

## **ESTUDO DA AÇÃO DE ENZIMAS DIGESTIVAS DE FRANGOS DE CORTE NA FASE INICIAL COM ADIÇÃO DE AMINOÁCIDOS SINTÉTICOS**

Édina de Fátima Aguiar; Erothildes Silva Rohrer Martins, Maria Borges Pereira, Daniel Vitor Teixeira, João Marcos Pereira de Paula, Leticia Ferreira Costa, Tobias Oliveira Inácio, Marcos Speroni Ceron, Pedro Ivo Sodré Amaral, Ana Cristina Silva Figueiredo.

E-mail: edinaaguiar@zootecnista.com.br

### **INTRODUÇÃO**

O período de transição que vai desde a formação do embrião até o estágio pós-eclosão nas aves é crítico para o desenvolvimento de todos os sistemas, em particular o trato gastrointestinal, no qual é preconizado que na primeira semana de vida da ave ocorre o processo de maturação, onde o tamanho relativo do intestino e a produção enzimática são otimizados (MAIORKA et al., 2002).

Em frangos, as principais dissacaridases presentes na membrana apical dos enterócitos são a sacarase e a maltase. O complexo sacarase-isomaltase hidrolisa a união  $\alpha$  1-6 dos oligossacarídeos resultantes da digestão realizada pela amilase pancreática, formando glicose e frutose. Já a enzima maltase (maltase-glucoamilases) hidrolisa as uniões  $\alpha$  1-4 e  $\alpha$  1-6 dos dissacarídeos e oligossacarídeos liberando glicose (GALAND & FOSTNER, 1974).

No que se refere à atividade de absorção intestinal, a glicose é absorvida pela membrana citoplasmática no ápice dos enterócitos, e seu movimento, assim como da sacarose, frutose e alguns aminoácidos sendo eles: alanina, taurina e glutamina para dentro das células ocorre contra um gradiente de concentração, sendo realizado por co-transporte com íons  $\text{Na}^+$ , cuja concentração é maior fora do que dentro da célula, utilizando, portanto os transportadores de membrana (BOLELI et al., 2002).

Outra enzima importante para a digestão alimentar é a fosfatase alcalina, que em estudos com mamíferos, a sua presença na membrana em escova do intestino delgado, tem sido associada funções digestivas importantes relacionada a regulação da absorção de lipídeos, e atuando também como componente da barreira imune da mucosa do intestino, prevenindo a invasão de bactérias (GOLDEBERG et al., 2008).

Contudo, o presente estudo teve como objetivo avaliar as atividades enzimáticas das dissacaridases (maltase e sacarase) e a fosfatase alcalina na mucosa do intestino delgado de frangos de corte suplementados com aminoácidos sintéticos na dieta.

### **MATERIAL E MÉTODOS**

O experimento foi desenvolvido no aviário experimental FMVZ/UNESP/Botucatu, sob o protocolo do comitê de ética de uso de animais 076/2017. Foram utilizados 340 pintos de um dia de idade, machos, da linhagem Cobb<sup>®</sup> 500, por 21 dias. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e cinco repetições de 17 aves em cada. Os tratamentos de ambos os experimentos foram: 1- Ração basal; 2- Ração basal com suplementação de 1% de glutamina; 3- Ração basal com suplementação de 1% de ácido glutâmico; 4- Ração basal com suplementação de 2% da combinação de glutamina e ácido glutâmico.

Para o experimento, foram utilizados somente 20 boxes. Cada boxe tinha uma área de 1,5m<sup>2</sup> e se encontrava equipado com um comedouro tubular e um bebedouro pendular. O

galpão experimental era dotado de ventiladores distribuídos de forma a promover ventilação homogênea em todos os boxes.

O sistema de manejo adotado foi o tradicionalmente utilizado nas criações comerciais de frangos de corte. A cama utilizada foi de maravalha reaproveitada de um lote comercial de frangos de corte, que após ter passado por processo de fermentação sendo coberta com lona plástica em toda sua extensão foi distribuída no aviário. Os dados de temperatura e umidade máxima e mínima foram registrados diariamente utilizando-se um termo-higrômetro de máxima e mínima, sendo a média da temperatura 30,9°C e 21,3°C, e umidade relativa de 85,60% e 43,86% respectivamente. O arraçoamento foi dividido em 2 fases: pré - inicial (1-7 dias) e inicial (8-21 dias), sendo que as dietas foram formuladas de acordo com Rostagno et al. (2011). As aves receberam água e ração *ad libitum* durante todo o período experimental.

Os tratamentos foram estabelecidos a partir da substituição do amido de milho nas dietas por apresentarem valores energéticos semelhantes aos aminoácidos e ao produto comercial, sendo que no primeiro tratamento foi adicionado o amido de milho (2% de amido de milho), no segundo foi adicionado 1% de glutamina e 1% de amido de milho, no terceiro tratamento foi adicionado 1% de ácido glutâmico e 1% de amido de milho e no quarto tratamento foi adicionado 2% da combinação de glutamina e ácido glutâmico (produto comercial AminoGut<sup>®</sup> que apresenta garantia mínima de 10% de glutamina e 10% de ácido glutâmico). Foram utilizadas dietas isoprotéicas, isocalóricas e isoaminoacídicas elaboradas a base de milho e farelo de soja (Tabela 1).

Tabela 1. Composições centesimais calculadas das dietas basais.

Ingredientes	Pré-inicial (1 a 7 dias)	Inicial (8 a 21 dias)
Milho Moído	52,681	56,845
Farelo de soja (45%)	38,740	35,221
Óleo de soja	2,210	2,163
Fosfato bicálcico	1,910	1,512
Calcário calcítico	0,911	0,921
DL-metionina	0,358	0,288
L-lisina HCl	0,272	0,205
Treonina	0,108	0,060
Bicarbonato de Sódio	0,125	0,125
Cloreto de colina	0,060	0,060
Sal comum	0,425	0,400
Anticoccidiano <sup>1</sup>	0,050	0,050
Suplemento Vit <sup>2</sup>	0,100	0,100
Suplemento mineral <sup>3</sup>	0,050	0,050
Amido de milho	2,000	2,000
Total	100,00	100,00

<sup>1</sup> Salinomicina; <sup>2</sup>Suplemento Vitamínico: MC-MIX Frangos Inicial 1 kg (Mcassab<sup>®</sup>) níveis de garantia/kg de ração para as fases pré-inicial e inicial: Vit. A 11.000 UI; Vit. D3 2.000 UI; Vit. E 16 UI; Vit. K 1,5 mg; Vit B1 1,2 mg; Vit B2 4,5 mg; Vit B6 2mg; Vit. B12 16 µg; Ácido fólico, 0,4 mg; Ácido Pantotênico 9,2 mg; Biotina, 0,06 mg; Niacina, 35 mg; Se, 0,25 mg; <sup>3</sup>Suplemento Mineral: MC-MIX Mineral Aves 0,5 kg (Mcassab<sup>®</sup>) níveis de garantia/kg de ração: Ferro 30 mg; Cobre 9 mg; Manganês 60 mg; Zinco 60 mg; I, 1 mg. EM= Energia Metabolizável, P disp = Fósforo disponível; Lis = lisina; Met + Cist digest = metionina + cistina digestível.

Aos 7 e 14 dias de idade, um total de 48 aves por período analisado foram transportadas até o Abatedouro Experimental da FMVZ – UNESP/Botucatu, no qual foram insensibilizadas por eletronarose e eutanasiadas por corte da veia jugular e artéria carótida. Posteriormente foi retirado o trato gastrointestinal destas aves e coletado os segmentos do intestino delgado, lavados em solução fisiológica gelada, pesados, acondicionados em frascos previamente identificados e congelados em nitrogênio líquido para posterior análise da atividade das enzimas maltase, sacarase e fosfatase alcalina na mucosa intestinal.

Posteriormente as amostras foram descongeladas e em seguida realizadas a raspagem da mucosa com auxílio de uma lâmina de vidro. A mucosa foi pesada, diluída em água deionizada gelada numa proporção de 1:4 (peso: volume) e homogeneizada em homogeneizador tipo Turrax. O extrato obtido foi centrifugado a 4°C por 20 minutos a 14.000xg. Para a determinação das dissacaridasas foi utilizado um espectrofotômetro a 505nm, de acordo com Dahlquist (1964). Alíquotas do homogeneizado foram incubados, com substratos apropriados (sacarose ou maltose) e a glicose liberada durante a reação foi determinada pelo método de glicose-oxidase, utilizando kits comerciais (Bioliqid - Laborclin – Brasil).

Para a determinação da fosfatase alcalina intestinal, o sobrenadante após descongelado foi adicionado ao Kit comercial (Fosfatase Alcalina – AMP – Laborclin – Brasil), de acordo com a metodologia indicada pelo fabricante e as leituras foram feitas em espectrofotômetro a 405nm, em 3 tempos (0, 1, 2 e 3 min).

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo programa computacional SAS - Statistical Analysis System (versão 9.0), pelo procedimento *Proc MIXED*. As médias entre os tratamentos foram estimadas usando-se o LSMEANS e a comparação entre elas, quando necessária, realizada por meio da probabilidade da diferença (PDIFF), usando o teste de *Tukey* a 10%.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Aos 7 dias de idade, a atividade específica da enzima maltase não foi influenciada pelos diferentes tratamentos, enquanto que a enzima sacarase apresentou tanto no segmento do duodeno como no íleo, uma maior atividade enzimática para o tratamento controle em relação aos demais (Tabela 2). Com relação ao segmento de jejuno, o tratamento com 1% de ácido glutâmico foi que apresentou menor atividade da enzima sacarase. Para a atividade específica da enzima fosfatase alcalina intestinal, no segmento do jejuno, o tratamento controle apresentou uma maior atividade em relação ao tratamento com 2% da combinação de glutamina e ácido glutâmico, não diferenciando dos demais tratamentos. Estes resultados apresentam-se discordantes dos encontrados por Sakamoto et al. (2011), que não encontraram diferença para estas enzimas em aves no mesmo período analisado e com dietas suplementadas com diferentes níveis da combinação de glutamina e ácido glutâmico.

Nesse estudo foi possível observar no tratamento controle alta atividade específica da sacarase, o que leva a inferir que esse resultado pode ter ocasionado devido à adição de amido de milho às dietas. Moran Jr. (1985) preconiza que a digestão e absorção de carboidratos são altamente adaptáveis de acordo com os níveis utilizados na dieta.

Segundo Traber et al. (1991), a expressão da fosfatase alcalina é um indicador da maturação dos enterócitos na mucosa intestinal, apresentando maior atividade no segmento de duodeno, sendo menor no segmento de íleo. De maneira similar a esses dados, os resultados

encontrados mostraram diminuição da atividade da fosfatase alcalina desde o segmento de duodeno até o segmento de íleo.

Tabela 2. Médias da atividade enzimática específica da maltase e sacarase (U/mg tecido) e da fosfatase alcalina (U/L) da mucosa intestinal de frangos de corte suplementados com glutamina e ácido glutâmico isolados e em combinação aos 7 dias de idade

Tratamentos						
Duodeno						
Variáveis	Controle	L-Gln (1%)	L-Glu (1%)	Gln/Glu (2%)	Médias	Prob
Maltase	0,643	0,966	1,140	0,738	0,871	0,132
Sacarase	0,168A	0,148B	0,142B	0,147B	0,151	0,007
Fosf. Alc.	455,23	844,86	627,15	489,60	604,21	0,304
Jejuno						
Maltase	1,120	0,778	1,058	0,968	0,981	0,116
Sacarase	0,118A	0,124A	0,093B	0,120A	0,114	0,070
Fosf. Alc.	276,59A	222,78A	195,14AB	125,21B	204,93	0,068
Íleo						
Maltase	1,217	1,023	0,996	1,091	1,082	0,426
Sacarase	0,149A	0,123B	0,123B	0,113B	0,127	0,044
Fosf. Alc.	168,05	74,72	58,70	47,17	87,18	0,405

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si pelo Teste de Tukey ( $p < 0,10$ ); Fosf. Alc. = Fosfatase Alcalina (U/L); L-Gln=Glutamina; L-Glu=Ácido Glutâmico; Gln/Glu= Combinação de glutamina e ácido glutâmico; Prob=Probabilidade.

Aos 14 dias de idade, a atividade das enzimas não foi influenciada pelos tratamentos nos diferentes segmentos (Tabela 3). Sakamoto et al. (2011) também não relataram influência dos tratamentos na atividade das enzimas nessa fase de criação, exceto diferença para a atividade específica da maltase no segmento de jejuno. Por outro lado, Pinheiro et al. (2004) em seus estudos com aves submetidas a restrição alimentar em período inicial de criação e com dieta não suplementada com complexo enzimático, mostraram um aumento da atividade da sacarase, amilase e da lipase, imediatamente após o período de restrição. Por outro lado, foi verificado, que a atividade da maltase foi maior nas aves com restrição alimentar e que receberam uma suplementação na dieta.

Tabela 3. Médias da atividade enzimática específica da maltase e sacarase (U/mg tecido) e da fosfatase alcalina (U/L) da mucosa intestinal de frangos de corte suplementados com glutamina e ácido glutâmico isolados e em combinação aos 14 dias de idade

Tratamentos						
Duodeno						
Variáveis	Controle	L-Gln (1%)	L-Glu (1%)	Gln/Glu (2%)	Médias	Prob
Maltase	0,786	0,753	0,677	0,731	0,737	0,887
Sacarase	0,160	0,153	0,163	0,159	0,158	0,791
Fosf. Alc.	581,27	589,93	298,76	415,15	471,28	0,262
Jejuno						
Maltase	0,793	0,991	1,037	1,038	0,965	0,330

Sacarase	0,111	0,130	0,122	0,127	0,122	0,522
Fosf. Alc.	417,00	457,63	462,88	471,81	452,33	0,979
Íleo						
Maltase	0,835	0,784	1,003	1,024	0,911	0,506
Sacarase	0,153	0,155	0,135	0,131	0,143	0,335
Fosf. Alc.	69,81	91,67	109,36	101,81	93,16	0,690

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si pelo Teste de Tukey ( $p < 0,07$ ); Fosf. Alc. = Fosfatase Alcalina (U/L); L-GLn=Glutamina; L-Glu=Ácido Glutâmico; Gln/Glu= Combinação de glutamina e ácido glutâmico; Prob=Probabilidade.

## CONCLUSÃO

Nas condições em que o experimento foi realizado, a adição de aminoácidos sintéticos na dieta não influenciou a atividade específica das enzimas da mucosa intestinal de frangos de corte.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOLELI, I.C.; MAIORKA, A.; MACARI, M. **Estrutura funcional do trato digestório**. In: Macari M.; Furlan R.L.; Gonzales E. *Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte*. Jaboticabal: Funep; p. 75-96, 2002.
- DAHLQUIST, A. Method for assay of intestinal disaccharidases. **Analytical Biochemistry**, v.7, p.447-454, 1964.
- GALAND, G.; FORSTNER G. Membrane protein changes during induction of intestinal disaccharidases in suckling rats. **Gastroenterology**, v.66, p.693-693, 1974.
- GOLDBERG, R.F.; AUSTEN Jr., W.G. ZHANG, X.; MUNENE, G. MOSTAFA, G. Intestinal alkaline phosphatase is a gut mucosal defense factor maintained by enteral nutrition. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, v.105, n.9, p.3551-3556, 2008.
- MAIORKA, A.; BOLELI, I.C.; MACARI, M. Desenvolvimento e Reparo da mucosa intestinal. In: MACARI, M.; FURLAN, R.L.; GONZALES, E. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. FUNEP/UNESP, Jaboticabal, São Paulo, p.113-123, 2002.
- MORAN Jr, E.T. Digestion and absorption of carbohydrates in fowl and events through prenatal development. **Journal of Nutrition**, p.115: 665, 1985.
- ROSTAGNO, H.S. et al. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. 3 ed. Viçosa: UFV, Departamento de Zootecnia, 2011.
- PINHEIRO, D.F.; CRUZ, V.C.; SARTORI, J.R.; VICENTINI PAULINO, M.L. Effect of early feed restriction and enzyme supplementation on digestive enzyme activities in broilers. **Poultry Science**, v.83, p.1544-1550, 2004.
- SAKAMOTO, M. I.; FARIA, D. E.; NAKAGI, V. S.; NEGRÃO, J. A.; ARAÚJO, R. B.; SOUZA, K. M. R.; PREVIERO, T. C. Utilização de glutamina, associada ao ácido glutâmico, sobre o desenvolvimento e a atividade enzimática em frangos de corte **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 63, n. 4, p. 962-972, 2011.
- STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. **SAS User's Guide**: Version 9.2 Review Edition. SAS Institute Inc, Cary, NC, 2009.
- TRABER, M P.G.; GUMUCIO, D.L.; WANG,W. Isolation of intestinal epithelial cells for the study of differential gene expression along the crypt-villus axis. **American Journal Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology**. V. 260, nº6, p. 895-903, 1991.