004).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local, instalações, equipamentos e animais

Os três experimentos foram realizados no galpão experimental da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, campus de Pirassununga (fotografia 1).

Fotografia 1 - Galpão experimental FMVZ-USP - Pirassununga-SP

Fonte: própria

Foram alojados 864 frangos de corte machos da linhagem Cobb-500 com um dia de idade, provenientes de matrizes de mesma idade, selecionadas de acordo com o peso corporal e, posteriormente, à uniformização, foram distribuídos aleatoriamente.

As aves foram criadas em um galpão de alvenaria, divididos em 72 boxes (1,70m x 2,50m) por experimento, com 12 aves em cada, de piso cimentado coberto por casca de arroz, que serviu como cama, provido de comedouros tubulares e bebedouros do tipo *nipple*.

Os experimentos avaliaram a utilização de alfa-amilase, protease e fitase exógena na dieta de frangos de corte.

O aquecimento inicial das aves foi realizado com lâmpadas. Tanto a água como a ração foram fornecidos à vontade e a iluminação foi de 24 horas nos cinco primeiros dias e passou a ser reduzida gradualmente até atingir um período de 16 horas, segundo o manual da linhagem. Os dados de temperatura e umidade máxima e mínima foram registrados diariamente, utilizando-se um termo-higrometro de máxima e mínima.

O projeto foi dividido em três experimentos da seguinte forma: o experimento I com o uso de Protease 50%, Protease 100% e Protease 150%, o experimento II, com a adição de amilase nas concentrações de 50, 100 e 150% e o experimento III com uso da amilase 100%, amilase 100% + fitase 100%, protease 100%, protease 100% + fitase 100%.

4.2 Delineamento experimental e tratamentos

Foram utilizados, no experimento, nove tratamentos experimentais em um delineamento inteiramente casualizado estruturado em níveis de inclusão de enzimas exógenas. O experimento foi dividido em nove tratamentos T1 a T9 com oito repetições cada R1 a R8, sendo os tratamentos divididos da seguinte forma: T1 - Controle (sem enzima) T2 - Protease_50% T3 - Protease_100% T4 - Protease_150% T5 - Protease_100% + Fitase_100% T6 - Amilase_50% T7 - Amilase_100% T8 - Amilase_150% T9 - Amilase_100% + Fitase_100% ** 50%, 100% e 150% referem-se a dosagem recomendada pelo fornecedor de cada enzima.

As dietas utilizadas foram isoproteicas e isoenergéticas, sendo as enzimas colocadas “on top” (não houve valorização das dietas), uma vez que se fosse considerado este incremento, na formulação das dietas haveria uma menor quantidade de substrato disponível para estimular a produção de enzimas endógenas pelas aves.

A inclusão recomendada pelo fabricante é de 200ppm para o produto comercial com protease, 400ppm para o produto com amilase e 1000 ppm para o produto com fitase. Os níveis de inclusão para cada tratamento estão separados na tabela 1.

Tabela 1. Inclusão para cada 100 quilograma de ração das enzimas (produto comercial) e/ou inerte de acordo com o tratamento.

Tramentos	Inclusão das Enzimas (produto comercial) para cada 100kg de ração
Controle	200 gramas de inerte
Amilase 50%	20 gramas de amilase + 180 gramas de inerte
Amilase 100%	40 gramas de amilase + 160 gramas de inerte
Amilase 150%	60 gramas de amilase + 140 gramas de inerte
Amilase 100% + Fitase 100%	40 g de amilase + 100 g fitase + 10 g de inerte
Protease 50%	10 gramas de protease + 190 gramas de inerte
Protease 100%	20 gramas de protease + 180 gramas de inerte
Protease 150%	30 gramas de protease + 170 gramas de inerte
Protease 100% + Fitase 100%	20 g de protease + 100 g de fitase + 30 g de inerte

4.3 Dieta experimental

Todas as rações foram formuladas à base de milho e farelo de soja e foram produzidas na Fábrica de Ração da FMVZ/USP. Sendo que as rações foram isocalóricas e isoproteicas e a composição percentual calculada, com base, nos valores da composição bromatológica dos ingredientes e níveis nutricionais proposto por Rostagno et al. (2005) para as diferentes fases.

Tabela 2 - Formulação das rações experimentais e composição calculada de acordo com Rostagno et al. (2011).

Ingrediente	Fases de Criação			
	Pré-inicial (1 a 7 dias)	Inicial (8 a 21 dias)	Crescimento (22 a 33 dias)	Final (34 a 42 dias)
Milho (kg)	60.541	61.925	63.841	67.937
Farelo de Soja (kg)	31.146	29.616	27.035	23.156
Farinha de Carne (kg)	5.596	29.616	27.035	23.156
Óleo de Soja (kg)	0,372	1.604	3.011	2.961
Sal Comum (kg)	0,442	0,429	0,413	0,400
Clacário Calcítico (kg)	0,091	0,265	0,278	0,290
L-Lisina HCl (kg)	0,384	0,315	0,304	0,334
DL-Metionina (kg)	0,369	0,310	0,290	0,271
Treonina (kg)	0,208	0,161	0,144	0,144
Premix Vit/Min (kg)	0,400	0,400	0,400	0,400
Adsorvente (kg)	0,250	0,250	0,250	0,000
Inclusão de enzima (kg)	0,200	0,200	0,200	0,200
Total	100.000	100.000	100.000	100.000
Níveis Nutricionais Calculados				
Energia Metabolizável (kcal/kg)	2960	3050	3150	3200
Proteína Bruta %	22,400	21,200	19,800	18,400
Cálcio %	0,920	0,841	0,758	0,758
Fósforo Disponível %	0,470	0,401	0,354	0,354
Lisina Total %	1,460	1,342	1,247	1,169
Met+Cis Total %	1,051	0,966	0,910	0,853
Treonina Total %	0,993	0,913	0,848	0,795
Triptofano Total %	0,263	0,242	0,225	0,203
Sódio %	0,220	0,210	0,200	0,195

Suplemento vitamínico e mineral para frangos de corte na fase pré-inicial (níveis por kg de produto): Vitamina A (mínimo) 2.000.000,00 U.I/kg; Vitamina D3 (mínimo) 600.000,00 U.I/kg; Vitamina E (mínimo) 3.000,00 U.I/kg; Vitamina K3 (mínimo) 500,00 mg/kg; Vitamina B1 (mínimo) 600,00 mg/kg; Vitamina B2 (mínimo) 1.500,00 mg/kg; Vitamina B6 (mínimo) 1.000,00 mg/kg; Vitamina B12 (mínimo) 3.500,00 mcg/kg; Niacina (mínimo) 10,00 g/kg; Ácido Pantotênico (mínimo) 3.750,00 mg/kg; Ácido Fólico (mínimo) 250,00 mg/kg; Colina (mínimo) 86,60 g/kg; Ferro (mínimo) 12,50 g/kg; Manganês (mínimo) 17,50 g/kg; Zinco (mínimo) 12,50 g/kg; Cobre (mínimo) 25,00 g/kg; Iodo (mínimo) 300,00 mg/kg; Selênio (mínimo) 50,00 mg/kg.

Suplemento vitamínico e mineral para frangos de corte na fase inicial (níveis por kg de produto): Vitamina A (mínimo) 1.750.000,00 U.I/kg; Vitamina D3 (mínimo) 550.000,00 U.I/kg; Vitamina E (mínimo) 2.750,00 U.I/kg; Vitamina K3 (mínimo) 400,00 mg/kg; Vitamina B1 (mínimo) 500,00 mg/kg; Vitamina B2 (mínimo) 1.250,00 mg/kg; Vitamina B6 (mínimo) 750,00 mg/kg; Vitamina B12 (mínimo) 3.000,00 mcg/kg; Niacina (mínimo) 8.750,00 mg/kg; Ácido Pantotênico (mínimo) 3.250,00 mg/kg; Ácido Fólico (mínimo) 200,00 mg/kg; Colina (mínimo) 82,00 g/kg; Ferro (mínimo) 12,50 mg/kg; Manganês (mínimo) 17,50 g/kg; Zinco (mínimo) 12,50 g/kg; Cobre (mínimo) 25,00 g/kg; Iodo (mínimo) 300,00 mg/kg; Selênio (mínimo) 50,00 mg/kg.

Suplemento vitamínico e mineral para frangos de corte na fase de crescimento (níveis por kg de produto): Vitamina A (mín.) 1.500.000,00 U.I/kg; Vitamina D3 (mín.) 500.000,00 U.I/kg; Vitamina E (mín.) 2.500,00 U.I/kg; Vitamina K3 (mín.) 400,00 mg/kg; Vitamina B1 (mín.) 350,00 mg/kg; Vitamina B2 (mín.) 1.000,00 mg/kg; Vitamina B6 (mín.) 500,00 mg/kg; Vitamina B12 (mín.) 2.500,00 mcg/kg; Niacina (mín.) 7.500,00 mg/kg; Ácido Pantotênico (mín.) 2.750,00 mg/kg; Ácido Fólico (mín.) 150,00 mg/kg; Colina (mín.) 60,40 g/kg; Cobre (mín.) 25,00 g/kg; Ferro (mín.) 12,50 g/kg; Manganês (mín.) 17,50 g/kg; Zinco (mín.) 12,50 g/kg; Iodo (mín.) 300,00 mg/kg; Selênio (mín.) 50,00 mg/kg.

Suplemento vitamínico e mineral para frangos de corte na fase final (níveis por kg de produto): Vitamina A (mínimo) 1.250.000 U.I/kg; Vitamina D3 (mínimo) 250.000 U.I/kg; Vitamina E (mínimo) 2.000 U.I/kg; Vitamina K3 (mínimo) 400 mg/kg; Vitamina B2 (mínimo) 500 mg/kg; Vitamina B12 (mínimo) 1.250 mcg/kg; Niacina (mínimo) 5.000 mg/kg; Ácido Pantotênico (mínimo) 2.250 mg/kg; Colina (mínimo) 31,900 g/kg; Ferro (mínimo) 12,500 g/kg; Manganês (mínimo) 17,500 g/kg; Zinco (mínimo) 12,500 g/kg; Cobre (mínimo) 2.000 mg/kg; Iodo (mínimo) 300,000 mg/kg; Selênio (mínimo) 50,000 mg/kg.

A inclusão recomendada pelo fabricante é de 200 ppm para o produto comercial contendo a protease, de 400 ppm para a amilase e de 1000 ppm para a fitase.

4.4 Avaliação quantitativa dos grânulos de zimógenos

Aos 21 e aos 42 dias de idade uma ave de cada repetição foi sacrificada por deslocamento cervical a fim de coletar três segmentos (lóbulo dorsais, ventrais e esplênicos) para avaliação quantitativa por histologia dos grânulos de zimógenos. As amostras foram fixadas em formol tamponado por 24 horas e passaram por soluções crescentes de álcool, sendo posteriormente colocadas em Xilol e embebidas em parafina, realizou-se o corte de 5 micrometros, sendo os materiais corados com hematoxilina fosfotúngstica de Mallory, a qual cora os grânulos de zimogênio de cor vinho quando visualizados em microscópio óptico. Cada segmento do pâncreas foi seccionado três vezes no micrótomo de forma espaçada, sendo que foram tiradas três fotos de diferentes pontos de cada segmento seccionado, totalizando desta forma 216 fotos. Foram analisadas um total de 3888 fotos no decorrer do experimento.

A montagem e coloração das lâminas histológicas (fotografia 2) foram realizadas no Laboratório de Histologia- Departamento de Medicina Veterinária da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP, Pirassununga/SP.

Fotografia 2 - Avaliação histopatológica dos grânulos de zimógenos

Fonte: própria

4.5 Protocolo de preparação da hematoxilina fosfotúngstica de Mallory

O protocolo foi realizado segundo BEHMER et. al (1976).

Hematoxilina cristalizada..... 1 g

Ácido fosfotúngstico cristalizado..... 20g

Água destilada.....1.000mL

Permanganato de potássio sol aq. 0,25%.. 5 ou 10mL

4.6 Desparafinização

O protocolo foi realizado segundo BEHMER et. al (1976).

Xilol I	15 minutos
Xilol II.....	15 minutos
Álcool 100%	3 minutos
Álcool 95%	3 minutos
Álcool 70%	3 minutos
Água	5 minutos

A hematoxilina e o ácido fosfotúngstico foram dissolvidos em água quente. As soluções de Hematoxilina e Ácido fosfotúngstico foram deixadas esfriar e foi adicionado 10ml de solução aquosa 0,25% de permanganato de potássio, para cada 100ml de corante ou 0,2 ml de água oxigenada. A coloração foi realizada por 12 a 24 horas em temperatura ambiente.

4.7 Análise das imagens

As imagens foram capturadas pelo microscópio Leicaicc50 HD® e foram analisadas através do programa Image Pro Plus®. Os grânulos de zimógenos foram identificados (Fotografias 3 e 4) e através do programa foi gerado no Excel® a porcentagem de grânulos de zimógenos na imagem, sendo considerado a média das porcentagens de grânulos das imagens como o índice de grânulos de zimógenos presentes para cada tratamento e repetição.

Fotografia 3 - Marcação dos grânulos de zimógenos pelo programa Image Pro Plus®

Fonte: própria

Fotografia 4 - Visualização dos grânulos de zimógenos no programa Image Pro Plus®

Fonte: própria

4.8 Análise estatística

Os experimentos I e II foram avaliados pela regressão polinomial com efeito quadrático e linear respectivamente. O experimento III foi avaliado pelo Teste de Tukey, sendo que o nível de significância utilizado nos três experimentos foi de 5%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Experimento I

Os dados obtidos no experimento I estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3 - Avaliação do efeito da adição da enzima protease na ração sobre os grânulos de zimógenos

	Protease				CV	P	Efeito	R ²
	Controle	50%	Protease 100%	Protease 150%				
21 dias	0,280	0,238	0,251	0,113	29,91	0,047	Quadrático	0,7453
42 dias	0,137	0,085	0,148	0,173	35,86	0,045	Quadrático	0,6589

No experimento I com o uso de Protease 50%, Protease 100% e Protease 150%, foi possível observar uma redução significativa ($P < 0,05$) com efeito quadrático na presença dos grânulos de zimógenos nos três testes realizados e em ambas as coletas realizadas. Sendo que na coleta realizada com 21 dias foi observado um decréscimo no índice de grânulos de zimógenos com o aumento do nível de protease na ração.

Esta redução na síntese de enzima endógena pode ser explicada pelo aumento de concentração de enzimas na luz intestinal, a qual em conjunto com a presença de substratos e produtos da hidrólise dos substratos são responsáveis por um mecanismo de feedback negativo na síntese endógena de enzimas pancreáticas. Outra teoria para a redução de síntese de enzima pancreática é devido após o fornecimento de enzima exógena haver um aumento no nível de enzima circulante que através de uma circulação enteropancreática gera um mecanismo de feedback negativo na síntese de enzima pancreática (ROTHMAN, 2002).

Estes resultados estão de acordo com os valores encontrados por Nir, 1998 que mostrou uma redução na síntese de amilase, tripsina e quimiotripsina ao suplementar rações de frango de corte com estas enzimas e com Mahagna (1995) que após suplementação da dieta com um complexo enzimático de amilase e protease observou uma redução na síntese de quimiotripsina pelo pâncreas.

5.2 Experimento II

Os dados obtidos no experimento II estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4 - Avaliação do efeito da adição da enzima amilase na ração sobre os grânulos de zimógenos

	Amilase		Amilase					
	Controle	50%	Amilase 100%	150%	CV	P	Efeito	R ²
21 dias	0,280	0,134	0,187	0,119	47,22	0,0021	Linear	0,7126
42 dias	0,137	0,138	0,170	0,133	39,42	0,6306	NS	----

NS= $P > 0,05$

No experimento II, com a adição de amilase nas concentrações de 50, 100 e 150% em relação a dosagem recomendada pelo fabricante evidenciou que durante a formação do sistema de síntese de amilase pelas aves que começa com 1 dia de vida atingindo seu pico com 21 dias houve menor presença de grânulos de zimógenos pelo pâncreas nas aves tratadas quando comparadas com as aves controle, utilizando significância estatística $P < 0,05$, esta redução nos grânulos está em acordo com a redução do peso do pâncreas observado por Garcia et al. (2003) aos 7 e 28 dias de vida das aves após suplementação com amilase e com Jiang et. al, 2088, que pode observar uma redução linear da amilase pancreática após o aumento na suplementação da enzima exógena, assim como uma redução na expressão de RNA mensageiro para amilase.

Esta interferência da amilase exógena sobre a amilase pancreática deve ser avaliada com cautela, pois conforme demonstrado por Mahagna (1995), a retirada da amilase exógena via ração das aves com 15 dias interfere na síntese de amilase pancreática das aves aos 42 dias de vida.

Na coleta realizada com 42 dias não houve diferença significativa.

5.3 Experimento III

Os dados obtidos no experimento III estão apresentados na tabela 5.

Tabela 5- Avaliação do efeito da adição da associação das enzimas amilase + fitase e protease + fitase na ração sobre os grânulos de zimógenos

	Controle	Amilase 100%	Amilase 100% + Fitase 100%	Protease 100%	Protease 100% + Fitase 100%	CV	P
1°							
Coleta	0,256 a	0,187 ab	0,164 ab	0,251 a	0,088 b	32,84	0,0002
2°							
Coleta	0,137	0,17	0,115	0,148	0,154	36,73	0,478

Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

A fitase apresenta uma importante função na absorção de proteínas pelas aves devido a sua capacidade em separar as proteínas do ácido fítico e inibir alterações na estrutura das proteínas que impeçam a sua quebra pelas proteases (COWIENSON, 2006). O uso da fitase associada a protease possibilitou melhor ação da protease, possibilitando a quebra de proteínas que anteriormente estavam ligadas ao ácido fítico, a redução da proteína presente na luz intestinal interferiu na redução do índice de presença de grânulos de zimógenos no pâncreas. O efeito sinérgico da fitase associado a protease exógeno tem sido citado por outros pesquisadores (SELLE, 2007).

A presença de diferença estatística ($P > 0,05$) entre o teste controle e o teste com protease 100% + Fitase 100% pode ser sugerida pelas proteínas ligadas ao ácido fítico continuarem estimulando o pâncreas a sintetizar protease. Os outros testes não mostraram diferença significativa quando comparados com o controle.

6 CONCLUSÃO

O uso de protease nas concentrações de 50, 100 e 150% mostrou-se capaz de reduzir a síntese dos grânulos de zimógenos em ambas as idades de 21 e 42 dias.

O uso da enzima amilase via ração foi capaz de reduzir a síntese dos grânulos de zimógenos apenas na primeira fase do experimento, o que fortalece o conceito que a amilase exógena é viável apenas na fase inicial de produção do frango de corte.

O presente trabalho mostra a importância da associação da enzima fitase quando a protease é fornecida às aves, possibilitando a quebra do ácido fítico e melhor ação da enzima sobre as proteínas.

O estudo da interferência do uso de enzimas exógenas sobre os aspectos produtivos como ganho de peso, conversão alimentar e consumo de ração têm sido amplamente estudado, no entanto a atividade destas enzimas sobre a parte fisiológica das aves deve ser criteriosamente compreendida para que seja possível o uso adequado dos complexos enzimáticos no setor avícola.

REFERÊNCIAS

- ABDUL-AZIZ, T.; FLETCHER O. **Endocrine System**. In: Fletcher, O. editor. **AVIAN HISTOPATHOLOGY**. North Caroline State University: Ed. American Association of Avian Pathologists, 2008, 324-347.
- BALAMURUGAN, R., CHANDRASEKARAN, D. Effect of multienzyme supplementation on weight gain, feed intake, feed efficiency and blood glucose in broiler chickens. *Indian J. Sci. Technol.* 3: 193-195, 2009.
- BEHMER, A. O.; TOLOSA C. M. E.; NETO F. G. A. **Manual de técnicas para Histologia normal e patológica**. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Departamento de cirurgia. Dicipina de técnicas cirúrgica e cirurgia experimental. Editora da Universidade de São Paulo - 1976
- BRITO C.O., ALBINO L.F.T., ROSTAGNO H.S. ET AL. Adição de complexo multienzimático em dietas à base de soja extrusada e desempenho de corte. *R. Bras. Zootec.* 35(2):457-461, 2006.
- COWIESON, A. J.; ACAMOVIC, T.; BEDFORD, M. R. Phytic acid and phytase: implications for protein utilization by poultry. **Poultry Science**, Champaign, v. 85, p. 878-885, 2006.
- CHOCT M., HUGHES R.J., WANG J. ET AL. Increased small intestinal fermentation is partly responsible for the anti-nutritive activity of non-starch polysaccharides in chickens. **British Poultry Science**. 37(3):609-621, 1995.
- CHOCT M. Enzyme supplementation of poultry diets based on viscous cereals. **In: Bedford, M.R. & Partridge, G.G. (ed.) Enzymes in farm animal nutrition**. Oxford, CAB Publishing, 2001.
- CHOCT M., KOCHER A., WATERS D.L.E., ET AL. A comparison of three xylanases on the nutritive value of two wheats for broiler chickens. **British Journal of Nutrition**, v.92, p.53-61, 2004.
- DANDRIFOSSE G., SIMA L. Transport of Amylase across the Apical Membrane of the Pancreatic Exocrine Cells, **Plungers Archive**. 357, 361-368, 1975.
- DARI, R. L. Porque utilizar um blend de enzimas e não apenas uma? **In: SEMINARIOS TÉCNICOS NUTRON**, 2006, Campinas. Anais... Campinas: Nutron, 2006. CD-ROM.
- EL-KATCHA MOHAMED. I., MOSAAD.A. SOLTAN1, HANY.F. EL-KANEY2 AND EL-SAYED.R. KARWARIE. Growth Performance, Blood Parameters, Immune response and Carcass Traits of Broiler Chicks Fed on Graded Levels of Wheat Instead of Corn Without or With Enzyme Supplementation. **Alexandria Journal of Veterinary Sciences**, 2014, 40:95-111
- FIALHO E.T. Alimentos alternativos para suínos. *Anais do Simpósio Brasileiro de Nutrição Animal*. Itapetinga, SP, p.35-98, 2003.
- FORSTNER, J. F.; FORSTNER, G. G. **Gastrointestinal mucus**. 3. Ed. New York: Raven 1994. p. 1255-1283.

FURLAN, R. L., M. MACARI, AND S. M. SUGETA. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**, FUNEP/UNESP, Fata, Jaboticabal, São Paulo-SP, Brasil. 2002.

GARCIA M.I., ARANÍBAR M.J., LÁZARO R., MEDEL P. & MATEOS G.G. -Amylase supplementation of broiler diets based on corn. **Poultry Science**. 82:436-442, 2003.

GUENTER W. Practical experience with the use of enzymes. In: Marquardt R.R. & Han Z. (ed.) **Enzymes in Poultry and Swine Nutrition**. IDRC, 1997.

HAI, L.; RONG, D.; ZHANG, D.Z.Y. The effect of thermal environment on the digestion of broilers. **Journal Animal Physiology and Animal Nutrition**, v.83, n.1, p.57-64, 2000.

JIANG, Z.; ZHOU, Y.; LU, L.; HAN, Z.; WANG, T.; Effects of different levels of supplementary alpha-amylase on digestive enzyme activities and pancreatic amylase mRNA expression of young broilers. **Asian-Australian Journal of Animal Science**. v. 21. n.1. p. 97-102. 2008.

LIMA, A.C.F., et al. Atividade Enzimática Pancreática de Frangos de Corte Alimentados com Dietas Contendo Enzima ou Probiótico. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**. v.4. n. 3. p. 187-193, 2002

MADRID, J., CATALÁ-GREGORI, P., GARCÍA, V., HERNÁNDEZ, F. Effect of a multienzyme complex in wheat-soybean meal diet on digestibility of broiler chickens under different rearing conditions. **Italian Journal Animal Science**. 9 (1): Reterived from E:\Documents\broiler enzyme112.mht, 2010.

MAHAGNA, M., I. NIR, M. LARBIER, AND Z. NITSAN. Effect of age and exogenous amylase and protease on development of the digestive tract, pancreatic enzyme activities and digestibility of nutrients in young meat-type chicks. **Reproduction Nutritional Development**. 35:201-212. 1995.

MARQUARDT, R. R., BRENES A., ZHANG, Z. Use of enzymes to improve nutrient availability in poultry feedstuffs. **Animal Feed Science Technology**. 60(3):321-330, 1996.

MARCHIORO, A. et al. Effects of Aflatoxins on Performance and Exocrine Pancreas of Broiler Chickens. **Avian Disease**, 57:280-284, 2013.

MCCLEARY B.V. Analysis of Feed Enzymes. **In: Bedford, M.R. & Partridge, G.G.** (ed.) **Enzymes in farm animal nutrition**. Oxford, CAB Publishing. 2001.

NITSAN, Z. et al. Growth and development of the digestive organs and some enzymes in broiler chicks after hatching. **British Poultry Science**, London, V. 32, p. 515-523, 1991.

NIR I. Mecanismos de digestão e absorção de nutrientes durante a primeira semana. **In: Conferência Apinco de Ciência e Tecnologia Avícola**; 1998; Campinas, São Paulo. Brasil. p.81-91.

NOBLET, J. et al. Prediction of net energy value of feeds for growing pigs. **Journal of Animal Science**, Champaing, v. 72, p. 344-354, 1994.

ODETALLAH N.H., WANG J.J., GARLICH J.D. & SHIH J.C. Keratinase in starter diets improves growth of broiler chicks. **Poultry Science**. 82:664-670. 2003.

ONDERCI M., SAHIN N., SAHIN K., CIKIM G., AYDÍN A., OZERCAN I. & AYDIN S.. Efficacy of supplementation of alfa-amilaseproducing bacterial culture on the performance, nutrient use, and gut morphology of broiler chickens fed a corn-based diet. **Poultry Science**. 85:505-510. 2006.

OPALINSKI M. **Utilização de enzima e soja integral em rações para frangos formuladas com ingredientes alternativos com base em aminoácidos digestíveis e totais**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2006.

PINHEIRO, D.F.; CRUZ, V.C.; SARTORI, J.R.; PAULINO, M.L.M.V.; Effect of Early Feed Restriction and Enzyme Supplementation on Digestive Enzyme Activities in Broilers. **Poultry Science** 83:1544–1550. 2004.

POURREZA, J., SAMIE, A.H., ROWGHANI, E. Effect of supplemental enzyme on nutrient digestibility and performance of broiler chicks fed on diets containing triticales. **Int. J. Poult. Sci.**,6: 115-117. 2007.

ROLAND D.A. et al. Comparison of Nathuphos and Phyzyme as Phytase Sources for Commercial Layers Fed Corn-Soy Diet. **Poultry Science Association**. 2006.

ROSTAGNO, H.S. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. Viçosa, MG. Editora UFV, 2011. 141p.

ROTHMAN, S., C. LIEBOW AND L. ISENMAN. Conservation of digestive enzymes. **Physiology**. Rev. 82:1-18. 2002.

SANTOS JR. A.A., FEREKET P.R., GRIMES J.L. ET AL. Dietary pentosanase supplementation of diets containing different qualities of wheat on growth performance and metabolizable energy of turkey poults. **International Journal of Poultry Science**. 3(1):33-45. 2004.

SOUZA, L.F.A. **Exposição crônica e cíclica ao calor em frangos de corte: desempenho, metabolização dos nutrientes e atividade de enzimas pancreáticas**. Dissertação de mestrado. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista – Jaboticabal – SP. 2008. 51p.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. SAS. **Language and procedures: Version 8**. Cary,1998. 638p.

SHEPPY, C. The current feed enzyme Market and likely trends. In: BEDFORD, M. R.; PATRIDGE, G. G. **Enzymes in farm nutrition**. Londres: Cab International, 2001. p. 1-10.

SIMSEK, N., L. ERGUN, E. ERGUN, B. ALABAY, AND D. ESSIZ. The effects of experimental aflatoxicosis on the exocrine pancreas in quails (*Coturnix coturnix japonica*). **Archive Toxicology**. 81:583–588. 2007.

SELLE P.H. & RAVIDRAN V. Microbial phytase in poultry nutrition: Review. **Animal Feed Science Technology**. 2007.

THORPE, J.; BEAL, J. D. Vegetable protein meals and the effects of enzymes. In: BEDFORD, M. R.; PATRIDGE, G. G. **Enzymes in farm nutrition**. Londres: Cab international, 2001. p. 125-143.

TORRES, D.M.; TEIXEIRA, A.S.; RODRIGUES, P.B.; BERTECHINI, A.G.; FREITAS, R.T.F.; SANTOS, E.C.; Eficiência das enzimas amilase, protease e xilanase sobre o desempenho de frangos de corte. **Ciência e Agrotecnologia**, v.27, p.1401-1408, 2003.

ROSTAGNO, H. S.; BARBARINO JUNIOR, P.; BARBOSA, W. A. Exigências nutricionais das aves determinadas no Brasil. **In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE EXIGÊNCIAS NUTRICIONAIS DE AVES E SUÍNOS, Anais...** Viçosa: UFV, 1996. p. 361-388.

ZANELLA, I.; SAKOMURA, N.K.; SILVERSIDES, F.G.; FIQUEIRDO, A.; PACK, M.; Effect of enzyme supplementation of broiler diets based on corn and soybeans. **Poultry Science**. 78:561–568. 1999.

ZHU, H. L.; HU, L. L.; HOU, Y. Q.; ZHANG, J.; AND DING B. Y. The effects of enzyme supplementation on performance and digestive parameters of broilers fed corn-soybean diets. **Poultry Science**, 2014 93: 1704-1712.