

CIBELE SILVA MINAFRA

**PRODUÇÃO E SUPLEMENTAÇÃO COM α -AMILASE DE *Cryptococcus flavus*
E *Aspergillus niger* HM2003 NA DIETA DE FRANGOS DE CORTE DE UM A
21 DIAS DE IDADE**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2007**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

M633p
2007

Produção e suplementação com α -amilase de
Cryptococcus flavus e *Aspergillus niger* HM2003 na dieta
de frangos de corte de um a 21 dias de idade / Cibele Silva
Minafra. – Viçosa, MG, 2007.
xv, 124f. : il. ; 29cm.

Orientador: George Henrique Kling de Moraes.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Enzimas. 2. Amilase. 3. Nutrição animal. 4. Frango de
corte - Nutrição. 5. *Cryptococcus flavus*. 6. *Aspergillus niger*.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 572.7

CIBELE SILVA MINAFRA

**PRODUÇÃO E SUPLEMENTAÇÃO COM α -AMILASE DE *Cryptococcus flavus*
E *Aspergillus niger* HM2003 NA DIETA DE FRANGOS DE CORTE DE UM A
21 DIAS DE IDADE**

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

APROVADA: 31 de agosto de 2007

Prof. José Henrique Stringhini
(Co-Orientador)

Prof^a Célia Alencar de Moraes

Prof. José Humberto de Queiróz

Prof. Sérgio Luiz de Toledo Barreto

Professor George Henrique Kling de Moraes
(Orientador)

A Deus por me dar a oportunidade de ter os meus pais presentes, pois são o meu viver.

Aos meus Pais pelo apoio e carinho constantes e eternos momentos de alegria.

As minhas irmãs, Carla e Cíntia pela compreensão e incentivo e a minha
sobrinha Maria Clara pelos sorrisos.

A vida não é um corredor reto e tranqüilo que nós percorremos livres e sem empecilhos, mas um labirinto de passagens, pelas quais nós devemos procurar nosso caminho, perdidos e confusos, de vez em quando presos em um beco sem saída. Porém, se tivermos fé, uma porta sempre será aberta para nós, não talvez aquela sobre a qual nós mesmos nunca pensamos, mas aquela que definitivamente se revelará boa.

A. J. Cronin

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e Universidade Federal de Goiás pela oportunidade, pelas condições materiais e pessoais oferecidas na realização desta tese.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, George Henrique Kling de Moraes, meu orientador, pela oportunidade de realização de um grande sonho e também pelo apoio, amizade, orientação e ensinamentos transmitidos.

Aos professores da Universidade Federal do Goiás, José Henrique Stringhini e Cirano José Ulhoa, pelo apoio, orientação constante e muitos ensinamentos. Vocês para mim são exemplos de pessoas tanto na vida profissional quanto pessoal. Agradeço a Deus por poder ter tido a oportunidade de trabalhar com vocês.

Aos professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e da Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa e do Instituto de Ciências Biológicas e da Escola de Veterinária da Universidade Federal do Goiás, pela contribuição para a realização deste projeto de pesquisa.

Aos professores da Escola de veterinária da Universidade Federal de Goiás, Maria Auxiliadora Andrade, Marcos Barcellos Café e Nadja Susana Mogyca e Marco Antônio Viu que não fizeram esforços em me ajudar.

A Bioplus, em especial, Sydnei Mitidieri do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo auxílio, amizade e grandes ensinamentos.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Eduardo Monteiro, Geraldo Dias, Carlos Ferreira, pelo atendimento sempre gentil e sorriso no rosto e ao funcionário do Laboratório de Bioquímica Animal.

Jefferson Dias, pela amizade eterna e colaboração nas análises de laboratório.

Aos colegas da pós-graduação Fernanda Silva, Ana Cláudia Rodrigues, Flávia Fanchiotti, Anderson Barbosa, Heloísa Freitas, Flávio Vieites, Leidimara Feregueti Costa, Larissa Brum, Lílian Fialho (da UFV) e Valdirene, Roberto, Christiane, Vanessa e Regiane (da UFG) e pela amizade.

À minha amiga Sonaide, pelo carinho, solidariedade, apoio e companheirismo. Exemplo de perseverança e determinação. Admiração, admiração e admiração é a palavra certa que encontro para falar da Sonaide.

À Fada e Kica pelos momentos de alegria e felicidade que me proporcionaram que Deus sempre a tenha no seu colo.

A todos que não citei e que me ajudaram direta e indiretamente na feitura desta tese.

Agradeço, sempre, Senhor pela família que me deste.

BIOGRAFIA

CIBELE SILVA MINAFRA, filha de Mário Roberto Minafra e Maria de Lourdes Silva Minafra, nasceu em 05 de setembro de 1974, em Belo Horizonte, Minas Gerais.

Em janeiro de 1997, ingressou no Curso Zootecnia, na Universidade Federal de Viçosa, UFV, concluindo-o em maio de 2002.

Em agosto 2002, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola na UFV.

De 2005 a 2007 conduziu seu trabalho de tese na Universidade Federal de Goiás.

Em agosto de 2007, defendeu tese de Doutorado na UFV.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. Enzimas	5
2.2. Amilases: classificação e importância econômica	6
2.3. Microrganismos produtores de enzimas amilolíticas	9
2.3.1. Gênero <i>Cryptococcus</i>	9
2.3.2. Gênero <i>Aspergillus</i>	10
2.4. Uso de α -amilase em rações animais	11
3. REFERÊNCIAS	15

CAPÍTULO 1. Produção da α -amilase de *Cryptococcus flavus* e de *Aspergillus niger* HM2003

Produção da α -amilase de *Cryptococcus flavus*

1. INTRODUÇÃO	21
2. MATERIAL E MÉTODOS	23
2.1. Procedimentos gerais	23
2.2. Manutenção	23
2.3. Produção	23
2.4. Teste de patogenicidade do <i>Cryptococcus flavus</i>	23
2.5. Indução com amido, milho moído e ração pré-inicial	24
2.6. Induções com extrato de levedura combinada com sulfato de amônio, uréia, ração, amido e YNB	25
2.7. Produção no reator de 2 litros	26
2.8. Análise estatística	27

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
3.1. Teste de patogenicidade do <i>Cryptococcus flavus</i>	27
3.2. Indução com amido, milho moído e ração pré-inicial	28
3.3. Induções com extrato de levedura combinada com sulfato de amônio, uréia, ração, amido e YNB	30
3.4. Produção no reator de 2 litros	33

Produção da enzima α -amilase de *Aspergillus niger* HM2003

1. INTRODUÇÃO	34
2. MATERIAL E MÉTODOS	34
2.1 Procedimentos gerais	34
2.2 Manutenção	34
2.3 Produção	35
2.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida	37
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
Eletroforese em gel de poliacrilamida	38
4. CONCLUSÕES	39
5. REFERÊNCIAS	40

CAPÍTULO 2. Caracterização bioquímica da α -amilase de *Cryptococcus flavus*

1,INTRODUÇÃO	43
2. MATERIAL E MÉTODOS	44
2.1. Procedimentos gerais	44
2.2. Manutenção	44
2.3. Produção da enzima	44
2.3. Determinação da atividade amilolítica	45
2.4. Determinação do pH ótimo	46
2.5. Determinação da temperatura ótima	46
2.6. Avaliação da estabilidade da enzima em pH 3,0, 6,0 e 8,0	48

2.7. Determinação da termoestabilidade	48
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
3.1. Determinação do pH ótimo	48
3.2. Determinação da temperatura ótima	50
3.3. Avaliação da estabilidade da enzima em pH 3,0, 6,0 e 8,0	51
3.4. Determinação da termoestabilidade	51
4. CONCLUSÕES	52
5. REFERÊNCIAS	52

CAPÍTULO 3. Perfil das rações *in vitro* com acréscimo de complexo multienzimático comercial e α -amilase de *Cryptococcus flavus* 5

1. INTRODUÇÃO	55
2. MATERIAL E MÉTODOS	56
2.1. Perfil da α -amilase, açúcares redutores e proteína do complexo Allzyme Vegpro no milho moído, farelo de soja e rações para frangos de corte determinado <i>in vitro</i>	56
2.2. Perfil da α -amilase em rações de frangos de corte em função do tempo	58
2.3. Perfil da α -amilase em rações de frangos de corte em função do pH ácido e básico e da quantidade de enzima	59
2.4. Perfil do açúcar redutor e proteína solúvel das rações experimentais	61
2.5 Análise estatística	62
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
3.1. Perfil da α -amilase, açúcares redutores e proteína do complexo Allzyme Vegpro no milho moído, farelo de soja e rações para frangos de corte determinado <i>in vitro</i>	62
3.2. Perfil da α -amilase em rações de frangos de corte em função do tempo	64
3.3. Perfil da α -amilase em rações de frangos de corte em função do pH do ácido e básico e da quantidade de enzima	67
3.4. Perfil do açúcar redutor e proteína solúvel das rações experimentais	69
4. CONCLUSÕES	72
5. REFERÊNCIAS	72

CAPÍTULO 4. Suplementação da α -amilase de *Cryptococcus flavus* e *Aspergillus niger* HM2003 na dieta de frangos de corte

1. INTRODUÇÃO	74
2. MATERIAL E MÉTODOS	75
2.1. Procedimentos gerais	75
2.2. Desempenho	76
2.3. Digestibilidade	77
2.4. Viscosidade	78
2.5. Análise estatística	79
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
3.1. Temperatura e umidade relativa	79
3.2. Desempenho	79
3.2.1. Suplementação de α -amilase de <i>Cryptococcus flavus</i> e <i>Aspergillus niger</i> HM2003 na dieta de frangos de corte na fase pré-inicial	80
3.2.2. Suplementação de α -amilase de <i>Cryptococcus flavus</i> e <i>Aspergillus niger</i> HM2003 na dieta de frangos de corte na fase inicial	81
3.3. Viscosidade	82
3.4. Digestibilidade das rações e das excretas	83
4. CONCLUSÕES	85
5. REFERÊNCIAS	85

CAPÍTULO 5. Biometria dos órgãos digestivos de frangos de corte com suplementação dietética de α -amilase de *Cryptococcus flavus* e *Aspergillus niger* HM2003

1. INTRODUÇÃO	87
2. MATERIAL E MÉTODOS	89
2.1. Procedimentos gerais	89
2.2. Análise estatística	91
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	92
4. CONCLUSÕES	94
5. REFERÊNCIAS	94

CAPÍTULO 6. Perfil bioquímico do fígado e do pâncreas de frangos de corte alimentados com dieta contendo α -amilase

1. INTRODUÇÃO	97
2. MATERIAL E MÉTODOS	101
2.1. Procedimentos gerais	101
2.2. Análise estatística	103
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	103
4. CONCLUSÕES	107
5. REFERÊNCIAS	107

CAPÍTULO 7. Perfil bioquímico do soro de frangos de corte alimentados com dieta suplementada com α -amilase

1. INTRODUÇÃO	110
2. MATERIAL E MÉTODOS	114
2.1. Procedimentos gerais	114
2.2. Análise estatística	116
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	117
4. CONCLUSÕES	119
5. REFERÊNCIAS	119
CONSIDERAÇÕES FINAIS	123

RESUMO

MINAFRA, Cibele Silva, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2007. **Produção e suplementação com α -amilase de *Cryptococcus flavus* e *Aspergillus niger* HM2003 na dieta de frangos de corte de um a 21 dias de idade.** Orientador: George Henrique Kling de Moraes. Co-Orientadores: José Henrique Stringhini, Cirano José Ulhoa, Maria Goreti de Almeida Oliveira e Tânia Toledo de Almeida.

A suplementação da enzima α -amilase é importante para desenvolvimento do pâncreas e para digestão do amido resistente em aves. Produziu-se extrato contendo α -amilase com *Cryptococcus flavus* com meio do extrato de levedura comercial e ração pré-inicial e com *Aspergillus niger* HM2003 com meio de proteína de soja e amido comercial. A α -amilase do *Cryptococcus flavus* foi caracterizada apresentando boa estabilidade em pH (3,0 a 9,0) com 80% de rendimento e temperatura (30 a 70°C) com rendimento de 90% para aplicação na ração e resistir ao trato gastrointestinal sem perda de atividade. A avaliação *in vitro* de rações com enzimas apresentou pela dosagem com açúcar redutor (0,300 μ mol), amilase (9,0 U/mL) e proteína solúvel (15 mg), com ação enzimática potencializada em rações pré-iniciais. Foram utilizados 360 pintos de corte, de um dia, machos, Cobb, de um a 21 dias, e peso médio inicial de 50,0 g, criados em baterias. O delineamento experimental inteiramente casualizado foi adotado, com ou sem α -amilase produzida por *Cryptococcus flavus* e *Aspergillus niger* HM2003, consistindo de três tratamentos para a fase pré-inicial e três para a fase inicial com cinco repetições de 12 aves cada. Os tratamentos consistiram de dietas a base de milho e farelo de soja, nos períodos pré-inicial (1 a 7 dias) e inicial (8 a 21 dias). Os animais receberam dietas e água à vontade nos dois períodos experimentais. Não foram observados efeitos significativos ($P < 0,05$) para desempenho. Houve maior retenção de nitrogênio na fase pré-inicial com α -amilase de *Aspergillus niger* HM2003. Não houve efeito significativo ($P > 0,05$) da viscosidade da digesta e da ração para os tratamentos. A α -amilase afetou o metabolismo do fígado e do pâncreas, pois reduziu o peso relativo do pâncreas aos sete e 21 dias em 17,02% e 23,61%, respectivamente, e do fígado aos 21 dias em 20,94%. A atividade da enzima amilase no pâncreas diminuiu 5,23% aos sete dias para fase pré-inicial e 17,45% aos 21 dias para fase inicial. No fígado, aos sete e 21 dias, para fases pré-inicial e inicial, os valores não foram significativos para: concentração de proteína (1,80 e 1,41 g/dL), glutamato-oxaloacetato transaminase (229,57 e 199,82 UI/L) e glutamato-piruvato transaminase (71,82 e 63,83 UI/L). A atividade da fosfatase alcalina foi significativa aos sete dias, com menor valor na ração sem suplementação amilase (227,36 UI/L), e aos 21 dias não houve diferença

significativa (261,77 UI/L). Na fase pré-inicial apresentaram os seguintes valores significativos para os parâmetros sanguíneos, aos sete dias de idade: cálcio (6,90 e 5,99 mg/dL), fósforo (4,76 e 6,24 mmol/L), cloro (124,43 e 141,49 mmol/L), proteína plasmática (2,0 e 2,50 g/dL). Os parâmetros não significativos aos sete dias foram: potássio (6,35 mmol/L), atividade enzimática da fosfatase alcalina (974,77 UI/L) e amilase (563,89 U/dL). Na fase inicial aos 21 dias os resultados significativos foram: fósforo (4,98 e 4,99 mmol/L), proteína plasmática (2,97 e 3,12 g/dL). Os parâmetros não significativos foram: cálcio (5,69mg/dL), cloro (133,34 mmol/L), atividade enzimática da fosfatase alcalina (966,90 UI/L) e amilase (560,20 U/dL). Estes resultados serão usados como referência para a comunidade científica, pois ainda não são conhecidos valores no soro para rações contendo suplementação exógena de α -amilase.

ABSTRACT

MINAFRA, Cibele Silva, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2001. **Production and supplementation of α -amylase from *Cryptococcus flavus* e *Aspergillus niger* HM2003 in broiler diets to one and 21 days of age.** Adviser: George Henrique Kling de Moraes. Co-Advisers: José Henrique Stringhini, Cirano José Ulhoa, Maria Goret de Almeida Oliveira and Tânia Toledo de Almeida.

The α -amylase supplementation is important to pancreas development and for resistant starch for poultry. α -amylase extract obtained from *Cryptococcus flavus* was produced in a yeast extract based medium and pre-starter broiler ration and *Aspergillus niger* HM2003, with soybean protein and commercial starch. α -amylase from *Cryptococcus flavus* was characterized and presented good stability in pH (3,0 a 8,0) with 80% produce and temperature (30 a 70°C) with produce 90% to be used in commercial rations and resist to gastrointestinal tract without lost of activity. Evaluation *in vitro* of rations with enzymes showed good results by reducing sugars analysis (0,300 μ mol), α -amylase (9,0U/mL) and soluble protein (15 mg), with potential enzymatic action in pre-starter ration. A total of 360 one-day-old male broiler chicks Cobb, from one to 21 days, and mean starter weight of 50g, raised in heated batteries and allotted in a completely randomized design with presence or absence of α -amylase produced by *Cryptococcus flavus* and *Aspergillus niger* HM2003, consisting of three treatment for pre-starter ration and three for starter ration with five replicates of 12 birds each. Rations were based on corn and soybean meal, in pre-starter phase (1 to 7 days of age) and starter phase (8 to 21 days). Animals received diets and water *ad libitum* in all experimental period. No significative effects ($P < 0.05$) were observed for performance. Nitrogen retention was higher in pre-starter phase with *Aspergillus niger* HM2003 α -amylase supplementation. No significative effects were observed for digesta and ration viscosity for treatments. The α -amylase supplementation affected liver and pancreas metabolism and reduced relative weight at seven and 21 days of age in 17.02% and 23.61%, respectively, and liver at 21 days in 20.94%. Amylase activity in pancreas reduced 5.23% at seven days for pre-starter phase and 17.45% at 21 days for starter phase. In liver, at seven and 21 days, for pre-starter and starter, the values didn't differ significantly for protein concentration (1.80 and 1.41 g/dL), glutamate-oxalacetate transaminase (229.57 and 199.82 UI/L) and glutamate-pyruvate transaminase (71.82 and 63.83 UI/L). The alkaline phosphatase were significative at seven days, with lower value in ration without amylase

supplementation (227.36 UI/L) and at 21 days didn't occurred any statistical difference (261.77 UI/L). In pre-starter phase the blood parameters observed were at seven days of age: calcium (6.90 and 5.99mg/dL), phosphorus (4.76 and 6.24 mmol/L), chloride (124.43 and 141.49 mmol/L), and plasma protein (2.0 and 2.5 g/dL). Non-significative parameters at seven days were: potassium (6.35 mmol/L), alkaline phosphatase activity (974.77 UI/L) and amylase (563.89 U/dL). In starter phase at 21 days, significative results were: phosphorus (4.98 and 4.99mmol/L), plasmatic plasmatic (2.97 and 3.12 g/dL). Non-significative parameters were: calcium (5.69 mg/dL), chloride (133.34 mmol/L), alkaline phosphatase activity (966.90 UI/L) and amylase (560.20 U/dL). These results can be used as reference for scientific community, but serum values are not yet well-known for broilers fed rations containing α -amylase exogenous supplementation.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Avanços têm ocorrido na nutrição avícola nas últimas décadas e, diante desta evolução, os pesquisadores esforçam-se na busca de alternativas que tornem possível a formulação de rações mais eficientes e econômicas, uma vez que a alimentação constitui o item de maior custo na produção do frango de corte (COTTA et al., 2002).

GHAZALAH et al. (2005) afirmaram que a suplementação enzimática melhora o desempenho animal e permite a redução de energia na formulação das rações animais. CHOCT (2006) colocou a utilização de enzimas, como alternativa para o uso de antibióticos, promovendo efeitos benéficos de desempenho e saúde dos animais.

A biotecnologia tem contribuído com a nutrição, por meio do lançamento de aditivos, como enzimas, que adicionados às rações melhoram a eficiência alimentar e a produtividade das aves (ZANELLA, 2001). Algumas justificativas para estas pesquisas, são que as complementações de enzimas endógenas insuficientemente produzidas, o fornecimento às aves de enzimas que elas não conseguem sintetizar, a utilização de ingredientes muitas vezes disponíveis e de aproveitamento limitado devido a sua composição química ou a presença de inibidores nutricionais (FISCHER, 2002; LIMA et al., 2002). Aditivos enzimáticos não possuem função nutricional direta, mas auxiliam o processo digestivo melhorando a digestibilidade dos nutrientes presentes na dieta (CAMPESTRINI et al., 2005).

Todas as enzimas empregadas na nutrição animal são hidrolases, usadas diretamente como aditivos alimentares para suplementar a atividade digestiva endógena do animal hospedeiro, incluindo proteases e amilases. As enzimas atuam na remoção dos fatores antinutricionais, tornando certos nutrientes disponíveis para absorção e também aumentando o valor energético de ingredientes mais baratos (WALSH et al., 1993).

Recentemente, tem havido maior interesse no emprego de enzimas suplementares nas dietas avícolas, uma vez que podem tanto melhorar a digestão/absorção de ingredientes convencionais, como reduzir os efeitos antinutricionais e/ou fornecer à ave uma nova capacidade de digerir certos componentes da dieta. Enzimas exógenas podem ser derivadas de fontes animais, vegetais e microbianas. Porém, a maioria provém da fermentação de microorganismos (LIMA et al., 2002).

Os custos no processamento de enzimas impediram o seu uso comercial, mas técnicas de biologia molecular tornaram sua aplicação economicamente viável (FERKET, 1993).

Reações mediadas por enzimas são alternativas eficazes a métodos químicos, geralmente dispendiosos, portanto nota-se que recentemente, as mesmas têm grande utilização em segmentos industriais. As propriedades hidrolíticas de enzimas como proteases, amilases e lipases aplicam-se perfeitamente na alimentação animal.

MORAN Jr. (1995), relatou que os pintos, ao eclodir, não dispõem de enzimas suficiente que digerem glicídios e lipídeos. Eles já dispõem de proteases, ativadas por proteínas que entram no trato digestivo ainda durante a fase embrionária, confirmando o conceito de estímulo de secreção pelo substrato. Em aves jovens, a produção de enzimas endógenas é menor que nas adultas de modo que a digestibilidade dos alimentos em geral é menor nos animais jovens podendo ser melhoradas pelas enzimas exógenas. Esta fase é, portanto, a melhor para utilização das referidas enzimas.

A suplementação contribui para melhoria da digestibilidade dos nutrientes da dieta que expressa a porcentagem de substâncias digeridas ou utilizadas na alimentação pelo animal. A suplementação enzimática reduz a viscosidade intestinal e acelera a velocidade de trânsito do alimento pelo intestino (ALMIRALL et al., 1995), melhorando as taxas de crescimento. De acordo com a sua finalidade, as enzimas usadas em rações animais podem ser classificadas como: enzimas destinadas a complementar quantitativamente as próprias enzimas digestórias endógenas dos animais (proteases, amilases, fitases) e enzimas que esses animais não podem sintetizar e/ou sintetizam em pequenas proporções (β -glucanases, pentosanas, e α -galactosidases). Segundo GUENTER (2004), as principais metas da suplementação enzimática para os animais são: remover ou destruir os fatores antinutricionais dos grãos; aumentar a digestibilidade total da ração; potencializar a ação das enzimas endógenas e diminuir a poluição ambiental causada por nutrientes excretados nas fezes.

A formulação de ração moderna é voltada principalmente para fornecer alimento com uma densidade de nutriente para se alcançar alto desempenho do animal e ao mesmo tempo alcançar custos mínimos (COUSINS, 1999).

Conforme ZANELLA et al. (1999), a inclusão de enzimas digestivas exógenas nas dietas de aves reduz a síntese de enzimas endógenas. Em consequência, o organismo teria a disposição mais aminoácidos para síntese protéica. Em situações normais, aproximadamente 25% das necessidades diárias de nitrogênio podem ser destinadas para síntese de enzimas endógenas. Observou-se que ocorreu redução de 40% da secreção duodenal de tripsina, quimiotripsina, lipase e α -amilase quando as dietas foram suplementadas com enzimas exógenas.

ZANELLA (1999) verificou que a suplementação de amilase e protease na dieta a base de milho e soja para frangos de corte, reduziu a síntese destas enzimas endógenas em 23,4 e 35,5%, respectivamente. Supõe-se que a secreção de enzimas pancreáticas seja afetada pela concentração de enzimas no intestino delgado e/ou substratos ou produtos de hidrólise.

Novas tecnologias, como produção biotecnológica de enzimas, são constantemente apresentadas. O intervalo entre desenvolvimento e utilização prática das inovações geralmente é de vários anos. Na primeira etapa, estudos laboratoriais demonstram a potencialidade de utilização. A segunda etapa envolve a viabilização de uso prático, com desenvolvimento de processos industriais economicamente viáveis. As próximas etapas estão relacionadas à divulgação, comercialização e amadurecimento do projeto tecnológico. Atualmente, vários aditivos biotecnológicos têm sido rotineiramente usados na indústria animal. Todavia para ser adotada, ela necessita ser comprovada cientificamente e testada em condições de campo (FERNANDES & MALAGUIDO, 2007).

Enzimas são, em geral, denominadas de acordo com o substrato que atuam. Portanto, a palavra amilase indica a ação enzimática sobre o amido (amilo), que contém dois polissacarídeos: amilose (15-20%) e amilopectina (80-85%) (HARGER, 1982).

Amilase (EC 3.2.1) é uma das várias enzimas responsável pela degradação do amido (PAQUET et al., 1991). Atuam na hidrólise das moléculas do amido, decompondo-o em resíduos de dextrinas e glicose. Estas enzimas são produzidas por diversos fungos, bactérias e vegetais. Dentre os microorganismos, destacam-se o *Cryptococcus flavus* e *Aspergillus niger* HM2003 por produzirem enzimas termoestáveis e de ação nos carboidratos das plantas para auxiliar no processo digestivo.

SPIER (2006) cita que as amilases encontram aplicações nas indústrias têxteis, papel e celulose, de couro, detergentes, cervejas, bebidas destiladas, panificação, cereais para alimentação infantil, liquefação e sacarificação do amido, ração animal, indústria de fermentação (vitaminas, aminoácidos, antibióticos), indústria química e farmacêutica (BRUCHMANN, 1980; WARD, 1989; QUAGLIA, 1991; LEADLAY, 1993; WAINWRIGHT, 1995; PANDEY et al., 1999; GUPTA et al., 2003; SURMELY et al., 2003; TUNGA & TUNGA, 2003; SZAKACS, 2004; PANDEY et al., 2005; SOCCOL et al., 2005).

PANDEY et al. (2005) descrevem que o *Aspergillus niger* é um bom produtor de α -amilase. O *Aspergillus niger*, como sugere seu nome, é um fungo filamentosso negro comumente denominado como “mofo negro” (WAINWRIGHT, 1995).

O uso de fungos do gênero *Aspergillus niger* apresenta algumas vantagens como

facilidade de manipulação e habilidade de fermentar grande variedade de matérias-primas de baixo custo. PANDEY et al. (1999) relataram que o *Aspergillus niger* pode produzir 19 tipos de enzimas, tais como celulases, xilanase, poligalacturonase, α -galactosidase, α -amilase, glucoamilase, β -glucosidase, protease ácida.

O *Cryptococcus flavus* é uma levedura isolada do solo do cerrado brasileiro e foi identificado pelo Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília. PEREIRA (2002) e WANDERLEY et al. (2004) trabalharam com *Cryptococcus flavus* para produção de amilase.

PANDEY et al. (2005) se referem ao mercado mundial de enzimas industriais com valores ao de 1,7 a 2,0 bilhões de dólares para 2005 e estima-se que a comercialização mundial de enzimas amilolíticas movimente aproximadamente 225 milhões de dólares.

As enzimas, portanto, vêm sendo utilizadas como catalisadores em processos industriais em nível mundial, implicando no surgimento de um novo campo de estudo e pesquisa, a biotecnologia enzimática (PEREIRA, 2002). Esta linha de pesquisa tenta aliar as vantagens inatas das enzimas – sua especificidade e eficiência catalítica – e encontrar metodologias viáveis que regulem sua instabilidade e reduza os custos de sua produção para aplicação na indústria de alimentação animal.

Neste trabalho, objetivou-se a produção e suplementação com α -amilase de *Cryptococcus flavus* e *Aspergillus niger* HM2003 na dieta de frangos de corte no período de um a 21 dias de idade.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Enzimas

A enzimologia industrial é um importante ramo da biotecnologia. As enzimas permitem às indústrias usarem processos mais econômicos, diminuindo o consumo de energia, sendo mais confiáveis com menor agressão ao meio ambiente.

As enzimas estão sendo cada vez mais aplicadas em diferentes setores industriais, devendo-se, principalmente, a vantagens operacionais como especificidade de reação e alta eficiência de conversão. Ressalta-se, ainda, que as reações enzimáticas acontecem, geralmente, em condições brandas de temperatura e de pH, o que significa, para as indústrias, redução nos custos operacionais.

Cada enzima é, em algum grau, específica para certo substrato, apresentando estrutura espacial adequada para atuar neste substrato. Por exemplo, a α -amilase catalisa especificamente e ao acaso a hidrólise das ligações α 1-4 do amido.

A característica distintiva de uma reação catalisada enzimaticamente é que ela possui um ajuste induzido, com domínios catalíticos e ocorre na estrutura molecular da enzima chamada de sítio ativo. O sítio ativo contém aminoácidos cujas cadeias laterais criam uma superfície complementar ao substrato, permitindo que as enzimas atuem na ruptura de determinada ligação química. O sítio ativo liga-se ao substrato, formando o complexo enzima-substrato que será convertido à enzima e produto (NELSON & COX, 2003)

A temperatura é o fator que mais influencia a função de biomoléculas e a manutenção das estruturas biológicas (GOMES et al., 2007). As enzimas termoestáveis já têm sido usadas como ferramenta para a Biologia Molecular e surgem como alternativas de interesse em outro bioprocessos, como síntese orgânica (proteases, lípases), no setor de diagnóstico, no tratamento de resíduos e na produção de ração animal (HAKI & RAKSHIT, 2003 e COLOMBATTO et al., 2004). Quando a temperatura aumenta, a velocidade da reação inicialmente aumenta em virtude da energia cinética aumentada das moléculas com o substrato.

A concentração de H^+ afeta a velocidade das reações químicas. Extremos de pH podem levar à desnaturação das enzimas. Existe o pH ótimo, onde a distribuição de cargas elétricas da molécula da enzima e, em especial do sítio catalítico, é aquele ideal para catálise. O pH ótimo varia para diferentes enzimas. As amilases diferem bastante quanto a um valor

específico. Segundo VIHINEN & MANTSALA (1989), o pH ótimo das α -amilases varia de 2 a 12.

2.2. Classificação e importância econômica das amilases

O desenvolvimento tecnológico atingiu, nas últimas décadas, dimensões incalculáveis e, dentro deste contexto, os processos biotecnológicos industriais merecem destaque especial (PALMA, 2003).

Um dos principais exemplos de processo biotecnológico industrial, em amplo desenvolvimento, é a produção de enzimas. Aquelas produzidas comercialmente, pelas grandes indústrias da área, na maioria dos casos, são de origem microbiana devido, principalmente, à maior diversidade, possível de ser obtida pelos microrganismos, e às dificuldades, operacionais e econômicas, dos processos de extração de enzimas de tecidos animais e vegetais. Ressalta-se, ainda, que a condução dos processos para obtenção das enzimas microbianas pode ser controlada, para atender as necessidades do mercado. Especialmente no Brasil, por suas características climáticas, existe abundância de substratos nos cultivos microbianos para produção de enzimas. Além disto, há grande variedade, e disponibilidade, de recursos naturais renováveis, que podem ser transformados, enzimaticamente, em produtos de maior valor agregado, e de interesse industrial.

As amilases são hidrolases capazes de degradar o amido, e seus produtos de hidrólise, até sacarídeos menores. São amplamente distribuídas na natureza, encontradas em bactérias, fungos, plantas e animais. Estão entre as enzimas mais importantes empregadas na indústria, devido à grande aplicação do amido e de seus derivados em processos industriais.

As amilases podem ser classificadas quanto ao seu mecanismo de ação ou quanto o tipo de ligações que hidrolisam. Quanto ao mecanismo de ação podem ser classificadas como endoamilases, que clivam ligações glicosídicas ao acaso no interior do polímero, ou exoamilases, que hidrolisam, sucessivamente, ligações glicosídicas a partir da extremidade não-redutora da molécula (GUPTA et al., 2003).

As amilases, quanto às ligações hidrolisadas, podem ser agrupadas em: (Figura 1).

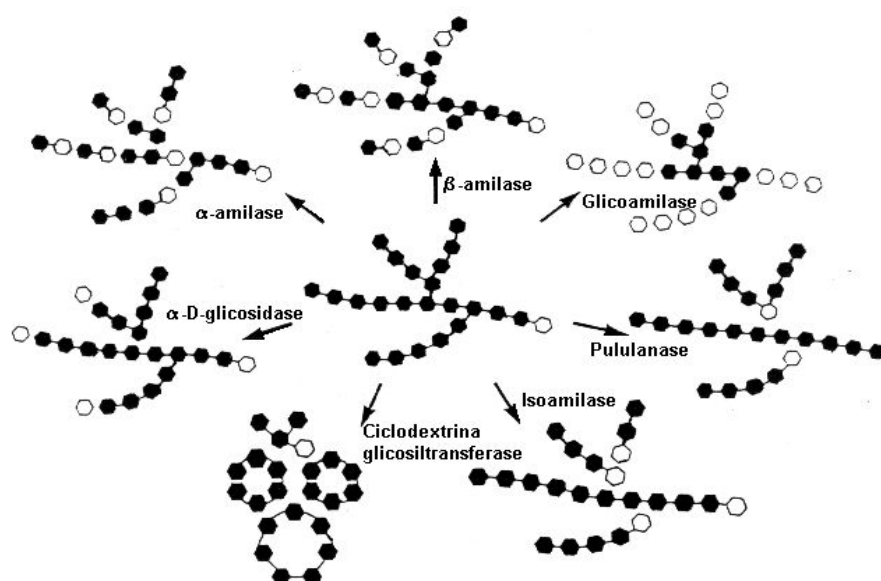


Figura 1. Classes de enzimas amilolíticas e respectivos mecanismos de ação sobre a molécula de amido (PRETORIUS et al., 1991).

Glicoamilases (1,4- α -glucano glucanohidrolase, EC 3.2.1.3) são exoenzimas que atuam em ligações dos tipos α -1,4 da extremidade não-redutora da amilose e amilopectina, liberando β -D-glicose como produto. Algumas glicoamilases são capazes de hidrolisar também as ligações glicosídicas dos tipos α -1,6 e α -1,3 de α -glucanas.

SOCCOL et al. (2005) destacaram que a amiloglicosidase (glicoamilase), na maioria das vezes, é produzida principalmente por fungos dos gêneros *Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp. e *Endomyces* sp. Microrganismos produtores de α -amilase e amiloglicosidase, destacando-se as espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Bacillus* que têm sido empregadas em processos industriais (PANDEY et al., 2005).

α -Amilases (1,4- α -D-glucano glucanohidrolase EC 3.2.1.1) são endoenzimas que hidrolisam de forma aleatória ligações glicosídicas do tipo α -1,4 do amido, liberando unidades de glicose, maltose, maltotriose, maltopentose e dextrinas de alta massa molecular. A maioria das α -amilases tem capacidade de contornar as ligações do tipo α -1,6 encontradas nos pontos de ramificação sem, no entanto, clivá-las. Entretanto, a α -amilase de *Thermoactinomyces vulgaris* tem capacidade de hidrolisar tanto ligações α -1,4 como α -1,6 (SAKANO et al., 1982).

A maioria das α -amilases é cálcio-dependente. Todavia, CORONADO et al. (2000), estudando *Halomonas meridiana*, mostraram que é, também, dependente de cloreto de sódio. Segundo BRUCHMANN (1980), tem sido demonstrado que as α -amilases privadas de Ca^{+2} diminuem a atividade. O cálcio não influi somente na atividade da enzima como também aumenta sua estabilidade frente a trocas de temperatura e de pH.

Estas enzimas são produzidas por uma variedade muito grande de organismos, incluindo bactérias, fungos, leveduras e actinomicetes, entretanto as enzimas derivadas de fungos e bactérias são dominantes. Dentre os principais produtores de α -amilases incluem gênero *Aspergillus* e *Bacillus* (PANDEY et al., 2000).

β -amilases (1,4- α -D-glucano maltohidrolase, EC 3.2.1.2) são exoenzimas que clivam ligações glicosídicas, em seqüência, a partir de extremidades não-redutoras da amilose, amilopectina e glicogênio, liberando somente resíduos de maltose na forma β -anomérica, aumentando rapidamente o poder redutor da solução inicial. São denominadas também de amilases sacarificantes, uma vez que as maltoses resultantes são facilmente fermentáveis. A parte não degradada do substrato ramificado é denominada de β -dextrina limite. Conforme QUAGLIA (1991), a principal fonte de β -amilase é o extrato de malte, que é proveniente da cevada ou do trigo germinados. A partir da cevada malteada prepara-se a β -amilase separando-a da α -amilase por extração fracionada. A β -amilase tem pH ótimo entre 4 e 6 e temperatura ótima de 30 e 50°C.

Isoamilases (glicogênio 6-glucohidrolase, EC 3.2.1.68) são capazes de hidrolisar ligações do tipo α -1,6 de amilopectina, glicogênio, dextrinas ramificadas e alguns oligossacarídeos. A isoamilase diferencia-se da pululanase porque não hidrolisa o pululano (polímero de maltotriose unidas pela extremidade por ligações α -1,6 glicosídicas) como citado por LEE & WHELAN (1971).

Pululanases (α -dextrinas 6-glucohidrolase, EC 3.2.1.41) clivam as ligações do tipo α -1,6 nos pontos de ramificação do amido e amilopectina, fazendo a conversão em moléculas de amilose, que possuem somente ligações do tipo α -1,4. Também são capazes de atuar nas ligações α -1,6 da pululana, que por sua vez, são separadas por três ligações glicosídicas do tipo α -1,4, liberando moléculas de maltotriose. As enzimas amilolíticas desramificantes são utilizadas na elucidação da estrutura do amido e oligossacarídeos relacionados e usadas em combinação com as enzimas glicoamilases e β -amilases na produção industrial de glicose e maltose a partir de amido, respectivamente. Microrganismos termofílicos têm sido produtores

de pulananase como cita ERRA-PUJADA et al. (2001), que utilizaram o *Thermococcus hydrothermalis*.

Ciclodextrina Glicosiltransferases (EC 2.4.1.19) são enzimas que hidrolisam o amido formando estruturas circulares denominadas de ciclodextrinas unidas por ligações glicosídicas do tipo α -1,4. Estes anéis podem ser constituídos por 6, 7 e 8 unidades de glicose, sendo chamados de α , β , e γ -ciclodextrinas, respectivamente. MAZONI et al. (2000), isolaram *Bacillus firmus*, produtor de CGTase com alta atividade, de solo brasileiro. Outras fontes também são citadas por FOGARTY & KELLY (1990) tais como: *Bacillus* 382, *Bacillus* sp. 1011, *Bacillus circulans*, *Bacillus macerans*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus ohbensis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Klebsiella pneumoniae* M5al, *Micrococcus* sp.

Outras enzimas classificadas dentro do grupo da amilase, mas que são pouco relatadas na literatura são as Isomaltases (Dextrina 6- α -D-glucano hidrolase EC 3.2.1.10), que hidrolisam ligações α -1,6-D-glicosídicas em isomaltose de dextrinas e as α -glucosidases (α -D-glicosídica 3.2.1.20), que hidrolisam ligações α -1,4-D-glicose nos terminais não redutores de resíduos de oligossacarídeos liberando α -D-glicose.

2.3. Microrganismos produtores de enzimas amilolíticas

2.3.1. Gênero *Cryptococcus*

O gênero *Cryptococcus* é distribuído nas leveduras do filo Hymenomycetos, com representantes nas quatro classes: Tremellales, Trichosporonales, Filobasidiales e Cystofilobasidiales (GUFFOGG et al., 2004). RATÓN (2004) afirma que há dificuldades em se identificar *Cryptococcus/Filobasidiella*, devido a sua forma anomorfa (estado vegetativo) e telomorfo (estado sexual).

O gênero *Cryptococcus* é composto por aproximadamente 34 espécies de leveduras que se reproduzem assexuadamente por brotamento e apresentam as seguintes características: hidrólise de amido, assimilação de inositol, produção de urease, não fermentação de açúcares e sensibilidade à cicloheximida (MITCHELL & PERFECT, 1995; IKEDA et al., 2002).

Microscopicamente, na sua forma assexuada haplóide, esses basidiomicetos aparecem como leveduras encapsuladas, arredondadas ou ovaladas de cinco a dez micrômetros, sem hifas ou pseudo-hifas, com brotamentos simples ou, raramente, múltiplos (KWON-CHUNG

& BENNETT, 1992), sendo que *C. gattii* produz células mais elípticas (KNOW-CHUNG et al., 2002).

Presente em grande número no ambiente das aves, *Cryptococcus spp* não causa doença nesses animais, na maioria das vezes, devido à alta temperatura corporal das aves, a qual inibe o crescimento da levedura (BAUWENS et al., 1986; NIGRO et al., 1987; MITCHELL & PERFECT, 1995), mas é patogênico para humanos.

O gênero *Cryptococcus* se classifica quanto à reprodução em basidiomicetos. Os basidiomicetos são assim denominados por apresentarem estrutura característica denominada de basídio. É nessa célula que a cariogamia (fusão nuclear) e a meiose ocorrem, e também onde os basidiosporos haplóides exógenos são formados. Existe variação na morfologia do basídio, no número de esporos formados, e como os esporos nascem na superfície do basídio (INGOLD, 1991). Normalmente quatro esporos são produzidos em cada basídio, no ápice das protuberâncias basidiais chamadas esterigmas. Cada esporo usualmente contém um dos produtos meióticos haplóides.

Há grande interesse da comunidade científica em melhorar a capacidade amilolítica destas espécies, pela adição de genes de amilases advindos de outras espécies de levedura ou mesmo de outros microrganismos (FORGATY & KELLY, 1990).

2.3.2. Gênero *Aspergillus*

Aspergillus secção *Nigri* (ou grupo *Aspergillus niger*) são fungos com conídios de coloração marrom-escuro a negros, com estruturas dos conidióforos uniseriados ou biseriados, vesículas esféricas e hifas hialinas ou levemente pigmentadas próximo do ápice (KLICK & PITT, 1988). A taxonomia de fungos pertencentes à secção *Nigri* constitui-se em uma das mais complexas e confusas do gênero *Aspergillus*.

Mediante análises filogenéticas, utilizando-se de dados moleculares e apoiando-se em dados morfológicos e culturais, VARGA et al. (2003) sugeriram que à secção *Nigri* pertencem as seguintes espécies de *Aspergillus* (A.): *A. heteromorphus*, *A. ellipticus*, *A. carbonarius*, *A. japonicus*, *A. aculeatus*, *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. foetidus* e *A. brasiliensis*. As quatro últimas (*A. niger*, *A. tubingensis*, *A. foetidus* e *A. brasiliensis*) são morfologicamente indistinguíveis e, portanto, pertencem ao denominado “agregado *niger*”. As espécies *A. awamori*, *A. usamii*, *A. phoenicis* e *A. ficuum* foram reduzidas a sinônimos, das espécies *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. brasiliensis* e *A. foetidus*, respectivamente. *A. helicothrix* foi

desconsiderado como espécie após demonstração que se tratava de um mutante de *A. ellipticus*.

Aspergillus niger é uma das poucas espécies de fungos que tem recebido o status GRAS “Generally Recognised as Safe” da “U.S. Food and Drug Administration” (BIGELIS & LASURE, 1987).

O uso do *A. niger* apresenta algumas vantagens como facilidade de manipulação, sua habilidade de fermentar grande variedade de matérias-primas de baixo custo e produzir rendimentos elevados de bioprodutos. PANDEY et al. (1999) relataram que *A. niger* pode produzir 19 tipos de enzimas, tais como celulases, xilanase, poligalacturonase, α -galactosidase, α -amilase, glucoamilase, β -glucosidase e protease ácida. A enzima que será produzida depende do tipo de substrato usado durante a fermentação.

2.4. Uso de α -amilase em rações animais

O uso de enzimas exógenas para aumentar o valor nutricional de dietas para aves é relativamente um novo conceito. A tecnologia está envolvida com novas enzimas e com a combinação destas com novas aplicações para permitir algumas regulações na alimentação. A fitase é considerada a mais significativa, em termos de nutrição animal, todavia existem grandes pesquisas com enzimas com foco na qualidade dos ingredientes, predictabilidade, segurança alimentar, efeito da idade da ave, efeito de vários sítios de atividade e doses enzimáticas e redução da poluição ambiental. Futuramente, as enzimas serão valorizadas na alimentação para aves de corte (COWIESON et al., 2006).

As novas aplicações da biotecnologia, amplamente debatidas pela comunidade científica, são de alta importância econômica e social, pois possibilitam o aumento expressivo da produtividade, melhora da qualidade de produtos e redução do impacto ambiental. As enzimas são produzidas por microrganismos específicos e sob condições assépticas e altamente controladas. As condições ideais de crescimento para esses microrganismos, normalmente, são bem conhecidas e testadas. A temperatura, os nutrientes e o suprimento de oxigênio são ajustados de modo a criar condições próprias para seu desenvolvimento. A demanda por enzimas de uso industrial, principalmente aquelas com origem microbiana, é crescente devido a sua aplicação em uma enorme variedade de processos.

Enzimas na nutrição de aves são consideradas aditivos, não possuem função nutricional direta, mas auxiliam o processo digestivo melhorando a digestibilidade dos nutrientes presentes na dieta (CAMPESTRINI et al., 2005).

A utilização de enzimas exógenas na alimentação de aves tem sido estudada com o objetivo não somente de aumentar o aproveitamento dos alimentos, promovendo a hidrólise de fatores antinutricionais, de polissacarídeos não-amiláceos, mas também reduzir a viscosidade da digesta (GRAHAM, 1996). Para CANTOR (1995), as enzimas exógenas, em avicultura, são estudadas em razão de algumas enzimas endógenas não serem capazes de atuar na digestão de certos componentes dos alimentos vegetais. Nas dietas, acredita-se que o uso de enzimas, melhora a eficiência na produtividade das aves.

FISCHER et al. (2001) e CAMPESTRINI et al. (2005), afirmaram que de acordo com sua finalidade, as enzimas usadas em rações podem se subdividir em dois tipos: enzimas destinadas a complementar quantitativamente as próprias enzimas digestórias dos monogástricos (proteases, amilases) e enzimas que esses animais não podem sintetizar (β -glucanases, pentosanas, α -galactosidases e fitases). COWIESON & ADEOLA (2005) sugerem que o uso combinados de carboidrases, aliadas as proteases e fitases melhoram o desempenho de aves.

Entre as matérias-primas que constituem a ração, os grãos representam percentuais elevados e, portanto, influenciam de forma significativa a qualidade final da ração. O milho constitui aproximadamente 60% de uma ração para frangos de corte, e contribui com 65% da energia metabolizável (EM) e 22% da proteína (CARVALHO et al., 2004).

Embora o amido do milho seja considerado de alta digestibilidade, a literatura dispõe de dados que sugere que a sua digestibilidade ileal não é maior do que 75%. A variabilidade da digestibilidade está relacionada com a genética do milho, com a safra (local, ano e eventos climáticos antes da colheita) e com o tratamento pós-colheita (secagem, armazenamento e processamento). Também, teores de fibra, proteína e gordura do milho podem influenciar o aproveitamento da energia do amido pelas aves.

Desta forma, o amido do milho deve ser caracterizado com base na taxa e no grau da sua digestão em: amido rapidamente digerido, amido lentamente digerido e amido resistente. Aproximadamente 15% do amido presente no milho pode ser classificado como amido resistente e não é aproveitado pelas aves, segundo BEDFORD (2000).

Dos componentes dos carboidratos não estruturais, o amido talvez seja o mais importante, sendo o principal componente energético dos grãos de cereais e raízes utilizados na alimentação, devido as suas características como fonte de reserva, este apresenta disponibilidade energética superior à dos carboidratos estruturais (ZEOULA & NETO, 2001).

HAAL (2001) enfoca os carboidratos (Figura 2) e afirma que a falta de métodos ou problemas com ensaios para carboidratos individuais tornam impraticável a medição individual de carboidratos não fibrosos e a soma dos componentes.

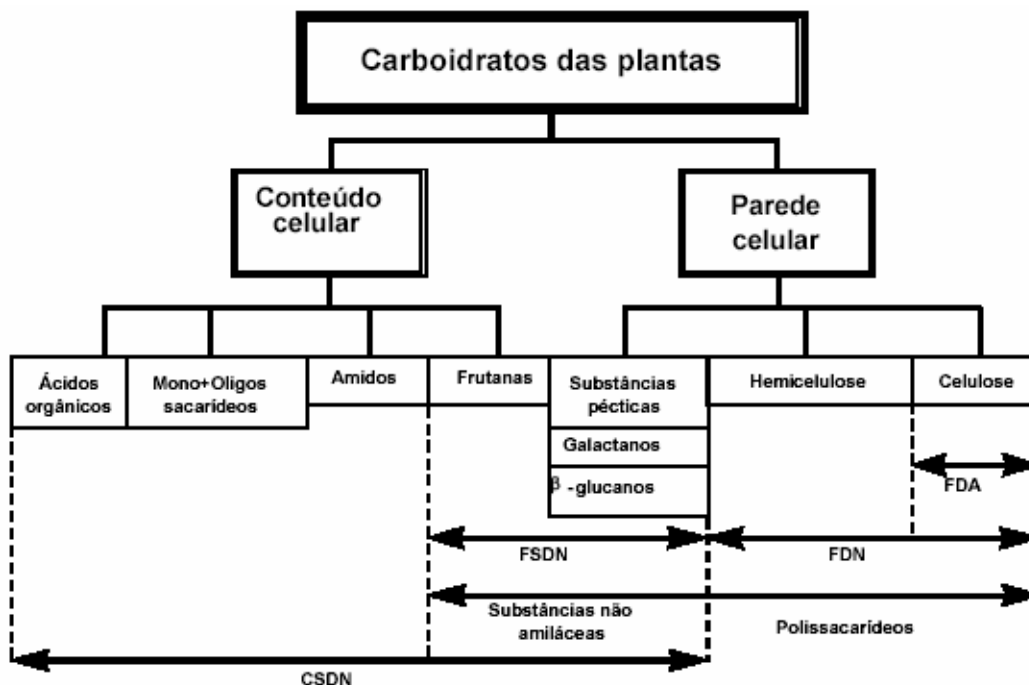


Figura 2. Carboidratos das plantas (Adaptado HALL, 2001). FDA = fibra em detergente ácido, FDN = fibra em detergente neutro, CSDN = carboidratos solúveis em detergente neutro, FSDN = fibra solúvel em detergente neutro, Açúcares = mono e oligossacarídeos.

A proporção de amilose e de amilopectina presente no amido do milho é importante, pois tem grande influência em sua digestibilidade. A amilose é um polímero linear de moléculas de glicose, construído pelas ligações α 1-4 e a amilopectina é um polímero ramificado de moléculas de glicose, contendo ligações α 1-4 e α 1-6. O amido de milho contendo proporções maiores de amilose apresenta digestibilidade mais lenta, devido à forma como as moléculas se arranjam nos grânulos de amido. O milho é constituído em média por 28% de amilose e 72% de amilopectina.

O amido é um polímero de glicose de alta massa molecular, sendo juntamente com a celulose, um dos polímeros de origem vegetal mais amplamente disponível na natureza (BECK & ZIEGLER, 1989), considerado como um dos principais componentes da dieta humana e de outros animais. É a maior substância de reserva dos vegetais, sendo produzido

nas folhas como resultado da conversão da glicose-6-fosfato, originária durante a fotossíntese, em glicose-1-fosfato pela ação da fosfoglicomutase.

O polissacarídeo amilose apresenta-se na forma helicoidal e é menos solúvel que a amilopectina. As cadeias apresentam tamanho médio de 500-1000 unidades de glicose e constituem cerca de 20 a 30% da molécula de amido (JANSE & PRETORIUS, 1995).

A amilopectina representa cerca de 70 a 80% da molécula do amido. Apresenta normalmente padrão bimodal de distribuição com cadeias curtas contendo em média de 11 a 15, e cadeias mais longas com 40-60 resíduos de D-glicose (JANSE & PRETORIUS, 1995).

Ao ser hidrolisado, o amido produz carboidratos de cadeia curta, tais como dextrinas, maltopentose, maltotetose, maltose e finalmente glicose (CRUEGER & CRUEGER, 1984). Estes produtos derivados da hidrólise do amido podem ter diversas aplicações biotecnológicas. Esta hidrólise pode ser ácida ou enzimática.

Em aves, não ocorre amilase salivar devido à ausência de células serosas. Assim, a digestão do amido se inicia no duodeno e se completa no intestino delgado, quando as amilases pancreáticas que representam de 5% a 30% do suco pancreático, atacam os remanescentes da molécula de amido, convertendo-o a maltose e glicose. A sacarose e a maltose são hidrolisadas, na mucosa do intestino, a glicose e frutose e, então, são absorvidas.

Em condições normais, a absorção de monossacarídeos é quase completa e ocorre no intestino delgado por mecanismos de difusão simples, dependendo do grau de concentração e por absorção ativa, que envolve um transportador e requer a presença do íon sódio e gasto de energia.

De acordo com PENZ JR (1998), as variações de digestibilidade dos carboidratos devem-se as diferenças entre as variedades, às condições de cultivo da planta, às formas diferentes de estrutura espacial dos polímeros de amido, sendo a amilopectina mais fácil de ser digerida que a amilose.

KIDD et al. (2001) avaliaram que dietas à base de milho e farelo de soja, suplementadas com enzimas, proporcionaram melhor eficiência alimentar e menor mortalidade de frangos de corte, especialmente em condições de alta temperatura.

A digestibilidade do amido é bastante alta em animais monogástricos, aproximadamente 95%, segundo GRACIA et al. (2003) e 85% segundo SOTO-SALANOVA et al. (1996). Ela pode ser afetada pela idade da ave. Segundo MAHAGNA et al. (1995), há diminuição com a idade de 96,7% aos sete dias para 93,7% aos 21 dias. BRUM et al. (2006) trabalharam com α -amilase de *Aspergillus oryzae* e observaram aumento no ganho de peso das aves com até 23 dias de idade. ONDERCI et al. (2006) suplementaram dietas a base de

milho com cultura de *Escherichia coli*, produtoras de α -amilase e observaram aumento da digestibilidade dos nutrientes e melhora no desempenho das aves.

Para que se possa reduzir efetivamente o custo das rações com adição de complexo de enzimas exógenas, fatores como a relação entre as enzimas utilizadas e os substratos da ração, os aumentos da digestibilidade dos nutrientes e os aspectos de formulação das rações devem ser considerados (HANNAS & PUPA, 2003).

Pesquisas têm mostrado que a adição de amilase em dietas a base de milho e farelo de soja também oferece potencial para melhorar o desempenho das aves.

3. REFERÊNCIAS

- ALMIRALL, M., FRANCESCH, M., PEREZ-VENDRELL, A.M., BRUFAU, J., ESTEVE-GARCIA, E. The differences in intestinal viscosity produced by barley and glucanase alter digesta enzyme activities and ilea nutrient digestibilities more in broilers than in chicks. **Journal of Nutrition**, v.125, n.4, p. 947-955, 1995.
- BAUWENS, L.; SWINNE, D.; VROEY, C.; MEURICHY, W. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in the aviaries of the Antwerp Zoological Gardens. **Mykosen**, v.29, n.7, p.291-4, 1986.
- BECK, E. & ZIEGLER, P. Biosynthesis and degradation of starch in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.40, n.2, p.95-117, 1989.
- BEDFORD, M. Enzymes for cereals which do not pose viscosity problems. In: **European Symposium on Feed Enzymes**, 3, 2000, Netherlands. Anais... Netherlands: Noordwijkerhout, 2000. p.8.
- BIGELIS, R. & LASURE, L.L. Fungal enzymes and primary metabolites used in food processing. In: **Food and Beverage Mycology**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1987. p.473 – 516.
- BRUCHMANN, E. **Bioquímica técnica**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1980. 233 p.
- BRUM, P.A.R., AVILA, V.S., LIMA, G.J.M.M., COLDEBELA, A., SCHEUERMANN, G., USINGLER, F., TOIGO, G.C. Efeito da suplementação de α -amilase em dietas a base de milho e farelo de soja na digestibilidade da energia das rações e no desempenho de frangos de corte. **Comunicado Técnico da Embrapa**, 425, 2006.
- CAMPESTRINI, E., SILVA, V.T.M., APPELT, M.D. Utilização de enzimas na alimentação animal. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.2, n.6, p.254-267, 2005.
- CANTOR, A. Enzimas usadas na Europa, Estados Unidos e Ásia. Possibilidades para uso no Brasil. In: RONDA LATINOAMERICANA DE BIOTECNOLOGIA, 5, 1995, Curitiba. **Anais...** Curitiba: Alltech, 1995. p.31-42.
- CARVALHO, D.C.O., ALBINO, L.F.T., ROSTAGNO, H.S., OLIVEIRA, J.E., VARGAS JÚNIOR, J.G., TOLEDO, R.S., COSTA, C.H.R., PINHEIRO, S.R.F., SOUZA, R.M. Composição química e energética de amostras de milho submetidas a diferentes temperaturas

de secagem períodos de armazenamentos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n.2, p. 358-364, 2004.

CHOCT, M. Enzymes for the feed industry: past, present and future. **World's Poultry Science Journal**, v.62, p.5-16, 2006.

COLOMBATTO, D.; MOULD, F.L.; BHAT, M.K., PHIPPS, R.H., AND OWEN, E. In vitro evaluation of fibrolytic enzymes as additives for maize (*Zea mays* L.) silage. I. Effects of ensiling temperature, enzyme source and addition level or thermophilic sources. **Animal Feed Science and Technology**, v.111, n.1, p.111- 128, 2004.

CORONADO, M.J., VARGAS, C., HOFEMEISTER, J., VENTOSA, A. AND NIETO, J.J. Production and biochemical characterization of an α -amylase from the moderate halophile *Halomonas meridiana*. **FEMS Microbiology Letters**, v.183, n.1, p.67–71, 2000.

COTTA, T., TORRES, D.M., OLIVEIRA, A.I.G. Efeitos da adição de um complexo enzimático sobre o desempenho de frangos de corte. **Ciências Agrotécnicas**, v.26, n.4, p. 852-857, 2002.

COUSINS, Bart. Enzimas na nutrição de aves. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL ACAVEMBRAPA SOBRE NUTRIÇÃO DE AVES, I, 1999, Concórdia. **Anais...**Concórdia, 1999. 15p.

COWIESON A.J. & ADEOLA, O. Carbohydrases, protease, and phytase have an additive beneficial effect in nutritionally marginal diets for broiler chicks. **Poultry Science**, v.84, n.12, p.1860–1867, 2005.

COWIESON, A.J.; HRUBY, M.; PIERSON, E.E.M. Evolving enzyme technology: impact on commercial poultry nutrition. **Nutrition Research Reviews**, v.19, n.1, p.90-103, 2006.

CRUEGER, W. & CRUEGER, A. Biotechnology: a textbook of industrial microbiology. Madison: Science Technology, Inc. Science Tech, Inc., 1984. 308p.

ERRA-PUJADA , M., CHANG, F., DEBEIRE , P., DUCHIRON , F. & O'DONOHUE, M. Purification and properties of the catalytic domain of the thermostable pullulanase type II from *Thermococcus hydrothermalis*. **Biotechnology Letter**, v.23, n.16, p.1273– 1277, 2001.

FERKET, P.R. Practical use of feed enzymes for turkeys and broilers. **Journal of Applied Poultry Research**, v.1, n.2, p.75-81, 1993.

FERNANDES, P. & MALAGUIDO, A. Complexos Enzimático-Novos Avanços na Produção Animal, captado em março de 2007. http://www.engormix.com/complexos_enzimaticos_%E2%80%93_novos_p_artigos_27_POR.htm.

FISCHER, G., MAIER, J.C, RUTZ, F. et al. Desempenho de frangos de corte alimentados com dietas a base de milho e farelo de soja com ou sem adição de enzimas. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38, 2001, Piracicaba. **Anais...**Piracicaba:SBZ, 2001. CD-ROM.

FISHER, G., MAIER, J.C., RUTZ, F., BERMUDEZ, V.L. Desempenho de frangos de corte alimentados com dietas à base de milho e farelo de soja, com ou sem adição de enzimas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.1, p.402-10, 2002.

FOGARTY, W.M. & KELLY, C.T. Recent advances in microbial amylases. In: Microbial enzymes and biotechnology. London: Elsevier Applied Science, 1990. p.71132.

- FORGATY, W.M. & KELLY, C.T. Amylases, Amyloglucosidases and related glucanases. In: A. H. Rose (ed.), **Microbial enzymes and bioconversions**. Academic Press. Inc. New York, 1980. p.115-170
- GHAZALAH, A.A., ABD EL-GAWAD, A.H., SOLIMAN, M.S. e AMANY, W.Y. Effect of enzyme preparation on performance of broilers fed corn soybean meal based diets Egypt. **Poultry Science**, v.25, p.295-316, 2005.
- GOMES, E., GUEZ, M.A.U., MARTIN, N., SILVA, R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Química Nova**, Vol. 30, No. 1, 136-145, 2007.
- GRACIA, M.I. et al. α -Amylase Supplementation of Broiler Diets Based on Corn. **Poultry Science**, v.82, p.436-442, 2003.
- GRAHAM, H. Mode de action of feed enzymes in diets based on low viscous and viscous grains. In: SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE NUTRIÇÃO DE SUÍNOS E AVES, 1996, Campinas. **Anais...** Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 1996. p.60-69.
- GUENTER, W. Practical experience with the use of enzymes. Capturado em 02 de setembro de 2004. Online. Disponível na Internet <http://www.idrc.ca/books/focus/821/chp6.html>.
- GUFFOGG, S.P., THOMAS-HALL, S., HOLLOWAY, P. and WATSON, K. A novel psychrotolerant member of the hymenomycetous yeasts from Antarctica: *Cryptococcus waticus* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p.275-277, 2004.
- GUPTA, R., MOHAPATRA, H., GOSWAMI, V. K., CHAUHAN, B. Microbial α -Amylases: a Biotechnological Perspective. **Process Biochemistry**. Jan. 2003. p. 1- 18. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>> Acesso em 08 Dez. 2006.
- HAKI, G.D. & RAKSHIT, S.K. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. **Bioresource Technology**, v.89, n.1, p.17-34, 2003.
- HALL, M.B. Recent advanced in non-ndf carbohydrates for the nutrition of lactating cows. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL EM BOVINOS DE LEITE, 2, Lavras, 2001. **Anais...** Lavras:UFLA-FAEPE, 2001. p.139-148.
- HANNAS, M.I. & PUPA, J.M.R. Enzimas: uma alternativa viável para enfrentar a crise na suinocultura. **Revista Pork World**, v.2, n.13, p.48-51, 2003.
- IKEDA, R.; SUGITA, T.; JACOBSON, E.S.; SHINODA, T. Laccase and melanization in clinically important *Cryptococcus* species other than *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.4, p.1214-8, 2002.
- INGOLD, C.T. A view of the active basidium in heterobasidiomycetes. **Mycol. Res.**, v.95, p.618-621, 1991.
- JANSE, B.J.H. & PRETORIUS, I.S. One-step enzymatic hydrolysis of starch using a recombinant strain of *Saccharomyces cerevisiae* producing α -amylase, glucoamylase and pullulanase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.42, n.6, p.878-883, 1995.
- KIDD, M.T., MORGAN JR, G.M., PRICE, C.J. et al. Enzyme supplementation to corn and soybean meal diets for broilers. **J. Appl. Poultry Res.**, v.10, n.1, p.65-70, 2001.
- KLICH, M.A.; PITT, J.I. A Laboratory Guide to Common *Aspergillus* Species and Their Teleomorphs. **CSIRO Division of Food Science and Technology**, North Ryde, New South Wales, 1988.

- KNOW-CHUNG, K.J. & BENNETT, J.E. **Medical Mycology**. Philadelphia: Lea e Febiger, 1992. 866p
- KNOW-CHUNG, K. J.; BOEKHOUT, T.; FELL, J. W.; DIAZ, M. (1557) Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellomycetidae). **Taxon**, v.51, n.4, p.804-806, 2002.
- LAILER K.J. **Introduction to the Chemistry of Enzymes**. New York: McGraw-Hill, 1954. 208p.
- LEADLAY, P.F. **An Introduction to Enzyme Chemistry**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1993. 82p.
- LEE, E.Y.C. & WHELAN, W.J. In: BOYER PD (Ed.) **The enzymes**. Vol. 5. New York : Academic Press, 1971. p.191-234.
- LIMA, A.C.F., MACARI, M., PIZAURO JÚNIOR, J.M., MALHEIROS, E.B. Atividade enzimática pancreática de frangos de corte alimentados com dietas contendo enzimas ou probióticos. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.4, n.3, p.1-9, 2002.
- MAHAGNA, M.; NIR, I.; LARBIER, M. et al. 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 Nutrition and Development**, v.35, n.2, p.201-212, 1995.
- MAZONI, R.B.; MARIOWAKI, C.; MORAES, F.F.; ZANIN, G.M.; MATIOLI, G. Propriedades da ciclodextrina glicosiltransferase produzida por bacillus firmus alcalofílico / Properties of cyclodextrin glycosyltransferase produced by alkalophilic bacillus firms. **Arquivo de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v.4, n.3, p.235-242, 2000.
- MITCHELL, T.G.; PERFECT, J.R. Cryptococcosis in the era of AIDS – 100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.8, n.4, p. 515-48, 1995.
- MORAN JR., E.T. Digestion and absorption of carbohydrates in fowl and events through perinatal development. **Journal of Nutrition**, v.115, n.2, p.665-71, 1985.
- NELSON, D.L. & COX, M.M. **Lehninger: Princípios de Bioquímica**. 3ª ed., Sarvier, 2003.
- NIGRO, N.T.M.R.C.; PEREIRA, A.D.; HUGGINS, D.W.; LACAZ, C.S. Isolamento de *Cryptococcus neoformans* de fezes de pombos, do solo e ninhos de pombos. **Revista Brasileira de Medicina**, v.44, n.1 e 2, p.6-9, 1987.
- ONDERCI, M; SAHIN, N; SAHIN, K; CIKIM, G; AYDÍN, A; OZERCAN, I; AYDÍN, S. Efficacy of Supplementation of α -Amylase-Producing Bacterial Culture on the Performance, Nutrient Use, and Gut Morphology of Broiler Chickens Fed a Corn-Based Diet. **Poultry Science**, v.85, n.3, p.505-510, 2006.
- PALMA, M.B. Produção de xilanases por *Thermoascus aurantiacus* em cultivo em estado sólido. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2003. 169p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.
- PANDEY, A., SELVAKUMAR, P., SOCCOL, C.R., NIGAM, P. Solid State Fermentation for the Production of Industrial Enzymes. **Current Science**, v.77, n.1, p. 149-161, 1999.
- PANDEY, A., WEBB, C., SOCCOL, C.R., LARROCHE, C. **Enzyme Technology**. 1ª ed. New Delhi: Asiatech Publishers, Inc, 2005. 760 p.

- PANDEY, A.; NIGAM, P., SOCCOL, C.R.; SOCCOL, V.T.; SINGH, D.; MOHAN, R. Advances in Microbial Amylases. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v.31, n.2, p.135-152, 2000.
- PANDEY, A.; WEBB, C.; SOCCOL, C.R.; LARROCHE, C. Enzyme Technology. 1st ed. New Delhi: Asiatech Publishers, Inc, 2005. 760 p.
- PAQUET, V., CROUX, C., GOMA, G., SOUCAILLE, G. Purification and characterization of the extracellular alpha amylase from *Clostridium acetabutylicum* ATCC 824. **Applied Environmental Microbiology**, v.57, n.1, p.212-218, 1991.
- PENZ JÚNIOR, A.M. Enzimas em rações para aves e suínos. In: **REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA**, 35, 1998, Botucatu. **Anais...** Botucatu: SBZ, 1998. p.65-178.
- PEREIRA, S.E. **Imobilização e caracterização da α -amilase produzida por *Cryptococcus flavus***. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, 2002. 58p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Goiás, 2002.
- PRETORIUS, I.S., LAMBRECHTS, M.G., AND MARMUR, J. The glucoamylase multigene family in *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus*: an overview. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v.26, n.1, p.53–76, 1991.
- QUAGLIA, G. **Ciencia y Tecnología de la Panificación**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1991. 485 p.
- RATÒN, T.O. Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.21, n.1, p.5-19, 2004.
- SAKANO, Y., HIRAIWA, S., FUKUSHIMA, J. & KOBAYASHI, T. Enzymatic properties and action patterns of *Thermoactinomyces vulgaris* α -amylase. **Agric. Biol. Chem.** v.46, n.5, p.1121–1129, 1982.
- SOCCOL, C.R. ROJAN, P.J.; PATEL, A.K.; WOICIECHOWSKI, A.L.; VANDENBERGHE, L.P.S.; PANDEY, A. Glucoamylase. In: **Enzyme Technology**. New Delhi: Asiatec Publishers Inc., p. 221-230, 2005.
- SOCCOL, C. R., ROJAN, P. J., PATEL, A. K., WOICIECHOWSKI, A. L., VANDENBERGHE, P. S., PANDEY, A. **Glucoamylase**. In: **Enzyme Technology**. New Delhi: Asiatec Publishers Inc., p. 221-230, 2005.
- SOTO-SALANOVA, M.F., et al. Uso de enzimas em dietas de milho e soja para frangos de corte. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1996, Curitiba. **Anais...** Curitiba: FACTA, 1996. p.71-76.
- SPIER, M.R. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglicosidase por fermentação no estado sólido**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2006. 157p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, 2006.
- SURMELY, R., ALVAREZ, H., CEREDA, M.P., VILPOUX, O.F. Hidrólise do Amido. In: **Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas**. v.3. Cap.15, 2003. p.377- 395,
- SZAKACS, G. Production of Industrial Enzymes in Solid-State Fermentation. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON BIOPROCESS IN FOOD INDUSTRIES, 2004, Clermont-Ferrand, France. **Anais...** Clermont-Ferrand:Editora, 2004. p.20
- TUNGA, R. & TUNGA, B.S. **Extra-cellular Amylase Production by *Aspergillus oryzae* Under Solid State Fermentation**. International Center for Biotechnology. Japan: Osaka University, 2003. 12p

- VARGA, J.; RIGÓ, K.; TÉREN, J. Degradation of ochratoxin A by *Aspergillus* species. **International Journal of Food Microbiology**, v.59, n.1, p.1 – 7, 2000.
- VIHINEN, M. & MANTSALA, P. Microbial amylolytic enzymes. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v.24, n.4, p.329-419, 1989.
- WAINWRIGHT, M. **Introducción a la Biotecnología de los Hongos**. Zaragoza: Acribia, 1995. 228 p.
- WALSH, G.A. et al. Enzymes in the animal feed industry. **Trends in Biotechnology**, v.11, n.10, p 946-957, 1993.
- WANDERLEY, K.J., TORRES, F.A.G., MORAES, L.M.P., ULHOA, C.J. Biochemical characterization of alpha-amylase from the yeast *Cryptococcus flavus*. **Fems Microbiology Letters**, v. 231, n.2, p. 165-169, 2004.
- WARD, O. **Biotecnologia de La Fermentación: Principios, Processos e Productos**. Zaragoza: Editorial Acribia S.A., 1989. p.64-67 e 233-247.
- YANG, S.H. & WANG, P.H. Three Species of Yeasts New to Taiwan. **Taiwania**, v.48, n.2, p.99-105, 2003.
- ZANELLA, I. Suplementação enzimática em dietas avícolas. **Anais... Pré-simpósio de Nutrição Animal**, Santa Maria/RS, 69p. p.37-49, 2001.
- ZANELLA, I., SAKOMURA, J.A., PIZAURO, K.Z. et al. Efeito da adição de enzimas exógenas na dieta sobre a atividade enzimática da amilase e tripsina pancreática em frangos de corte. **Anais... Conferência APINCO 99 de Ciência e Tecnologia Avícolas**, São Paulo/SP, 1999. p.45
- ZEOULA, L.M. & NETO, S.F. C. Recentes Avanços em Amido na Nutrição de Vacas Leiteiras. In: SIMPÓSIO INTERNAIONAL DE BOVINOCULTURA DE LEITE. **Anais... SINLEITE**, 2, Lavras: UFLA, 2001. p.228 – 243.

CAPÍTULO 1

PRODUÇÃO DA ENZIMA α -AMILASE DE *Cryptococcus flavus* e de *Aspergillus niger* HM2003

PRODUÇÃO DA ENZIMA α -AMILASE DE *Cryptococcus flavus*

1. INTRODUÇÃO

O uso de cereais como fonte de energia em rações para aves é amplamente difundido, pois permite aporte energético suficiente para suprir as necessidades de manutenção e produção.

O amido de milho contém de 60 a 68% de amido (JACQUES et al., 1999). De acordo com BRAMBILLA (2001), o milho (*Zea mays*) é um cereal de grande utilização industrial, seja para indústrias processadoras de ração animal ou para consumo humano. Na maioria dos animais não-ruminantes, a digestão do amido de cereais depende de inúmeros fatores, como origem botânica, no que se refere à textura do endosperma e à relação amilose/amilopectina, e o tipo de processamento do alimento, o qual pode propiciar transformações físicas benéficas sobre a digestibilidade dos grânulos de amido (DE BLAS, 1984; CHEEKE, 1987).

Na natureza encontram-se várias fontes complexas de carbono tais como: amido, celulose e quitina. Estes polissacarídeos podem ser usados como fontes de energia para a maioria dos organismos vivos (VAN DER MAAREL et al, 2002). A produção de plantas amiláceas supre aproximadamente 4/5 da demanda mundial de alimentos em termos de calorias (EDUARDO, 2002).

No Brasil, os amidos mais isolados industrialmente são os amidos de milho e mandioca (KARAM, 2003). As duas principais estruturas químicas formadoras do amido são conhecidas por amilose e amilopectina. Estas estruturas são responsáveis por aproximadamente 98% do amido em peso seco, sendo que o teor de cada polissacarídeo depende da fonte botânica em questão (TESTER et al., 2004). A disposição destas identidades químicas dentro do grânulo de amido ainda não é completamente compreendida, no entanto, o empacotamento de ambas é muito bem organizado. Além disso, o conteúdo destes polissacarídeos afeta a arquitetura do grânulo, as propriedades térmicas, podendo afetar sua aplicação em alimentos industrializados (LACERDA, 2006).

A amilose é um polímero linear contendo cerca de 6.000 unidades de glicose unidos entre si por ligações glicosídicas do tipo α -1,4. Apesar da consideração que a amilose é essencialmente linear, atualmente é evidenciado que a amilose não assume completamente esta característica (KARIM, et al., 2000).

A amilopectina consiste em cadeias lineares mais curtas de ligações α -1,4 contendo 10 a 60 unidades de glicose e cadeias laterais de ligação α -1,6 com 15 a 45 unidades de glicose (VAN DER MAAREL et al., 2002). Uma molécula completa de amilopectina contém cerca de 2.000.000 de unidades de glicose, sendo considerada uma das maiores moléculas da natureza.

As amilases representam a maior parte do mercado de enzimas no mundo. A maior aplicação para a α -amilase está na produção de hidrolisados de amidos (GUPTA et al., 2003).

O *Cryptococcus flavus* está sendo estudado e testado na produção da α -amilase, para otimização de processos da enzimologia industrial, portanto, não se tem dados conclusivos de sua aplicação, sendo este trabalho o primeiro de sua aplicação na indústria de alimentação animal.

As α -amilases (1,4- α -D-glucano glucanohidrolase, EC 3.2.1.1) são endoenzimas que hidrolisam de forma aleatória as ligações glicosídicas do tipo α -1,4 do amido liberando unidades de glicose, maltose, maltotriose, maltopentose e dextrinas de alta massa molar. A maioria das α -amilases é capaz de contornar as ligações do tipo α -1,6 encontradas nos pontos de ramificação sem, no entanto, clivá-las. Entretanto, SAKANO et al. (1982), descreveu que uma α -amilase de *Thermoactinomyces vulgaris* tem a capacidade de hidrolisar tanto ligações α -1,4 como α -1,6.

A ação da α -amilase sobre a amilose se dá em duas etapas. A primeira consiste no ataque aleatório e rápido do substrato, resultando maltose e maltotriose, enquanto que a segunda, bem mais lenta, permite a formação de glicose e maltose, LACERDA (2006).

Os parâmetros que estimulam a produção de amilases, as condições de crescimento microbiano e os substratos de carbono usados no meio de cultivo têm recebido atenção especial. Fontes de carbono como dextrina, frutose, glicose, lactose, maltose, amido solúvel, além de outras, encarecem sua produção (HAQ et al., 2002). No meio de cultivo, esses substratos podem ser substituídos por produtos e subprodutos agrícolas de baixo custo, o que torna o processo de produção dessas enzimas mais viável economicamente. Com esse objetivo, farinhas e farelos de diferentes grãos e tubérculos como arroz, cevada, milho, trigo,

mandioca e batata têm sido usadas no meio de cultura para aumentar a produtividade de amilases de fungos e bactérias (HAQ et al., 2002; HAQ et al., 2005; RAMESH et al., 2001).

Para auxiliar o processo digestivo de frangos de corte, objetivou-se a produção da enzima α -amilase, com meio a base de ração produzida pela levedura *Cryptococcus flavus* para acréscimo na ração das aves, num período de 1 a 21 dias de idade.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Procedimentos gerais

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Enzimologia da Universidade Federal de Goiás. A levedura utilizada neste trabalho, *Cryptococcus flavus*, foi isolada de amostras de solo da região do cerrado, pelo grupo de Biologia Molecular da Universidade de Brasília. Este microrganismo possui alto poder de produção da enzima α -amilase como citado por WANDERLEY et al. (2004).

2.2. Manutenção

Para manutenção do *Cryptococcus flavus*, utilizou-se placas de Petri, contendo o meio mínimo YNB (*Bacto Yeast Nitrogen base without amino acids*) constituído de: 0,67% YNB, 2% de glicose, 2% bacto-ágar e água destilada, a temperatura de 28⁰C (WANDERLEY et al., 2004). Foram testados outros meios para manutenção, dentre eles, foi utilizado 1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 2% de glicose, com tampão fosfato com pH 5,5. Obteve-se com esse meio, o mesmo crescimento das colônias da levedura.

2.3. Produção

A produção da α -amilase de *Cryptococcus flavus* foi feita em meio líquido, consistindo no pré-inóculo, com colônias inoculadas em 10 mL de meio SD (0,67% de YNB e 2% de glicose), que foi incubado a agitação constante de 180rpm, a 28⁰C, por 24 horas. Foi testado, um pré-inóculo contendo 0,67% de extrato de levedura e 2% de glicose e tampão fosfato 5,5, obtendo o mesmo resultado que o YNB.

Foi transferido um mL do pré-inóculo para erlenmeyer de 500 mL, contendo 100 mL do meio de indução. A partir desta fase, a fermentação foi conduzida a 28⁰C com rotação de 180 rpm.

2.4. Teste de patogenicidade do *Cryptococcus flavus*

Devido a grande possibilidade biotecnológica do *Cryptococcus flavus* em produzir enzimas foi feito um teste preliminar para sua manipulação, pois o *Cryptococcus neoformas* é altamente patogênico.

O objetivo deste trabalho foi à verificação da patogenicidade através da hemólise do *Cryptococcus flavus* em meio de ágar com hemácias de carneiro para visualização de hemólise em placas.

Foi feito o meio de ágar Mueller-Hinton da Merck na proporção de 34g/L com hemácias de carneiro desfibriladas da Bioshop conservadas entre dois a oito graus Celsius. As hemácias de carneiro foram usadas pela semelhança com as hemácias de humanos. Foram feitas três análises com cinco placas (15 placas) para que se pudesse ter a confiabilidade dos resultados. O *Cryptococcus flavus* foi inoculado nas placas em retas e mantido em estufa com temperatura de 28⁰C. Esperaram-se de dez a quinze dias para análise da hemólise. As placas foram colocadas contra a luz para verificação de alguma mancha sobre a cultura e em local branco para não haver nenhuma interferência na análise de cor.

2.5. Indução com amido, milho moído e ração pré-inicial

Foram feitos testes com o indutor, para a seleção do meio que apresentava maior atividade da enzima. Foram testados como meios de indução o amido, o milho e ração pré-inicial que tem aproximadamente 59% de milho e 35% de farelo de soja, com períodos de tempos de 24, 48, 72, 96 e 120 horas. A ração foi feita na fábrica de ração da Avicultura do Departamento de Produção Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás (Tabela 1) e milho foi coletado da mesma fábrica. Foi feito o pré-inóculo com extrato de levedura, glicose e tampão fosfato com pH 5,5 (esterilizado) inoculando-se colônias da levedura sob agitação constante (180 rpm) a 28⁰C. Os meios testados foram esterilizados com mesmo tampão e utilizados na proporção de 2g/mL e adicionados de um mL do pré-inóculo e colocado nas mesmas condições acima. As amostras coletadas, em triplicata, nos tempos determinados foram centrifugadas a 8.000 rpm por 10 minutos e analisadas.

Tabela 1. Composição percentual e nutricional da ração pré-inicial (1-7 dias), na matéria natural.

Ingredientes (kg)	Quantidade
Milho	58,954
Farelo de soja	34,877
Óleo vegetal	1,690
Fosfato bicálcico	1,905
Calcário	0,924
Sal	0,447
L-Lisina.HCl (%)	0,353
DL-Metionina99(%)	0,351
Premix mineral/vitamínico ¹	0,500
Composição Química	
Energia metabolizável (kcal/kg)	2,950
Proteína (%)	22,000
Triptofano (%)	0,293
Lisina (%)	1,466
Metionina + cistina (%)	1,041
Metionina (%)	0,684
Treonina (%)	0,850
Sódio (%)	0,223
Cálcio (%)	0,939
Fósforo disponível (%)	0,470

¹Suplemento mineral e vitamínico. Micromim Aves (suplemento mineral em mg): Manganês 150.000, Zinco 100.000, Ferro 100.000, Cobre 16.000, Cloreto de Colina 60.000 e Iodo 1.500. Premix Inicial (Suplemento vitamínico): Vitamina A 8.000.000 UI, Vitamina D₃ 2.000.000 UI, Vitamina E 15.000 UI, Vitamina K 1.800mg, Vitamina B₁ 1.800 mg, Vitamina B₂ 6.000 mg, Vitamina B₆ 2.800 mg, Vitamina B₁₂ 12.000 mg, Niacina 40.000 mg, Ácido Fólico 1.000 mg, Ácido Pantotênico 15.000 mg, Biotina 60 mg, Selênio 300 mg, Antioxidante 30 g.

Os parâmetros analisados foram: açúcar redutor pelo método do DNS, (MILLER, 1959) e atividade da enzima α -amilase com iodo (FUWA, 1954). O objetivo deste experimento foi analisar o perfil da quantidade de açúcar redutor liberado e atividade da enzima α -amilase produzida com os meios de milho, amido e ração pré-inicial, para maximizar a produção da amilase com menor tempo de produção.

2.6. Induções com extrato de levedura combinado com sulfato de amônio, uréia, ração, amido e YNB

Foram feitos testes com 24 e 48 horas, para extrato de levedura combinado com sulfato de amônio, uréia, ração e amido, com proporção fixa de extrato de levedura de 0,34%, além do meio YNB. Os níveis de combinação são mostrados na Tabela 2 abaixo. Foi feito o

pré-inóculo com extrato de levedura, glicose e tampão fosfato com pH 5,5 (esterilizado) inoculando-se colônias da levedura sob agitação constante (180 rpm) a 28°C. Os meios testados foram esterilizados com mesmo tampão e adicionados de um mL do pré-inóculo e colocado nas mesmas condições acima. As amostras coletadas, em triplicata, nos tempos determinados, foram centrifugadas a 8.000 rpm por 10 minutos e analisadas. Os parâmetros analisados foram atividades da enzima α -amilase com iodo (FUWA, 1954) e depois para os três meios que apresentaram maior atividade foram feitas análises para açúcar redutor pelo método do DNS, (MILLER, 1959) e proteína pelo método do Biureto.

Tabela 2: Meios testados para produção da α -amilase no período de 24 horas

Tratamentos	Meios testados				
	Extrato de levedura (%)	Sulfato de amônio	Uréia	Ração	Amido
1	0,34	*	*	1%	*
2	0,34	*	*	0,50%	*
3	0,34	5g/L	*	1%	*
4	0,34	5g/L	*	0,50%	*
5	0,34	2,5g/L	*	1%	*
6	0,34	2,5g/L	*	0,50%	*
7	0,34	5g/L	*	*	1%
8	0,34	5g/L	*	*	0,50%
9	0,34	2,5g/L	*	*	1%
10	0,34	2,5g/L	*	*	0,50%
11	0,34	*	5g/L	1%	*
12	0,34	*	5g/L	0,50%	*
13	0,34	*	2,5g/L	1%	*
14	0,34	*	2,5g/L	0,50%	*
15	0,34	*	5g/L	*	1%
16	0,34	*	5g/L	*	0,50%
17	0,34	*	2,5g/L	*	1%
18	0,34	*	2,5g/L	*	0,50%
19	YNB ¹				

¹/ Yeast nitrogen base.

2.7. Produção no reator de 2 litros

A produção da enzima α -amilase, foi feita, também, em um reator de 2 litros. Este reator continha um banho termoestabilizador, colocado em um agitador magnético e temperatura controlados. A aeração não foi controlada, mas havia dois filtros, um na entrada e outro na saída para que se evitasse a entrada de outros microrganismos.

Foi feito o pré-inóculo com extrato de levedura, glicose e tampão fosfato com pH 5,5 (esterilizado) inoculando-se colônias da levedura sob agitação constante (180 rpm) a 28^oC. O meio utilizado foi o mesmo meio com 1% de ração (Tabela 1) e 0,34% de extrato de levedura que foram esterilizados com mesmo tampão e adicionado do pré-inóculo. Todo o material utilizado do reator, como mangueiras, filtros, foram também autoclavados. As amostras coletadas, em triplicata, nos tempos determinados foram centrifugadas a 8.000 rpm por 10 minutos e analisadas. Os parâmetros analisados foram: atividade da enzima α -amilase com iodo (FUWA, 1954), análises para açúcar redutor pelo método do DNS, (MILLER, 1959) e proteína pelo método do Biureto.

2.8. Análise estatística:

A análise estatística foi feita pelo SAEG 9.5 (2007), utilizando teste de Tukey com 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Teste de patogenicidade do *Cryptococcus flavus*

Não foi observado nenhum tipo de hemólise nas quinze placas analisadas. Este resultado encontrado verifica a não patogenicidade do *Cryptococcus flavus* perante hemácias de carneiro, resultado que pode ser extrapolado para mamíferos devido a grande semelhança das hemácias. O fato do *Cryptococcus flavus* não ser patogênico nos respalda da sua manipulação em laboratório, com a devida segurança, assim como outros microrganismos.

O *Cryptococcus flavus* está sendo usado para produção biotecnológica de diversas enzimas como amilase e lipase, importantes para vários tipos de indústrias. Para aplicabilidade das enzimas produzidas pelo *Cryptococcus flavus* na alimentação animal é necessário algumas informações sobre sua patogenicidade. Por se tratar de um microrganismo selvagem, encontrado nos solos do cerrado brasileiro, ainda tem-se pouca informação sobre sua patogenicidade.

Criptococose é uma infecção fúngica sistêmica, predominantemente oportunística, causada pela levedura encapsulada *Cryptococcus neoformans*, a qual afeta o sistema nervoso central, respiratório e tegumentar. O comprometimento da resposta imune é o principal fator

predisponente para a ocorrência da doença, sendo os pacientes com doenças imunodepressoras como a síndrome da imunodeficiência adquirida (aids), neoplasias linfoproliferativas ou sarcomas, sob tratamento imunossupressor ou transplantados, mais suscetíveis à doença (KNOW-CHUNG & BENNETT, 1992; MITCHELL & PERFECT, 1995; CASADEVALL & PERFECT, 1998; PAPPALARDO & MELHEM, 2003). Devido à extrema patogenicidade do *Cryptococcus neoformans* houve uma preocupação de se trabalhar com *Cryptococcus flavus*.

3.2. Indução com amido, milho moído e ração pré-inicial

O meio de indução que apresentou maior dosagem de açúcar redutor liberado foi o milho moído, com média de 1,09 μmol , sendo o pior para a produção de amilase de 2,48 U/mL, provavelmente devido à alta concentração de glicose no meio. O amido apresentou menor liberação açúcar redutor (0,87 μmol) e produção intermediária de amilase (3,45 U/mL). A maior produção de amilase foi com o meio de indução da ração pré-inicial (4,53 U/mL) e foi o meio que produziu açúcar redutor intermediário (0,97 μmol). O melhor meio de indução para a produção da α -amilase pelo *Cryptococcus flavus* foi à ração pré-inicial com custos baixos para sua aplicação na nutrição avícola. Outra alternativa, seria utilizar meios com uma porcentagem menor dos ingredientes usados, em vez de 2 g/mL.

A Tabela 3 apresenta os dados analisados de açúcar redutor e atividade de amilase estatisticamente e para melhor visualização da interação dos meios com as horas, são mostradas nas Figuras 1 e 2.

O perfil apresentado para as horas dos meios induzidos comprova que há maior liberação de açúcar redutor no meio induzido, com 24 horas para milho, seguido de ração pré-inicial e amido com menor liberação.

Para atividade da enzima α -amilase, o melhor meio para produção foi à ração pré-inicial.

Os dados analisados comprovam que o meio induzido com ração pré-inicial a 2% usando o *Cryptococcus flavus*, no período de 24 horas, apresenta maior produção de amilase com menor tempo de produção, produzindo liberação de açúcar redutor.

Tabela 3. Teores de açúcar redutor e atividades da α -amilase resultados dos meios testados com 2% de milho, amido e ração pré-inicial nos tempos de 24, 48, 72, 96 e 120 horas

Meios	Açúcar Redutor (micromol)	Amilase (U/mL)
Milho Moído	1,09a	2,48c
Amido	0,87c	3,45b
Ração pré-inicial	0,97b	4,53a
Valor de P	0,00012	0,00002
Tempo (horas)	Açúcar Redutor (micromol)	Amilase (U/mL)
24	0,88b	4,76a
48	0,95ab	2,17c
72	1,06a	3,18bc
96	1,03ab	3,51b
120	0,98ab	3,81ab
Valor de P	0,01746	0,00013
Interação (ração e tempo)	Açúcar Redutor (micromol)	Amilase (U/mL)
Milho * 24	1,12a	0,1b
Milho * 48	1,12a	0,1b
Milho * 72	0,98a	3,61a
Milho * 96	1,12a	4,60a
Milho * 120	1,12a	4,20a
Amido * 24	0,87ab	4,87a
Amido * 48	0,75b	2,92a
Amido * 72	1,08ab	2,91a
Amido * 96	0,84ab	3,12a
Amido * 120	0,81b	3,42a
Ração pré-inicial * 24	0,65b	9,41a
Ração pré-inicial * 48	0,97a	3,59b
Ração pré-inicial * 72	1,12a	3,02b
Ração pré-inicial * 96	1,12a	2,81b
Ração pré-inicial * 120	1,00a	3,81b
Valor de P	0,00188	0,00000
CV (%)	8,56	18,95

^{abc/}Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna são diferentes pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade.

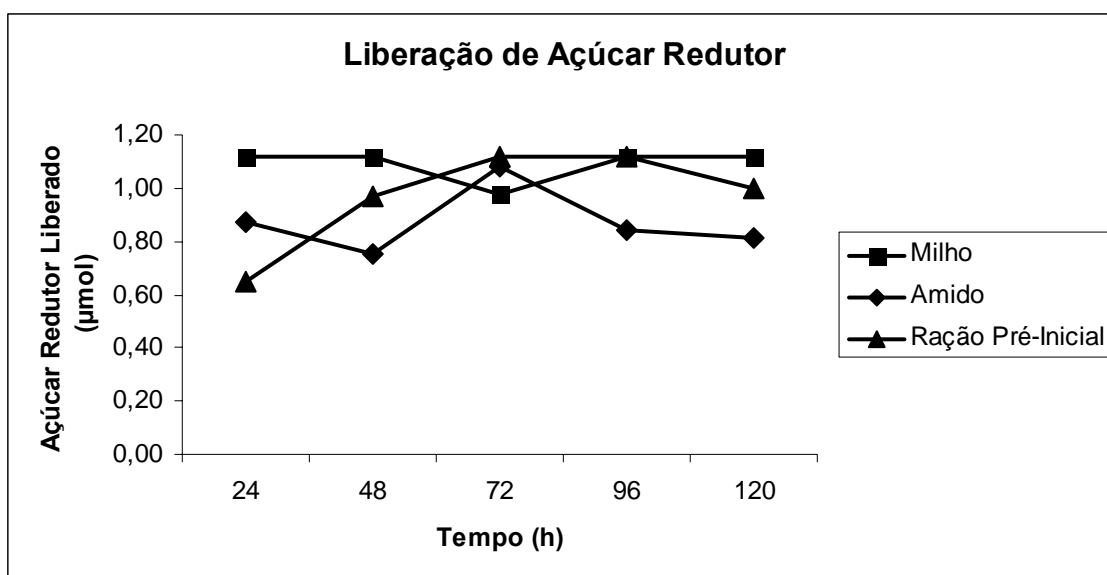


Figura 1. Liberação de açúcar redutor dos meios de milho, amido e ração pré-inicial.

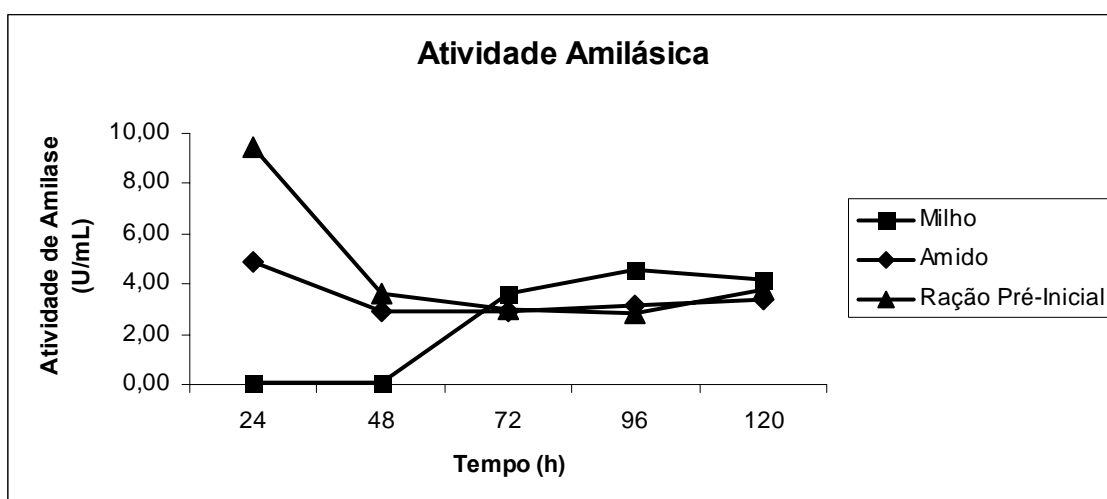


Figura 2. Atividade de amilase dos meios constituídos de milho, amido e ração pré-inicial.

3.3. Meios induzidos com extrato de levedura combinado com sulfato de amônio, uréia, ração, amido e YNB

Novos meios para produção enzimática estão sendo testados, principalmente com subprodutos das indústrias, pois apresentam fontes variadas de substratos. Um dos substratos utilizados neste experimento, ração pré-inicial, apresenta vários substratos para ação do *Cryptococcus flavus* na produção enzimática. Este experimento tem o objetivo de avaliar, as combinações e quantidades.

Os resultados das atividades da enzima encontrados nos meios num período após 24 e 48 horas são apresentados na Tabela 4.

De acordo com as maiores médias de atividade da enzima amilase, analisou-se a concentração de açúcares redutores e proteína solúvel por BRADFORD para os tratamentos com extrato de levedura (0,34%) e ração (1%), extrato de levedura (0,34%), uréia (2,5g/L) e amido (0,50%) e com o YNB. Os resultados são mostrados na Tabela 5.

Tabela 4. Atividades da α -amilase no período de 24 e 48 horas com meios testados com variações e os asteriscos indicam ausência do reagente

Meios	Meios Testados						Amilase (U/mL)	
	Extrato de levedura (%)	Sulfato de amônio	Uréia	Ração	Amido	YNB ¹	24 hs	48 hs
1	0,34	*	*	1%	*	*	5,76	9,58
2	0,34	*	*	0,50%	*	*	6,28	8,32
3	0,34	5g/L	*	1%	*	*	5,73	8,80
4	0,34	5g/L	*	0,50%	*	*	5,92	8,70
5	0,34	2,5g/L	*	1%	*	*	5,40	8,96
6	0,34	2,5g/L	*	0,50%	*	*	4,55	8,99
7	0,34	5g/L	*	*	1%	*	6,45	6,94
8	0,34	5g/L	*	*	0,50%	*	6,58	7,03
9	0,34	2,5g/L	*	*	1%	*	6,46	7,13
10	0,34	2,5g/L	*	*	0,50%	*	4,84	7,44
11	0,34	*	5g/L	1%	*	*	5,76	1,43
12	0,34	*	5g/L	0,50%	*	*	5,23	1,00
13	0,34	*	2,5g/L	1%	*	*	5,17	1,28
14	0,34	*	2,5g/L	0,50%	*	*	5,01	0,49
15	0,34	*	5g/L	*	1%	*	5,53	1,69
16	0,34	*	5g/L	*	0,50%	*	0,01	1,20
17	0,34	*	2,5g/L	*	1%	*	4,28	8,91
18	0,34	*	2,5g/L	*	0,50%	*	5,98	9,01
19	*	*	*	*	*	2%	6,67	9,15

¹ Yeast Nitrogen Base

* Ausência do componente

Tabela 5. Teores de amilase, açúcar redutor, proteína e atividade específica dos meios testados

Meios	Amilase (U/mL)	Açúcar reductor (μ mol)	Proteína (mg)	Atividade Específica (U/mg)
Extrato de levedura e ração	9,58	0,353c	32,80a	0,292b
Extrato de levedura, uréia e amido	9,01	0,716a	19,42b	0,463a
YNB ¹	9,15	0,431b	18,01b	0,508a
Valor de P	0,09750	0,00018	0,0050	0,00065
CV (%)	1,94	2,50	3,21	5,69

^{abc} Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna são diferentes pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade.

¹ **Yeast Nitrogen Base**

Estes resultados explicam, porque o meio usado foi extrato de levedura e ração, pois é o meio extremamente rico, em minerais, lipídeos e aminoácidos para se utilizar (Tabela 1). Descartou-se logo, a utilização do meio YNB, pois é um meio que contém somente aminoácidos, além de ser um meio menos viável economicamente para se utilizar em grande escala na produção enzimática. O meio utilizado para a produção da amilase foi padronizado e a partir daí iniciou-se a produção para aplicação nas rações animais.

Toda a produção foi verificada com lâminas de gram, para verificação de contaminação de bactérias do meio, utilizando o microscópio. Quando constatada a presença de bactérias o meio foi descartado, para que não houvesse interferência na produção de amilase pelo *Cryptococcus flavus*. Com isso, evitou-se a contaminação do meio com produtos indesejáveis.

3.4. Produção no reator de 2 litros

Para tentar maior produção enzimática, utilizou-se produção no reator de 2 litros, sendo uma opção para se aumentar a quantidade de enzima.

As atividades apresentadas para a produção no reator foram apresentadas na Tabela 6 abaixo:

Tabela 6. Produção da enzima α -amilase no reator de 2 litros para açúcar redutor, proteína, atividade amilase e atividade específica.

Período (horas)	Açúcar redutor liberado (μmol)	Parâmetros analisados		
		Proteína (mg)	Amilase (U/mL)	Atividade Específica (U/mL*mg)
24	0,118 ^c	17,375 ^a	5,374 ^c	0,309 ^b
48	0,700 ^a	18,312 ^a	8,114 ^a	0,443 ^b
72	0,500 ^b	9,432 ^b	6,273 ^b	0,674 ^a
Valor de P	0,00000	0,00003	0,00000	0,00075
CV (%)	7,78	5,94	2,32	12,25

^{abc} Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna são diferentes pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade.

Pelos resultados encontrados, comprovou-se que o reator acompanha o mesmo tempo ótimo para a reação feita em agitador que é de 48 horas, pois a melhor atividade da enzima (8,114U/mL) e da liberação de açúcar redutor (0,700 μmol) acontece neste tempo, mesmo sendo a atividade específica intermediária (0,443U/mL*mg).

PRODUÇÃO DA ENZIMA α -AMILASE DE *Aspergillus niger* HM2003

1. INTRODUÇÃO

As amilases de fungos filamentosos como o *Aspergillus* sp já são bem estudadas em processos industriais de várias áreas.

As amilases fúngicas normalmente obtidas a partir de *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori* ou espécies de *Rhizopus* têm sido utilizadas como suplemento na atividade amilolítica. Enzimas desta origem têm como finalidade o aumento dos níveis de monossacarídeos e dissacarídeos fermentáveis, promovendo uma melhor condição ao fermento (NAGODAWITHANA & REED, 1993).

Conforme PANDEY et al. (2005), as enzimas amilolíticas também são produzidas por fungos filamentosos, sendo preferidas espécies de *Aspergillus* e *Rhizopus*, todavia, as enzimas produzidas por *Aspergillus* dominam o mercado por serem mais tolerantes a temperaturas elevadas.

Para auxiliar o processo digestivo de frangos de corte, objetivou-se a produção da enzima α -amilase, com meios mais econômicos produzido pelo fungo *Aspergillus niger* HM2003 para acréscimo na ração das aves, num período de 1 a 21 dias de idade.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Procedimentos gerais

A produção da enzima α -amilase de *Aspergillus niger* HM2003 foi feita no Laboratório de Biotecnologia da Universidade do Rio Grande do Sul.

2.2. Manutenção

O método utilizado para a conservação das cepas foi repicagem em agar Sabouraud comercial. O meio foi autoclavado e colocado em tubos inclinados. Depois de inoculados foram incubados a 28°C por oito dias. Os esporos foram recuperados da superfície do meio utilizando-se água destilada estéril contendo 0,2% de Tween.

2.3. Produção

Usou-se uma suspensão de esporangiósporos (solução de esporos) na concentração de 10^6 esporos/mL, a concentração de esporos na suspensão foi estimada pela contagem em microscópio usando câmara de Neubauer (RAIMBAULT & ALAZARD, 1981).

O ensaio de produção de amilase foi realizado utilizando o meio de cultivo preparado com 10g/L de proteína de soja comercial, desengordurada PS 60 da empresa OLVEBRA S.A. (Tabela 1) e 10g/L de amido solúvel. O pH do meio foi ajustado para pH 7,0 antes do processo de esterilização. Os mesmos foram cultivados em triplicata em 25mL de meio, utilizando um frasco Erlenmeyer de 125mL e incubados por 72 horas, em agitador de plataforma, regulado a 200 rpm e 28°C . A cada 12 horas de incubação foram retiradas alíquotas de 400 μL do meio, centrifugada a 14.000 rpm por 5 minutos, para determinação da atividade.

Foi utilizada seis ao meio de cultivo no meio de produção da amilase, como mostrado na Tabela 2.

A solução foi colocada no reator de 2 litros esterilizado, que ficou por 24 horas, fazendo-se controle de lâminas de gram, para não haver contaminação do meio.

Posteriormente utilizou-se outro reator de 6 litros esterilizado com o meio de indução de 1% de proteína de soja e 1% de amido comercial, fazendo-se também o controle com lâminas de gram, para verificar a isenção de contaminação. Somente a partir destas etapas é que houve a inoculação no reator de 100L.

O biorreator contendo o meio de produção foi autoclavado a 121°C por 1 hora. Neste ensaio, foram mantidos os parâmetros de agitação de 180 rpm, taxa de aeração de 1,0 vvm e temperatura de 28°C .

Nesta fase também foi feito à verificação de contaminação com lâminas de gram. Depois de fermentado por 48 horas, o produto foi para um concentrador, onde se tirou a biomassa e concentrou-se a amostra. A concentração foi feita por membrana de ultra filtração de celulose regenerada com poro de 10 kDa e de 50 kDa.

Tabela 1. Composição percentual média da proteína de soja, OS 60 e composição média em aminoácidos

Proteína de soja PS 60	Composição média (%)
Umidade	6,00
Proteína (N x 6,25)	60,00
Lipídeos	1,50
Cinzas	7,50
Fibras	1,50
Carboidratos	23,5
Aminoácidos	
Ácido aspártico	6,49
Ácido glutâmico	-
Alanina	1,66
Arginina	5,83
Cistina	8,26
Fenilalanina	3,11
Glicina	1,56
Hidroxiprolina	-
Histidina	0,46
Isoleucina	2,01
Leucina	4,15
Lisina	2,45
Metionina	0,43
Prolina	3,31
Serina	2,40
Tirosina	1,12
Treonina	5,03
Triptofano	0,74
Valina	3,41

Fonte: OLVEBRA (2003).

Tabela 2. Solução de sais adicionados aos meios de cultivo

Componente	Concentração (g/L)
MgSO ₄ . 7H ₂ O	30
MnSO ₄ . H ₂ O	2
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	2
FeSO ₄ . 7H ₂ O	2

2.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida para os meios dos microrganismos *Cryptococcus flavus* e *Aspergillus niger* HM2003

O gel com técnica de Eletroforese de Proteínas em Gel Desnaturante de Poliacrilamida (SDS-PAGE) foi feito para verificação da presença de proteínas com 48 horas de indução nos meios com extrato de levedura (0,34%) e ração (1%) com *Cryptococcus flavus* e proteína de soja (1%) e amido comercial (1%) com *Aspergillus niger* HM2003.

Para feitura da Eletroforese de Proteínas em Gel Desnaturante de Poliacrilamida (SDS-PAGE), foi feita a Acrilamida:Bis-acrilamida (39:1), tampões Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, Tris-HCl 1 M pH 6,8, SDS 10% (p/v), persulfato de amônia (1:10), 10% (p/v) Ácido Tricloroacético (1:1), Tampão de Amostra, Tampão de corrida – Tris-glicina, utilizou-se o marcador de massa molecular para proteínas. Para a revelação das proteínas usou-se corante azul de “coomassie” com solução corante e solução descorante para “coomassie blue”, coloração com nitrato de prata com solução de fixação, solução de lavagem, solução de tratamento, solução de equilíbrio, solução de revelação, solução de parada, solução descorante para prata, solução de encolhimento de géis.

A eletroforese de proteínas foi conduzida em gel desnaturante de poliacrilamida segundo a descrição de LAEMMLI (1970) em um sistema de eletroforese da Amersham® (Mighty Small™ SE245 – Dual Gel Caster), onde se preparou os géis: gel concentrador e o gel separador.

Preparo das Amostras

As amostras protéicas foram precipitadas na presença de 10% de TCA, homogeneizadas e incubadas em banho de gelo e água por 1 h, em seguida, submetidas à centrifugação a 8000 g a 4°C por 10 min. O sedimento foi lavado com 500 µL de acetona gelada. Após ser submetida a centrifugação nas mesmas condições anteriores, o sedimento foi

ressuspensão com tampão de amostra, fervido por 5 min e analisado imediatamente ou estocado a -20 °C.

Corrida Eletroforética

A corrida foi conduzida em tampão de corrida 1X com uma voltagem constante de 80 V utilizando o sistema de eletroforese vertical.

Coloração com “Coomassie Blue”

As bandas protéicas presentes no gel foram visualizadas após a incubação deste por 15 h, sob agitação, na solução corante preparada com “Coomassie Brilliant Blue”, seguida pela descoloração, incubando o gel por 30 min, sob agitação, na solução descorante.

Coloração com prata pelo Método de BLUM et al. (1987)

Após a corrida, as bandas protéicas presentes no gel foram reveladas utilizando-se o método descrito por BLUM et al. (1987). O gel foi incubado, sob agitação, por 1 h na solução fixadora, em seguida, lavado três vezes com solução de lavagem por 20 min cada vez. Após as lavagens o gel foi incubado na solução de tratamento por 1 min, lavado 3 vezes com água destilada durante 30 segundos cada e, em seguida, incubado por 20 minutos na solução de equilíbrio. Novamente o gel foi lavado com água destilada por duas vezes de 20 segundos cada e revelado com a solução de revelação. A reação foi interrompida, após o aparecimento das bandas, transferindo-se o gel para a solução de parada.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O gel com a banda de número um representa o meio extrato de levedura (0,34%) e ração (1%) com *Cryptococcus flavus* e o número dois proteína de soja (1%) e amido comercial (1%) com *Aspergillus niger* HM2003, o símbolo M é o marcador molecular (Figura 1).

No meio com extrato levedura e ração do *Cryptococcus flavus* há grande concentração de outras proteínas, o que pode ser justificado a presença de outras enzimas no meio. Peso molecular encontrado por WANDERLEY et al. (2004) para α -amilase de *Cryptococcus flavus* foi de 75kDa, utilizando vários processos para purificação. Meio com proteína de soja e amido do *Aspergillus niger* HM2003, observa-se duas bandas proeminentes, o que indica que

a concentração serviu para a purificação do extrato. MITIDIERI et al. (2006) trabalharam com *Aspergillus niger* L119 e encontraram peso molecular de 60kDa, todavia para *Aspergillus niger* HM2003, não se pode afirmar ao certo, devido à presença das duas bandas.

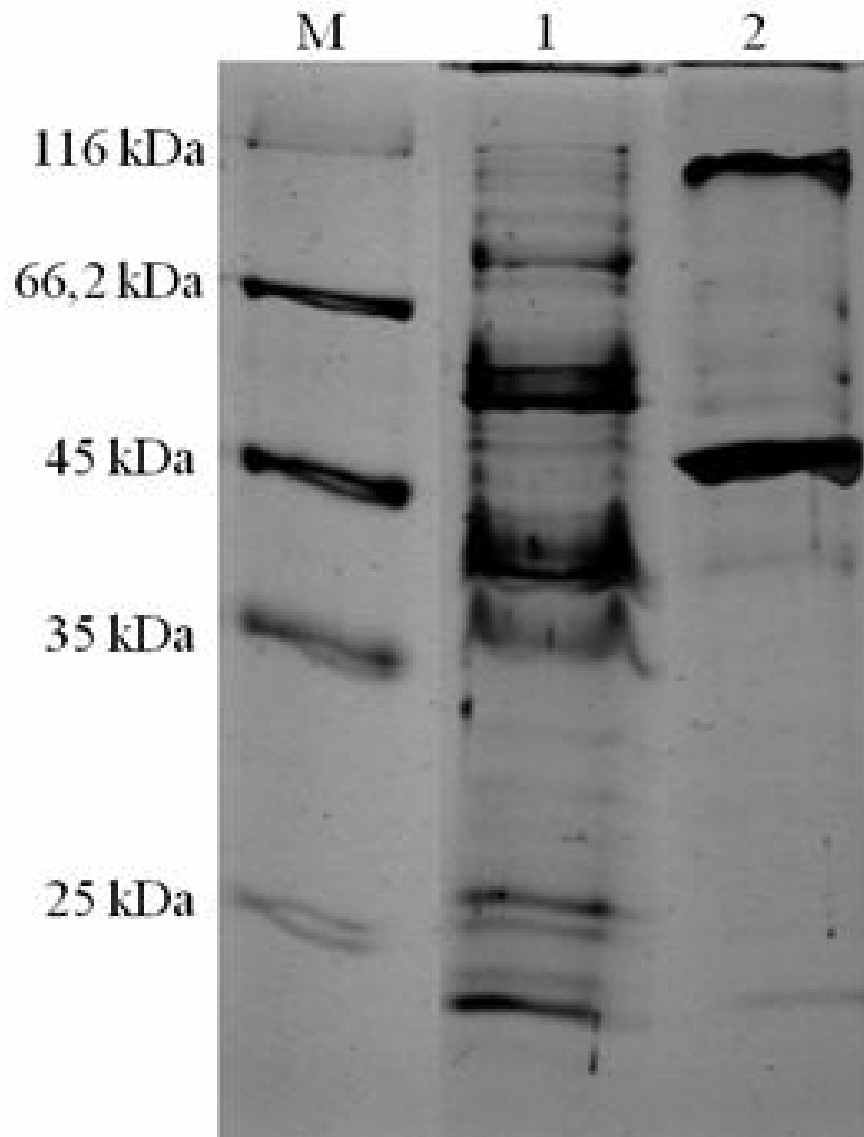


Figura 1. Eletroforese em gel de poliacrilamida com (M) marcador molecular e os meios: (1) extrato levedura e ração do *Cryptococcus flavus* e (2) proteína de soja e amido do *Aspergillus niger* HM2003.

4. CONCLUSÕES

O *Cryptococcus flavus* é um produtor de amilase em potencial, sendo uma levedura não patogênica, apresentando vários meios para sua produção com atividades viáveis para aplicação na alimentação de frangos de corte.

O *Aspergillus niger* HM2003 é um fungo produtor de amilase, sendo também um produtor de amilase para incremento na alimentação de frangos de corte.

5. REFERÊNCIAS

- BLAZEVIC, D. J. & EDERER, G. M. **Principles of biochemical tests in diagnostic microbiology**, New York: John Wiley & Sons,. 1975, 136 p
- BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H.J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v.8, p.93-99, 1987.
- BRAMBILLA, E. M. **Obtenção do amido de milho através da moagem via úmida e seus diferentes tipos de modificação química**. Arapongas: Universidade do Norte do Paraná. 126p. Monografia (Conclusão de curso superior). Universidade do Norte do Paraná, 2001.
- BUZZINI, P. & MARTINI, A. Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments. **J. Appl. Microbiol.**, v.93, n.6, p.1020-1025, 2002.
- CASADEVALL, A. & PERFECT, J. R. **Cryptococcus neoformans**. Washington, DC: American Society for Microbiology Press, 1998. 541p.
- CHEEKE, P.R. **Rabbit feeding and nutrition**. 3.ed. Oregon: Academic Press 1987. 380p.
- DE BLAS, C. **Alimentación del conejo**. 3.ed. Madrid: Mundi-Prensa, 1984. 175p.
- EDUARDO, M. P. **Hidrólise enzimática de mandioca e puba para obtenção de xarope de maltose**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz. 54p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz, 2002.
- FUWA, H. J. A new method for microdetermination of amylase activity by use the amylose as the subsbtrate. **Journal Biochemical**, v.41, p.583-603, 1954.
- GUPTA, R. et al. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, v.00, p.1-18, 2003.
- HANKIN, L. & ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzymes production by fungi. **Mycologia**, v.67, n.3, p.597-607, 1975.
- HAQ, I.; ASHRAF, H.; QADEER, M. A.; IQBAL, J. Pearl millet, a source of alpha amylase production by *Bacillus licheniformis*. **Bioresour. Technol.**, v.96, n.10, p.1201-1204, 2005.
- HAQ, I.; ASHRAF, S.; OMAR, S.; QADEER, M. A. Biosynthesis of Amyloglucosidase by *Aspergillus niger* using wheat bran as substrate. **Pak. J. Biol. Sci.**, v.5, n.9, p.962-964, 2002.
- JACQUES, K., LYONS, T. P., KELSALL, D. R. **The alcohol textbook**. 3.ed. Nottingham: Nottingham Press, 1999. 386p.
- KADO, C. I. **Methods in Plant Bacteriology**. University of California-Davis: Department of Plant Pathology, 1977. p.86
- KARAM, L. B. **Propriedades funcionais de multi-misturas de amidos de milho, mandioca e cará e sua relação com as características físicas e moleculares**. Londrina:

- Universidade Estadual de Londrina, 2003. 133p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, 2003.
- KARIM, A. A.; NORZIAH, M. H.; SEOW, C. C. Methods for the study of starch retrogradation. **Food Chemistry**, v.71, n.11, p.9-36, 2000.
- KIRALY, Z., KLEMENT, A., SOLIMOSY, F. & VOROS, J. **Methods in Plant Pathology**. Budapest: Akademiai Kiadó, 1970. 509p.
- KNOW-CHUNG, K. J. & BENNETT, J. E. **Medical Mycology**. Philadelphia: Lea e Figiber, 1992. 866p.
- LACERDA, L.G. **Uso de técnicas termoanalíticas na caracterização da hidrólise enzimática parcial de amidos de matérias-primas tropicais**. Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2006. 80p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2006.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p.426-428, 1959.
- MITCHELL, T.G.; PERFECT, J.R. Cryptococcosis in the era of AIDS – 100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.8, n.4, p.515-48, 1995.
- MITIDIERI, S., MARTINELLI, A. H. S., SCHRANK, A., VAINSTEIN, M. H. Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*: a comparative study with commercial detergent formulations. **Bioresource Technology**, v.97, n.10, p.1217-1224, 2006.
- NAGODAWITHANA, T. & REED, G. **Enzymes in Food Processing**. 3.ed. New York: Academic Press Inc., 1993, 480p.
- OLIVEIRA, A. N., OLIVEIRA, L. A., ANDRADE, J. S., CHAGAS-JÚNIOR, A. F. Produção de amilase por rizóbios, usando farinha de pupunha como substrato. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.27, n.1, p.61-66, 2007.
- PANDEY, A.; WEBB, C.; SOCCOL, C. R.; LARROCHE, C. **Enzyme Technology**. 1ª ed. New Delhi: Asiatech Publishers, Inc, 2005. 760p.
- PAPPALARDO, M. C. S. M. & MELHEM, M. S. C. Cryptococcosis: a review of the Brazilian experience for the disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.45, n.6, p.299-305, 2003.
- RAIMBAULT, M.; ALAZARD, D. Culture Method to Study Fungal Growth in Solid State Fermentation. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v.9, n.3, p.199-209, 1980.
- RAMESH, B.; REDDY, P. R. M, SEENAYYA, G.; REDDY, G. Effect of various flours on the production of thermostable β -amylase and pullulanase by *Clostridium thermosulfurogenes* SV2. **Bioresour. Technol.**, v.76, n.2, p.169-171, 2001.
- ROSTAGNO, H.S., ALBINO, L.F.T, DONZELE, J.L., et al 2005. Composição de alimentos e exigências nutricionais. Tabelas brasileiras para aves e suínos; 2. ed. Editora UFV, Viçosa, 2005. 186p.
- SAKANO, Y., HIRAIWA, S., FUKUSHIMA, J. & KOBAYASHI, T. Enzymatic properties and action patterns of *Thermoactinomyces vulgaris* α -amylase. **Agric. Biol. Chem.**, v.46, n.5, p.1121–1129, 1982.

TESTER, R.F., KARKALAS, J., QI, X. Starch-composition, fine and architecture. **Journal of Cereal Science**, v.39, n.2, p.151-165, 2004.

VAN DER MAAREL, M.J.E.C. et al. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. **Journal of Biotechnology**, v.94, n.2, p.137-155, 2002.

WANDERLEY, K. J., TORRES, F. A. G., MORAES, L. M. P., ULHOA, C. J. Biochemical characterization of alpha-amylase from the yeast *Cryptococcus flavus*. **Fems Microbiology Letters**, v. 231, n.2, p. 165-169, 2004.

CAPÍTULO 2

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA α -AMILASE DO EXTRATO DE *Cryptococcus flavus*

1. INTRODUÇÃO

As amilases estão entre as mais importantes enzimas industriais e são de grande interesse na biotecnologia atual. Embora possam ser derivadas de diversas fontes, as de origem microbiana são geralmente as mais procuradas pelas indústrias (OLIVEIRA et al., 2007).

A produção de α -amilases por leveduras não é fato comum, pois bactérias das espécies de *Bacillus* sp e fungos filamentosos como *Aspergillus* dominam o mercado das amilases. PANDEY et al. (2005) afirmaram que espécies de *Aspergillus* e *Rhizopus* são muito utilizadas e as enzimas produzidas por *Aspergillus* dominam o mercado por serem mais tolerantes a temperaturas elevadas.

A α -Amilase (1,4- α -D-glucano glucanohidrolase, EC 3.2.1.1) são endoenzimas que hidrolisam ligações glicosídicas do tipo α -1,4 do amido de forma aleatória liberando unidades de glicose, maltose, maltotriose e dextrinas de alta massa molar e é capaz de quebrar ligações α -1,6 próximas (PRETORIUS et al., 1991).

WANDERLEY et al., 2004, descobriram que o *Cryptococcus flavus*, uma levedura isolada dos solos do cerrado, produz α -amilase termoestável de baixo K_M , que pode ter aplicações na indústria.

PEREIRA (2002) e WANDERLEY et al. (2004) comprovaram a existência de apenas uma forma de α -amilase produzida e secretada no meio de cultura do *Cryptococcus flavus*.

Quando enzimas exógenas são acrescentadas na dieta de aves, elas devem ser ativadas em condições fisiológicas do trato digestivo com finalidade de realizar suas funções. A atividade enzimática é influenciada pelo pH da digesta (AO, 2005).

A aplicação das enzimas na alimentação de aves, depende de variáveis para que não ocorra a desnaturação da enzima. Dessa forma, é necessário saber a caracterização da enzima, como comportamento mediante diferentes intervalos de pH, temperatura e sua estabilidade

para posterior suplementação na dieta de aves. VANBELLE (1999) cita que no papo o pH é de 5,5 e o tempo da taxa de passagem é de 50 minutos, no proventrículo e moela, o pH é de 2,5 a 3,5 e o tempo de passagem é de 90 minutos, no intestino especificamente no duodeno, jejuno e íleo, o pH varia de 5,0 a 7,5 e o tempo de passagem 75 minutos.

Em vista do potencial de produção da enzima α -amilase pelo *Cryptococcus flavus*, foi feita a caracterização da enzima, usando ração pré-inicial como substrato para sua produção para aplicação na nutrição de frangos de corte.

O objetivo deste trabalho foi testar a enzima sob diferentes condições como, condições simuladas de temperatura de feitura da ração e da temperatura corporal dos animais, condições simuladas de acidez gástrica e verificar sua atividade catalítica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Procedimentos gerais

A caracterização bioquímica da α -amilase de *Cryptococcus flavus* (levedura isolada de solo do cerrado) foi feita no Laboratório de Enzimologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás.

2.2. Manutenção

Para a manutenção do *Cryptococcus flavus*, utilizou-se placas de Petri, contendo o meio com 1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 2% de glicose, tampão fosfato pH 5,5, mantida na temperatura de 28⁰C.

2.3. Produção da enzima

A produção da α -amilase de *Cryptococcus flavus* foi feita em meio líquido, consistindo no pré-inóculo, com colônias inoculadas em 10 mL de meio contendo 0,67% de extrato de levedura e 2% de glicose e tampão fosfato 5,5 que foi incubado sob agitação constante de 180 rpm, a 28⁰C, por 24 horas. Foi transferido um mL do pré-inóculo para frascos Erlenmeyer de 500 mL, contendo 100 mL do meio de indução contendo extrato de levedura (0,34%) e ração pré-inicial (1%), a composição dos ingredientes da ração são

mostrados na Tabela 1. A partir desta fase, produziu-se a enzima em agitador com rotação de 180 rpm e 28^oC, com produção de 48 horas de indução para determinação das características bioquímicas.

Tabela 1. Composição percentual e nutricional da ração pré-inicial (1-7 dias), na matéria natural.

Ingredientes (kg)	Quantidade
Milho	58,954
Farelo de soja	34,877
Óleo vegetal	1,690
Fosfato bicálcico	1,905
Calcário	0,924
Sal	0,447
L-Lisina.HCl (%)	0,353
DL-Metionina99(%)	0,351
Premix mineral/vitamínico ¹	0,500
Composição Química	
Energia metabolizável (kcal/kg)	2.950
Proteína (%)	22,000
Triptofano (%)	0,293
Lisina (%)	1,466
Metionina + cistina (%)	1,041
Metionina (%)	0,684
Treonina (%)	0,850
Sódio (%)	0,223
Cálcio (%)	0,939
Fósforo disponível (%)	0,470

¹Suplemento mineral e vitamínico. Micromim Aves (suplemento mineral em mg): Manganês 150.000, Zinco 100.000, Ferro 100.000, Cobre 16.000, Cloreto de Colina 60.000 e Iodo 1.500. Premix Inicial (Suplemento vitamínico): Vitamina A 8.000.000 UI, Vitamina D₃ 2.000.000 UI, Vitamina E 15.000 UI, Vitamina K 1.800mg, Vitamina B₁ 1.800 mg, Vitamina B₂ 6.000 mg, Vitamina B₆ 2.800 mg, Vitamina B₁₂ 12.000 mg, Niacina 40.000 mg, Ácido Fólico 1.000 mg, Ácido Pantotênico 15.000 mg, Biotina 60 mg, Selênio 300 mg, Antioxidante 30 g.

2.4. Determinação da atividade amilolítica

O ensaio para medida da atividade amilolítica dextrinizante consiste de 80 µL de tampão acetato de sódio (50 mmol/L, pH 5,5) foram adicionados 20 µL de amostra enzimática e 100 µL de solução de amido (1%). A mistura foi incubada a 50^oC por 30 minutos e a reação interrompida com adição de 200 µL de ácido acético (1,0 mol/L) e 200 µL da solução iodo/iodeto (1% de iodo em etanol absoluto, 10% iodeto de potássio e água destilada na proporção de 1v:1v:3v). O volume foi completado para 10 mL com água destilada, homogeneizado e a absorbância determinada a 660nm (FUWA, 1954). A quantidade de

amido consumido é calculada de acordo com a curva padrão construída com quantidades crescentes de amido solúvel (0-0,5 mg/mL). Uma unidade (U) de atividade amilolítica dextrinizante foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 0,1 mg de amido por minuto de reação.

2.5. Determinação do pH ótimo

O efeito do pH na atividade da α -amilase de *Cryptococcus flavus* foi determinado realizando o ensaio de FUWA (1954), denominado de atividade dextrinizante, baseado na variação da intensidade da cor do complexo iodo-amido. Pelas variações de pH apresentadas no trato gastrintestinal das aves, faz-se necessário investigar a atividade da enzima nos diferentes intervalos de pH, mostrando, portanto, a ação da enzima na simulação das diferentes concentrações hidrogeniônicas (2,0 a 9,0).

Os tampões utilizados e seus respectivos valores de pH estão dispostos na Tabela 2. A força iônica de todos os tampões foi ajustada com NaCl.

Tabela 2. Tampões utilizados na determinação do pH ótimo

Tampão (100 mM)	pH
Glicina-HCl	2,0; 2,5 e 3,0
Acetato	3,5; 4,0; 4,5; 5,0 e 5,5
Fosfato	6,0; 6,5 e 7,0
Tris-HCl	7,5; 8,0; 8,5 e 9,0

Um volume de 100 μ L da enzima foi pré-incubado na temperatura de 50, 40 e 37⁰C, no intervalo de pH 2,0 a 9,0, simulando o trato gastrintestinal. Alíquotas foram retiradas e analisadas para a atividade amilolítica. As temperaturas usadas equivalem a temperatura ótima 50⁰C, temperatura 40⁰C (temperatura interna da ave no período pré-inicial, de 1 a 7 dias de idade) e de 37⁰C (temperatura interna da ave no período inicial de 8 a 21 dias de idade) em função do pH.

2.6. Determinação da temperatura ótima

A temperatura ótima foi determinada incubando-se 20 μ L da enzima com 80 μ L de tampão acetato de sódio (50mmol/L, pH 5,5) e 100 μ L de solução de amido (1%). A atividade

amilolítica foi realizada incubando as amostras nas temperaturas de 30, 37, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 e 75°C.

2.7. Avaliação da estabilidade da enzima nos valores de pH 3,0; 6,0 e 8,0

Um volume de 200 µL da enzima foi incubado com 800 µL de tampão no pH ótimo de 8,0, de 3,0 e de 6,0 nos tempos de 0, 30, 60, 90 e 120 minutos. Alíquotas foram retiradas e analisadas quanto à atividade amilolítica pelo método de FUWA (1954) conforme descrito.

2.8. Determinação da termoestabilidade

Um volume de 500 µL da enzima foi incubado na temperatura ótima nos tempos de 0, 30, 60, 90 e 120 minutos. Alíquotas foram retiradas e analisadas quanto à atividade amilolítica conforme método de FUWA (1954). Estes tempos foram escolhidos devido à taxa de passagem do alimento no trato gastrointestinal da ave.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A α -amilase, assim como as outras enzimas utilizadas na alimentação de não ruminantes devem resistir e conservar atividade considerável depois dos processos de fabricação e digestão. Os fatores que podem influenciar sua estabilidade, entre outros, são: a origem (microrganismo), o tipo de atividade, a composição da dieta, a condição de feitura da ração, o armazenamento, as condições durante o processo digestivo e a ação de enzimas endógenas (FRANCESCH, 1996). A estrutura molecular da enzima é bastante frágil e, conseqüentemente, pode ser desnaturada por calor, álcalis, metais pesados e outros agentes oxidantes (BORGES, 1997; CLASSEM, 1996).

A α -amilase foi caracterizada bioquimicamente e os resultados da sua estabilidade são apresentados abaixo e interpretados de acordo com o processo digestivo e a temperatura corporal das aves, correlacionando, assim, com sua fisiologia.

3.1. Determinação do pH ótimo

Na Figura 1 verificou-se a influência do pH na atividade da α -amilase, medindo a atividade amilolítica relativa em valores de pH de 2,0 a 9,0 conforme descrito.

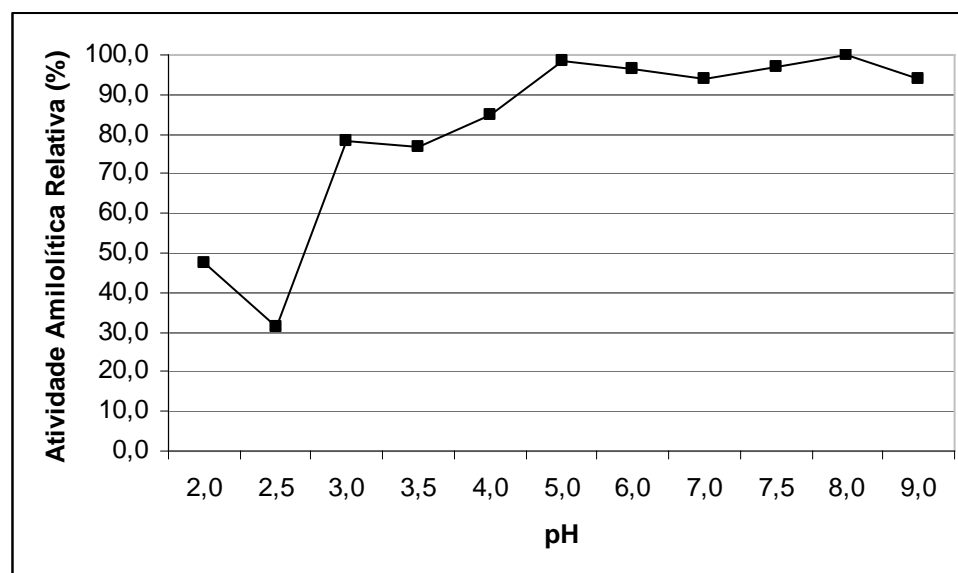


Figura 1: Efeito do pH na atividade da α -amilase produzida pelo *Cryptococcus flavus*.

De acordo com os dados podemos observar que a enzima apresenta maior atividade na faixa de pH entre 3,0 a 9,0, tendo uma faixa de pH ótimo de 5,0 a 8,0, similar aos na faixa de pH de 4,0 a 11,0 (FOGARTY & KELLY, 1979; VIHINEN & MANTSALA, 1989; HAMILTON et al., 1999; SAITO et al., 1973; KHOO et al., 1994). A maioria das rações apresentam pH por volta de 6,0 a 6,4, com isso, a adição da enzima α -amilase na ração, não tem nenhum prejuízo, pois ela será estável.

Este resultado está de acordo com o obtido para avaliação da α -amilase do microrganismo *Aspergillus oryzae* que apresenta pH ótimo de 5,0 e tem ampla faixa de estabilidade, na faixa de 6,0 a 8,0 (PEREVOZCHENKO & TSYPEROVICH, 1972).

WANDERLEY et al. (2004) trabalharam com *Cryptococcus flavus* e encontraram valor de pH ótimo de 5,5. IEFUJI et al (1996) encontraram pH ótimo de 6,0 para amilase de *Cryptococcus* sp.

Estes resultados são importantes, visto que, para aves implica, numa boa atividade nos pHs de 3,0 até 9,0, não havendo desnaturação da enzima, quando passar pelo estômago e moela e boa atividade no conteúdo do intestino, variando de 5,0 a 7,5. A atividade da enzima misturada a ração aumenta a possibilidade da baixa desnaturação.

A estabilidade da α -amilase a 40^oC que equivale a temperatura interna de aves no período de 1 a 7 dias de idade e a 37^oC que corresponde a temperatura interna da ave no período de 8 a 21 dias de idade no intervalo de pH de 2,0 a 9,0 é mostrado nas Figuras 2 e 3, respectivamente. Esta simulação, com os resultados apresentados, é importante para demonstrar a ação da α -amilase no trato gastrointestinal das aves.

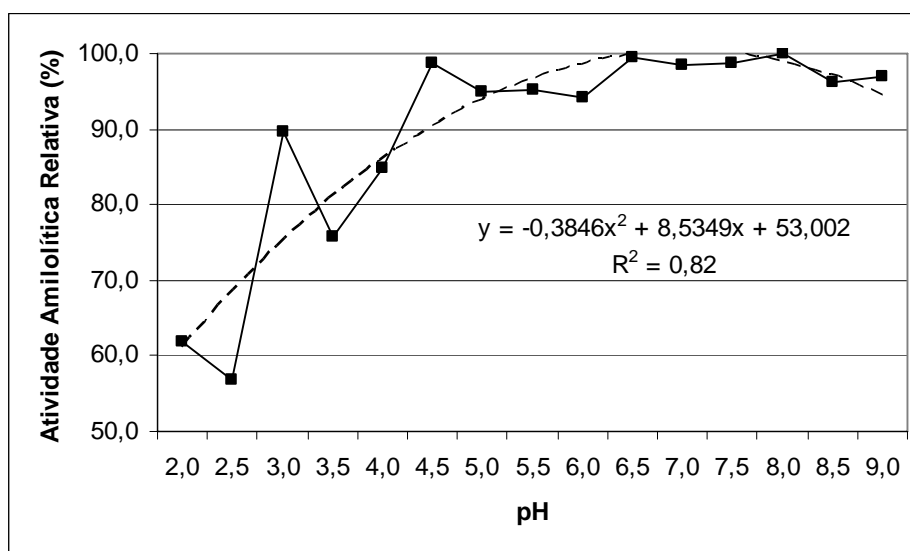


Figura 2. Efeito do pH na atividade da α -amilase de *Cryptococcus flavus* a 40^oC.

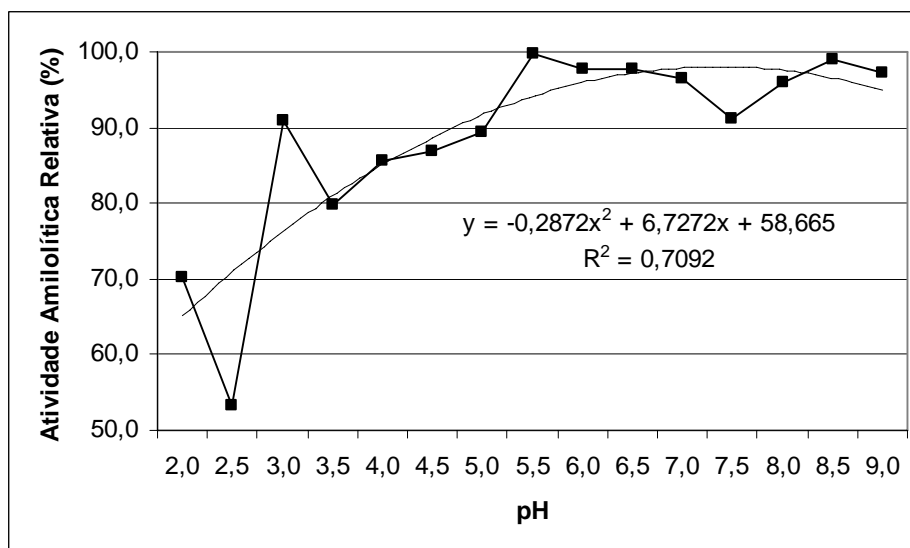


Figura 3. Efeito do pH na atividade da α -amilase de *Cryptococcus flavus* a 37^oC.

Foi observado que há menor variação da atividade da enzima amilolítica a 40^oC (82%) do que 37^oC (70,9%), talvez porque a temperatura ótima da enzima (50^oC) se aproxima mais de 40^oC do que de 37^oC. A atividade é extremamente sensível à influência da temperatura

com diferentes pHs e, assim, podendo influenciar os dados obtidos para atividade relativa. Essa menor variação pode influenciar positivamente na ação da enzima nos primeiros dias de vida das aves (1 a 7 dias de idade).

3.2. Determinação da temperatura ótima

Obtido o valor do pH ótimo, o efeito da temperatura na atividade da α -amilase foi analisado, em temperaturas variando de 30 a 75°C, conforme descrito. A influência da temperatura na ação da enzima é mostrada na Figura 4.

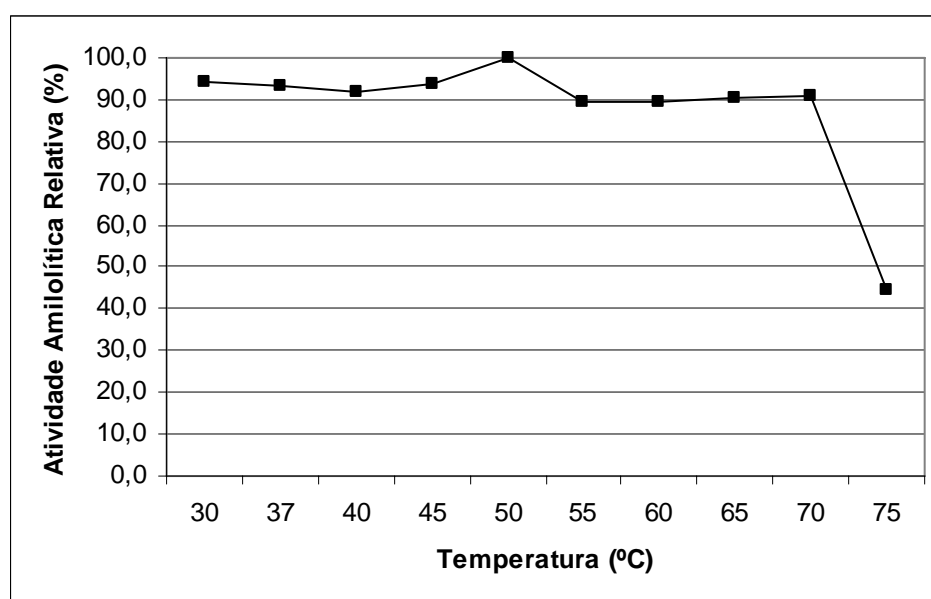


Figura 4. Efeito da temperatura na atividade da α -amilase, produzida pelo *Cryptococcus flavus*.

Pode-se observar que a enzima apresenta atividade alta na faixa de temperatura entre 30 a 70°C, tendo o valor máximo de atividade enzimática na temperatura de 50°C. Esse resultado é bom para aplicabilidade nas rações.

Este resultado concorda com o obtido para a α -amilase purificada por WANDERLEY et al. (2004) do microrganismo *Cryptococcus flavus* que também encontraram temperatura ótima de 50°C. IEFUJI et al. (1996) encontraram dois valores de temperatura ótima, 50 e 60°C, e estabilidade até 90°C para o *Cryptococcus* sp.

Em aves no período pré-inicial (1 a 7 dias) que possuem temperatura interna de aproximadamente 40°C e para aves no período inicial (8 a 14 dias), que possuem temperatura

interna de aproximadamente 37⁰C, não há perigo de desnaturar a enzima, uma vez que tem ampla atividade de 30⁰C a 70⁰C.

3.3. Avaliação da Estabilidade da Enzima nos valores de pH 3,0; 6,0 e 8,0

Para analisar o efeito do valor de pH na estabilidade da α -amilase, a fração contendo a α -amilase foi pré-incubada em tampões no pH de 3,0, no pH de 6,0 e no pH ótimo de 8,0 por diferentes tempos (0, 30, 60, 90 e 120 minutos) conforme metodologia descrita. Os resultados obtidos estão na Figura 5.

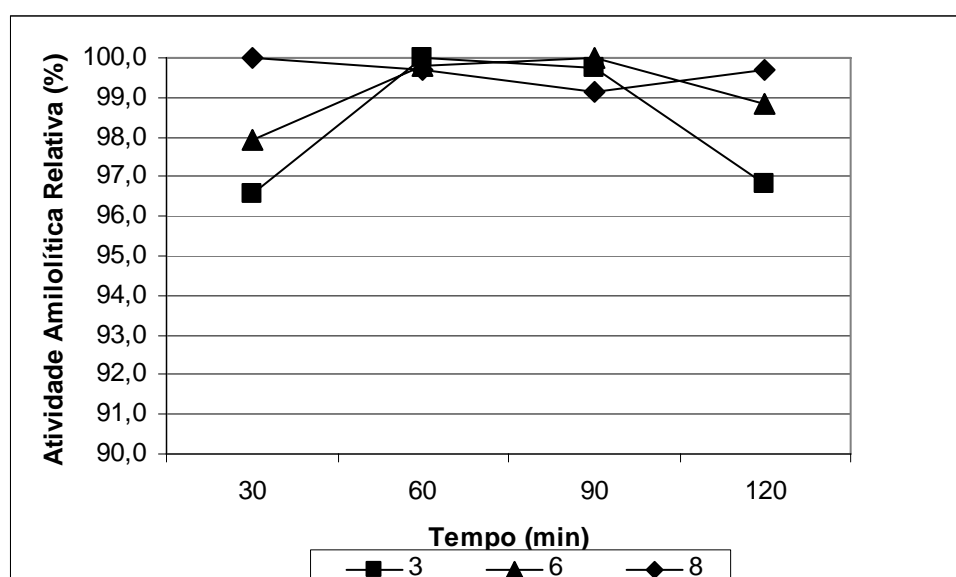


Figura 5. Estabilidade da α -amilase, produzida pelo *Cryptococcus flavus* incubada em tampões com diferentes valores de pH por determinados intervalos de tempo.

Observa-se que a enzima é muito estável nas faixas de pH analisadas, pois mesmo após incubação por 120 minutos, manteve mais de 90% da atividade inicial. Isso indica para análise do tempo que a enzima e alimento vão passar pelos diversos compartimentos intestinais e mantendo-se resistentes ao tempo para não se desnaturarem.

3.4. Determinação da termoestabilidade

A estabilidade da α -amilase nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 minutos na temperatura ótima consta da Figura 6. O processo digestivo das aves demora por volta de 1 hora e 30 minutos até duas horas.

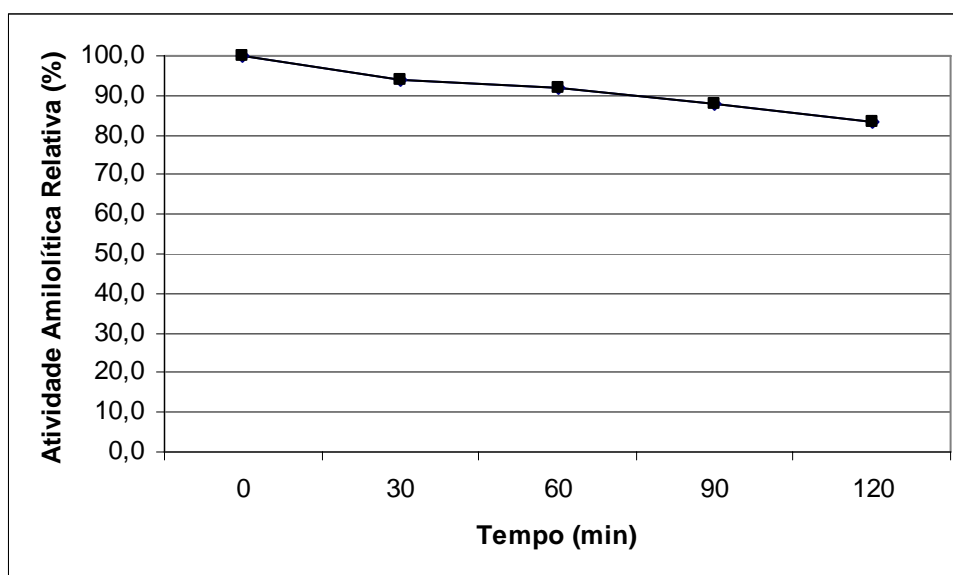


Figura 6. Termoestabilidade da α -amilase produzida pelo *Cryptococcus flavus* e incubada na temperatura ótima por 120 minutos.

WANDERLEY et al. (2004), que trabalharam com *Cryptococcus flavus* em seu experimento com termoestabilidade, também verificaram que na temperatura ótima de 50°C, a atividade relativa durante 60 minutos foi de 90%. Nos dados encontrados neste trabalho, a termoestabilidade desta enzima no período de até 120 minutos é alta, pois os dados analisados mostram a permanência desta enzima com mais de 80% de sua atividade relativa. Como o tempo de digestão dos alimentos em aves, demora por volta de 120 minutos, a enzima suportaria e chegaria ao intestino com 83% de sua atividade.

4. CONCLUSÃO

A α -amilase produzida pelo *Cryptococcus flavus* tem características adequadas para aplicação em dietas de aves, pois apresenta boa estabilidade nos pHs fisiológicos e temperatura, que se assemelha a temperatura corporal das aves.

5. REFERÊNCIAS

AO, T. **Exogenous enzymes and organic acids in the nutrition of broiler chicks: effects on growth performance and in vitro and in vivo digestion**. Kentucky: University of Kentucky, 2005. 144p. Tese (Doctor of Philosophy in the College of Agricultural), University of Kentucky, 2005.

BORGES, F. M. O. Utilização de enzimas em dietas avícolas. **Caderno Técnico da Escola de Veterinária da UFMG**, n.20, p.5-30, 1997.

CLASSEN, L. H. Enzymes in action. **Feed Mix**, v.4, n.2, p.22-28, 1996.

FOGARTY, W. M., KELLY, C. T. Developments in microbial extracellular enzymes. In: Wiseman A, editor. **Topics in enzyme and fermentation biotechnology**, v.3, p.45-108, 1979.

FRANCESCH, M. Bases de la utilización de complejos enzimáticos en avicultura. In: CURSO DE ESPECIALIZACION AVANCES EN NUTRICION ALIMENTACION ANIMAL, 12., 1996, Madrid. **Anais....** Madrid: FEDNA, 1996. p.118-131.

FUWA, H. J. A new method for microdetermination of amylase activity by use the amylose as the substrate. **Journal Biochemical**, v.41, p.583-603, 1954.

GAUTHIER, R. La Salud Intestinal: Clave de la productividad (El caso de los Ácidos Orgânicos). In: PRECONGRESO CIENTIFICO AVICOLA IASA, XXVII CONVENCION ANECA-WPDC. Puerto Vallarta, Jal. México, 2002. **Anais eletrônicos...** [on line] Disponível em: <http://www.etsia.upm.es/fedna/capitulos/00CAP8.pdf>. Acesso em: 16/05/2005.

HAMILTON L.M, KELLY, C.T, FOGARTY, W.M. Purification and properties of the raw starch degrading α -amylase of *Bacillus* sp. IMD434. **Biotechol. Lett.**, v.21, p.111-5, 1999.

IEFUJI, H., CHINO, M., KATO, M. AND IIMURA, Y. Raw-starch digesting and thermostable α -amylase from the yeast *Cryptococcus* sp. S-2: purification, characterization, cloning and sequencing. **Biochem. J.**, v.318, p.989-996, 1996.

KHOO S. L., AMIRUL A. A., KAMARUZAMAN M., NAZALAN N., AZIZAN M.N. Purification and characterization of α -amylase from *Aspergillus flavus*. **Folia Microbiol**, v.39, p.392- 398, 1994.

OLIVEIRA A. N., OLIVEIRA, L. A., ANDRADE, J. S., CHAGAS-JÚNIOR A. F. Produção de amilase por rizóbios, usando farinha de pupunha como substrato. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.27, n.1, p.61-66 , 2007.

PANDEY, A.; WEBB, C.; SOCCOL, C.R.; LARROCHE, C. **Enzyme Technology**. 1ª ed. New Delhi: Asiatech Publishers, Inc, 2005. 760p.

PEREIRA, S.E. Imobilização e caracterização da α -amilase produzida por *Cryptococcus flavus*. Goiânia: Universidade Federal de Goiás. 58p .Dissertação (Mestrado Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Goiás, 2002.

PEREVOZCHENKO II, TSYPEROVICH AS. Comparative investigation of the properties of α -amylases of mold fungi of the genus *Aspergillus*. **Appl. Biochem. Microbiol** , v.8, p.7, 1972.

PRETORIUS, I. S., LAMBRECHTS, M. G., AND MARMUR, J. The glucoamylase multigene family in *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus*: an overview. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.**, v.26, n.1, p.53-76, 1991.

SAITO, N. Thermophilic extracellular α -amylase from *Bacillus licheniformis*. **Arch Biochem. Biophys.** v.155, p.290- 298, 1973.

VANBELLE, M. The use of feed additives in the E.U. Regulations, problems and future. Eastern Nutrition Conference, Animal Nutrition Association of Canada, Niagara Falls, Ontario, **Canadian Poultry**, 1999.

VIHINEN M, MANTSALA P. Microbial amyolytic enzymes. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.**, v.24, n.4, p.329- 418, 1989.

WANDERLEY, K. J., TORRES, F. A. G., MORAES, L. M. P., ULHOA, C. J. Biochemical characterization of alpha-amylase from the yeast *Cryptococcus flavus*. **Fems Microbiology Letters**, v. 231, n.2, p. 165-169, 2004.

CAPÍTULO 3

PERFIL DAS RAÇÕES *IN VITRO* COM ACRÉSCIMO DE COMPLEXO MULTIENZIMÁTICO COMERCIAL E α -AMILASE DE *Cryptococcus flavus*

1. INTRODUÇÃO

Enzimas são proteínas sensíveis a várias condições físico-químicas. A capacidade da enzima em ligar ao substrato e permanecer ativa por longos períodos é importante para produtos que possuem finalidade comercial para aplicação na nutrição animal. Allzyme Vegpro é um complexo enzimático que possui grande espectro de ação sobre carboidratos e proteínas presentes em produtos de origem vegetal, tais como farelo de soja e milho e a α -amilase de *Cryptococcus flavus* possui ação sobre a degradação do amido.

Tanto o milho quanto o farelo de soja são amplamente usados como ingredientes de ração para monogástricos. Entretanto, estes produtos são caracterizados por possuir fatores antinutricionais que colaboram para diminuir a digestibilidade e o desempenho e, conseqüentemente, a produtividade. Como as enzimas são específicas para cada substrato, a seleção da enzima certa depende dos alimentos incluídos na dieta e disponíveis no mercado.

Uma alternativa para contornar estes problemas é a utilização de produtos a base de enzimas, como o complexo enzimático e a enzima α -amilase produzida por *Cryptococcus flavus*. Para sua aplicação eficiente, é necessário que as enzimas possuam alta estabilidade após a mistura com seus substratos presentes no milho, farelo de soja ou rações. Entretanto, dados da estabilidade das enzimas presentes no complexo comercial e da α -amilase de *Cryptococcus flavus*, em períodos longos de estocagem, não são ainda conhecidos na literatura.

Neste caso a adição da α -amilase em rações de frangos de corte ajuda na digestão do amido resistente da dieta e potencializa o processo digestivo, fazendo com que melhorem os índices produtivos.

No entanto para funcionarem corretamente, as enzimas precisam de certas condições específicas. São ativas numa faixa estreita de pH e são sensíveis a mudanças de acidez ou alcalinidade em seu meio ambiente. Comparadas às reações químicas, agem muitas vezes sob condições relativamente brandas em termos de temperatura (temperatura ambiente ou temperatura do corpo, por exemplo) e de acidez (valores de pH próximo ao ponto neutro). São

altamente específicas, interagindo com um ou alguns substratos específicos e catalisando somente um tipo de reação (CHAMPE & HARVEY, 2000).

As enzimas têm pH ótimo ou região de pH ótimo no qual sua atividade é máxima; em valores de pH maiores ou menores sua atividade diminui. Isto não é surpreendente porque as cadeias laterais de alguns aminoácidos agem como ácidos ou bases fracos e realizam funções críticas no sítio ativo da enzima. A mudança no estado de ionização (titulação) dos grupos no sítio ativo é uma razão comum para a variação na atividade, porém ele não é o único (NELSON & COX, 2003).

A quantificação de açúcares redutores é bom indicativo para analisar a liberação de carboidratos que serão prontamente usados para o metabolismo energético do animal. As proteínas solúveis indicam quanto está sendo solubilizado para aproveitamento animal e a estabilidade e ação da enzima α -amilase foi analisada para saber o tempo de ação e se permanece ativa para ação no trato gastrintestinal das aves.

Neste trabalho avaliou-se a estabilidade enzimática no milho, farelo de soja e rações pré-inicial e inicial para frangos de corte durante estocagem, assim como a quantidade de enzima necessária e o melhor pH de atuação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Perfil da α -amilase, açúcares redutores e proteína do complexo enzimático comercial no milho moído, farelo de soja e rações para frangos de corte determinado *in vitro*.

O experimento foi realizado na Universidade Federal de Goiás. O milho moído e o farelo de soja foram obtidos na fábrica de ração do Departamento de Produção Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás. As rações foram elaboradas, conforme ROSTAGNO et al. (2005) e a composição das rações pré-inicial e inicial para frangos de corte é apresentada na Tabela 1.

O experimento foi conduzido no Laboratório de Enzimologia do Departamento de Ciências Biológicas da UFG. O delineamento inteiramente casualizado foi adotado com oito tratamentos em esquema fatorial 4 x 2 (ingrediente ou ração x presença do complexo enzimático) e três repetições por tratamento.

Tabela 1. Composição percentual e nutricional das rações experimentais pré-inicial (1 a 7 dias) e inicial (8 a 21 dias), na matéria natural

Ingredientes (kg)	Ração pré-inicial	Ração inicial
Milho	58,954	60,210
Farelo de soja	34,877	33,954
Óleo vegetal	1,690	1,766
Fosfato bicálcico	1,905	1,826
Calcário	0,924	0,890
Sal	0,447	0,429
L-Lisina.HCl (%)	0,353	0,191
DL-Metionina ⁹⁹ (%)	0,351	0,234
Premix mineral/vitamínico ¹	0,500	0,500
Composição Química		
Energia metabolizável (kcal/kg)	2.950	3.000
Proteína (%)	22,000	20,790
Triptofano (%)	0,293	0,276
Lisina (%)	1,466	1,263
Metionina + cistina (%)	1,041	0,897
Metionina (%)	0,684	0,554
Treonina (%)	0,850	0,809
Sódio (%)	0,223	0,214
Cálcio (%)	0,939	0,884
Fósforo disponível (%)	0,470	0,442

¹Suplemento mineral e vitamínico. Micromim Aves (suplemento mineral em mg): Manganês 150.000, Zinco 100.000, Ferro 100.000, Cobre 16.000, Cloreto de Colina 60.000 e Iodo 1.500. Premix Inicial (Suplemento vitamínico): Vitamina A 8.000.000 UI, Vitamina D₃ 2.000.000 UI, Vitamina E 15.000 UI, Vitamina K 1.800mg, Vitamina B₁ 1.800 mg, Vitamina B₂ 6.000 mg, Vitamina B₆ 2.800 mg, Vitamina B₁₂ 12.000 mg, Niacina 40.000 mg, Ácido Fólico 1.000 mg, Ácido Pantotênico 15.000 mg, Biotina 60 mg, Selênio 300 mg, Antioxidante 30 g.

Para compor as parcelas, alíquotas de 30 g de rações pré-inicial e inicial, do milho, do farelo de soja foram acondicionadas em placas de Petri de acordo com o tratamento. O acréscimo do complexo enzimático comercial ocorreu na proporção de 0,03 g do pó de acordo com o tratamento. Os tratamentos aplicados foram os seguintes: milho moído sem enzima, milho moído com complexo enzimático comercial, farelo de soja, farelo de soja com complexo enzimático comercial, ração pré-inicial, ração pré-inicial com complexo multienzimático comercial, ração inicial, ração inicial com complexo enzimático comercial.

O período total de avaliação das amostras propostas foi de 60 dias. A cada cinco dias, foram realizadas análises de açúcar redutor, segundo MILLER (1956), dosagem de proteína, conforme BRADFORD (1976), e atividade de α -amilase como descrito por FUWA (1954).

Para análise destes parâmetros, pesou-se 0,15 g de cada ração, do milho e do farelo soja e acrescentou-se 1 mL de tampão acetato, pH 5,5, 50 mM, que foi centrifugado a 10.000

rpm por 10 minutos a temperatura de 4⁰C. Determinou-se açúcar redutor pelo método do DNS, utilizando-se 100 µL da amostra e 900 µL de DNS, este conteúdo foi fervido a 100⁰C por 5 minutos e feita a leitura em espectrofotômetro a 550 nm. A dosagem da proteína foi feita pelo método de BRADFORD (1976). Para amilase, utilizou-se 40 µL de tampão acetato pH 5,5, 60 µL da amostra e 100 µL de amido a 1 %, este conteúdo foi incubado a 50⁰C por 30 minutos, posteriormente foi adicionado 200µL de ácido acético (1 molar), 200 µL de solução iodo/iodeto (1% de iodo em etanol absoluto, 10 g de iodeto de potássio e água destilada na proporção 1v:1v:3v, e completado o volume com 9,4mL de água destilada (volume final 500 mL). A solução foi homogeneizada e foi feita a leitura em espectrofotômetro a 660 nm.

2.2. Perfil da α -amilase em rações de frangos de corte em função do tempo

O experimento foi realizado na Universidade Federal de Goiás. O milho moído e o farelo de soja foram obtidos na fábrica de ração do Departamento de Produção Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás. As rações foram elaboradas, conforme ROSTAGNO et al. (2000) e a composição das rações pré-inicial e inicial para frangos de corte é apresentada na Tabela 1.

O experimento foi conduzido no Laboratório de Enzimologia do Departamento de Ciências Biológicas da UFG. O delineamento inteiramente casualizado foi adotado com oito tratamentos em esquema fatorial 4 x 2 (ingrediente ou ração x presença α -amilase de *Cryptococcus flavus*) e três repetições por tratamento.

Para compor as parcelas, alíquotas de 30 g de rações, do milho e do farelo de soja foram acondicionadas em placas de Petri de acordo com o tratamento. Acrescentou-se 2 mL da enzima α -amilase a base de ração e extrato de levedura com atividade de 9,87 U/mL. Os tratamentos aplicados foram os seguintes: milho moído sem enzima, milho moído com α -amilase, farelo de soja, farelo de soja com α -amilase, ração pré-inicial, ração pré-inicial com α -amilase, ração inicial, ração inicial com α -amilase.

O período total de avaliação das amostras propostas foi de 30 dias. A cada cinco dias, foram realizadas análises de açúcar redutor, segundo MILLER (1956) e atividade de α -amilase como descrito por FUWA (1954).

Para análise destes parâmetros, pesou-se 0,15 g da ração, do milho e do farelo soja e acrescentou-se 1 mL de tampão acetato, pH 5,5, 50 mM, que foi centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos a temperatura de 4⁰C. Determinou-se açúcar redutor pelo método do DNS,

utilizando-se 100 µL da amostra e 900 µL de DNS, este conteúdo foi fervido a 100⁰C por 5 minutos, foi esfriado e lido em espectrofotômetro a 550 nm. Para amilase, utilizou-se 40 µL de tampão acetato pH 5,5, 60 µL da amostra e 100 µL de amido a 1%, este conteúdo foi incubado a 50⁰C por 30 minutos, posteriormente foi adicionado 200 µL de ácido acético (1 molar), 200 µL de solução iodo/iodeto (1% de iodo em etanol absoluto, 10 g de iodeto de potássio e água destilada na proporção 1v:1v:3v, e completado o volume com 9,4 mL de água destilada (volume final 500 mL). A solução foi homogeneizada e foi feita a leitura em espectrofotômetro a 660 nm.

2.3. Perfil da α-amilase em rações de frangos de corte em função do pH ácido e básico e da quantidade de enzima

O experimento foi realizado na Universidade Federal de Goiás. As análises foram feitas no Laboratório de Enzimologia do Departamento de Ciências Biológicas e as rações foram feitas no Departamento de Produção Animal da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Goiás, usando recomendações de ROSTAGNO et al. (2005). A Tabela 1 são rações a base de milho e farelo de soja (pré-inicial e inicial) e as Tabelas 2 e 3 são as rações a base de sorgo (pré-inicial e inicial) para frangos de corte.

Pesou-se 30g das rações pré-iniciais e Iniciais para frangos de corte, formuladas no programa Avemix da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás (EV/UFG), em placas de Petri corretamente identificadas e acrescentou-se a dosagem de 1,0, 2,0 e 3,0 mL de enzima α-amilase de *Cryptococcus flavus* com atividades de 9,0 U/mL e ausência de enzima no controle. Foram feitas dosagens de açúcar redutor, segundo MILLER (1956), em que se utilizou 100 µL da amostra e 1000 µL de ADNS, este conteúdo foi fervido a 100⁰C por 5 minutos, foi esfriado e lido em espectrofotômetro a 550 nm.

Para análise do açúcar redutor, colocou-se a ração no liquidificador e acrescentou-se 100 mL de H₂O destilada. Deste material tirou-se uma alíquota e simulou-se os pHs do estômago e do intestino, com HCl (1 mol/L) e NaOH (1 mol/L), respectivamente, para analisar se houve perda da atividade enzimática no estômago. Após medição do pH normal, acrescentou-se HCl e esperou-se por volta de 1 hora e 30 minutos para depois alcalinizar o meio. Fizeram-se, posteriormente as análises.

O delineamento do experimento consistiu de quatro rações: sorgo pré-inicial, sorgo inicial, pré-inicial e inicial a base de milho e soja, sem enzima e com 1, 2 e 3 ml de enzima, medidas nos valores de pH 2,5, 6,0 e 8,0.

Tabela 2. Composição percentual e nutricional da ração pré-inicial (1 a 7 dias), na matéria natural

Ingredientes (kg)	Quantidade
Sorgo	57,889
Farelo de soja	33,566
Óleo vegetal	3,438
Fosfato bicálcico	1,964
Calcário	0,932
Sal	0,203
L-Lisina.HCl (%)	0,515
L-Treonina (%)	0,338
DL-Metionina 99 (%)	0,321
Premix. mineral/vitamina ¹	0,400
Bicarbonato de sódio	0,203
Composição Química	
Energia metabolizável (kcal/kg)	2.950
Proteína (%)	22,100
Treonina digestível (%)	0,865
Lisina digestível (%)	1,330
Metionina digestível(%)	0,519
Metionina + cistina digestível (%)	0,700
Fósforo disponível (%)	0,470
Cloro (%)	0,225
Sódio (%)	0,223
Cálcio (%)	0,939

¹Suplemento mineral e vitamínico. Micromim Aves (suplemento mineral em mg): Manganês 150.000, Zinco 100.000, Ferro 100.000, Cobre 16.000 e Iodo 1.500. Premix Inicial (Suplemento vitamínico): Vitamina A 8.000.000 UI, Vitamina D₃ 2.000.000 UI, Vitamina E 15.000 UI, Vitamina K 1.800 mg, Vitamina B₁ 1.800 mg, Vitamina B₂ 6.000mg, Vitamina B₆ 2.800 mg, Vitamina B₁₂ 12.000 mg, Niacina 40.000 mg, Ácido Fólico 1.000 mg, Ácido Pantotênico 15.000 mg, Biotina 60 mg, Selênio 300 mg, Antioxidante 30 g.

Tabela 3. Composição percentual e nutricional da ração inicial (8 a 21 dias), na matéria natural

Ingredientes (kg)	Quantidade
Sorgo	63,511
Farelo de soja	32,167
Óleo vegetal	0,000
Fosfato bicálcico	1,802
Calcário	0,928
Sal	0,502
L-Lisina.HCl	0,332
L-Treonina	0,260
DL-Metionina 99	0,263
Premix. mineral/vitamínico ¹	0,500
Inerte	0,200
Composição Química	
Energia metabolizável (kcal/kg)	3.000
Proteína (%)	20,79
Treonina digestível (%)	0,745
Lisina digestível (%)	1,146
Metionina + cistina digestível (%)	0,617
Metionina digestível (%)	0,447
Cálcio (%)	0,884
Sódio (%)	0,214
Fósforo disponível (%)	0,442

¹Suplemento mineral e vitamínico. Micromim Aves (suplemento mineral em mg): Manganês 150.000, Zinco 100.000, Ferro 100.000, Cobre 16.000 e Iodo 1.500. Premix Inicial (Suplemento vitamínico): Vitamina A 8.000.000 UI, Vitamina D₃ 2.000.000 UI, Vitamina E 15.000 UI, Vitamina K 1.800 mg, Vitamina B₁ 1.800 mg, Vitamina B₂ 6.000 mg, Vitamina B₆ 2.800 mg, Vitamina B₁₂ 12.000 mg, Niacina 40.000 mg, Ácido Fólico 1.000 mg, Ácido Pantotênico 15.000 mg, Biotina 60 mg, Selênio 300 mg, Antioxidante 30 g.

2.4. Perfil do açúcar redutor e proteína solúvel das rações experimentais

O experimento foi realizado na Universidade Federal de Goiás. As análises foram feitas no Laboratório de Enzimologia do Departamento de Ciências Biológicas e as rações foram feitas no Departamento de Produção Animal da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Goiás, usando recomendações de ROSTAGNO et al. (2005). A Tabela 1 são rações a base de milho e farelo de soja (pré-inicial e inicial) para frangos de corte.

Para análise destes parâmetros, pesou-se 0,15 g da ração, do milho e do farelo soja e acrescentou-se 1mL de tampão acetato, pH 5,5, 50 mM, que foi centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos a temperatura de 4^oC. Determinou-se açúcar redutor pelo método do ADNS,

utilizando-se 100 µL da amostra e 900 µL de ADNS, este conteúdo foi fervido a 100⁰C por 5 minutos, foi resfriado e feito à leitura em espectrofotômetro a 550nm. A dosagem de proteína solubilizada foi analisada conforme BRADFORD (1976).

Analisaram-se as rações nos períodos coincidentes com o período experimental de aplicação no campo para as aves, no primeiro, com sete, 14 e 21 dias.

2.5. Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi feita utilizando-se o programa SAS (2000) e o teste de Duncan, com 5% de probabilidade, foi adotado para comparar as médias, assumindo-se o esquema fatorial 4 x 2 e a análise realizada como parcelas subdivididas tendo o tempo como subparcela (“split-plot”) para o primeiro e segundo experimentos.

A análise estatística dos dados obtidos no terceiro e quarto experimentos foram feitos usando o SAEG 9.5 (2007). As médias do terceiro experimento foram comparadas com o teste de SNK com 5% de probabilidade e aquelas do quarto experimento foram testadas com o Tukey com 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Perfil da α -amilase, açúcares redutores e proteína do complexo enzimático comercial no milho moído, farelo de soja e rações para frangos de corte determinado *in vitro*

Na dosagem de açúcar redutor, o melhor resultado foi encontrado para o farelo de soja com adição do complexo comercial, seguido do milho moído e das rações pré-inicial e inicial, respectivamente. O pico de liberação do açúcar redutor ocorreu 20 dias após a mistura, apresentando média de 0,389 µmol persistindo até 55 dias, com média inferior a 0,320 µmol. A liberação de açúcar redutor tem efeito direto na melhoria da nutrição de frangos de corte.

A atividade da α -amilase apresentou perfil semelhante ao do açúcar redutor, tendo maior ação no farelo de soja com complexo enzimático e em seqüência no milho, na ração inicial e na pré-inicial. Apesar de se esperar que a ação da α -amilase fosse maior no milho moído devido à alta concentração de amido, pode ter havido interação da α -amilase com as

outras enzimas do complexo potencializando seu efeito. Seu pico de atividade foi de 7,924 U/mL com 15 dias mas, com 60 dias, a sua atividade se manteve satisfatória (6,441 U/mL).

O teor protéico solúvel dosado foi numericamente maior, porém sem diferença estatística significativa, tanto no farelo de soja sem o complexo enzimático quanto naquele contendo complexo comercial. Como esperado, os valores obtidos para o farelo de soja foram estatisticamente superiores aos demais tratamentos. Isso se justifica pelo fato de que o farelo de soja se constitui no principal concentrado protéico das rações, e os níveis são superiores ao milho e rações testadas. Os resultados das médias gerais são apresentados na Tabela 4.

Neste estudo comprova-se a ação do complexo comercial no farelo de soja como disponibilizador da proteína solúvel.

Resultado semelhante foi encontrado por MURAKAMI & GARCIA (2005), que empregaram diferentes níveis de valorização de sete e nove por cento do farelo de soja em rações para frangos de corte. Houve comprovação que Allzyme Vegpro é efetivo em rações baseadas em milho e farelo de soja na proporção de energia metabolizável, proteína e aminoácidos em 7:7:5, em porcentagem.

Para GRACIA et al. (2003), a suplementação de α -amilase numa dieta para frangos de corte contendo milho melhorou a digestibilidade de nutrientes e desempenho de aves de corte. Num estudo recente, ONDERCI et al. (2006), concluíram que a adição de cultura de *Escherichia coli* que produzia α -amilase do *Bacillus stearothermophilus* proporcionou melhora na digestibilidade de nutrientes e no desempenho de frangos que se alimentaram de dieta baseada em milho. Estes dados são importantes para demonstrar que a enzima α -amilase contribui dentro do complexo multienzimático Allzyme Vegpro, tanto para dietas a base de milho como citados pelos autores acima, quanto para este estudo feito com o farelo de soja.

Tabela 4. Teores de açúcar redutor (μmol) e de proteína (mg) e atividade da α -amilase em (U/mL)

Tratamentos Enzima	Açúcar Redutor (μmol)		Proteína (mg)		α -Amilase (U/mL)	
	Ausência	Presença	Ausência	Presença	Ausência	Presença
MM	0,205cd	0,243c	12,25b	12,33b	6,62c	7,97b
FS	0,340b	0,481a	30,09a	29,15a	8,82a	9,09a
RPI	0,167d	0,191d	12,68b	12,82b	2,48e	5,78d
RI	0,159d	0,178d	12,27b	11,50b	2,02e	5,82d
Dias	Açúcar Redutor (μmol)		Proteína (mg)		α -Amilase (U/mL)	
1	0,216de		15,83cde		6,32b	
5	0,205e		20,00b		5,15c	
10	0,245cde		17,15c		5,26c	
15	0,225cde		24,50a		7,92a	
20	0,389a		19,67b		5,92b	
25	0,320b		15,67cde		6,25b	
30	0,283bc		16,16cd		6,50b	
35	0,199e		14,93de		4,63c	
40	0,131f		14,06e		6,09b	
45	0,183ef		15,10de		6,08b	
50	0,273bc		14,16e		6,33b	
55	0,320b		14,68de		6,10b	
60	0,196e		14,33de		6,44b	
CV(%)	23,25		17,29		18,51	

^{abcdef}Médias com a mesma letra, em cada coluna, não diferem entre si com 5% de probabilidade pelo teste de Duncan.

*(MM) milho moído, (FS) farelo de soja, (RPI) ração pré-inicial, (RI) ração inicial.

3.2. Perfil da α -amilase em rações de frangos de corte em função do tempo

A partir da análise estatística apresentada com os resultados obtidos para a ação da amilase de *Cryptococcus flavus* misturada na ração com 30 dias, obtiveram-se os gráficos para dosagem de açúcar redutor e atividade da enzima α -amilase na ração (Figura 1 e 2).

O efeito do acréscimo da α -amilase de *Cryptococcus flavus* na dosagem de açúcar redutor para o milho moído, mostra ação no tempo de 30 dias, mas é potencializado no final do período. No farelo de soja, o período inicial de um a cinco dias e depois de 20 dias tem uma ação maior. As rações têm efeito do acréscimo da enzima, mais potencializado nos primeiros dias, para a ração pré-inicial de um a 15 dias e para ração inicial de um a cinco dias.

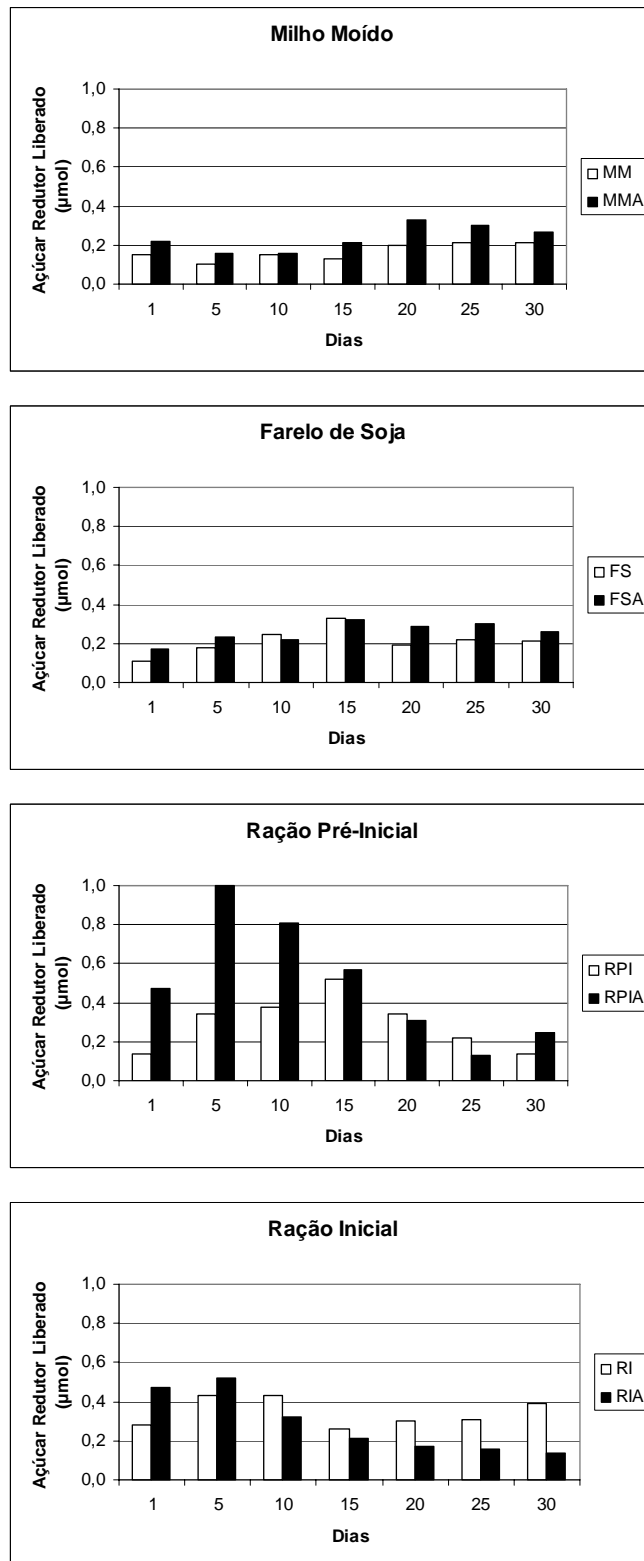


Figura 1. Teores de açúcar redutor no milho moído sem amilase (MM) e com amilase (MMA), farelo de soja sem amilase (FS) e com amilase (FSA), ração pré-inicial sem amilase (RPI) e com amilase (RPIA) e ração inicial sem amilase (RI) e com amilase (RIA) num período de 30 dias.

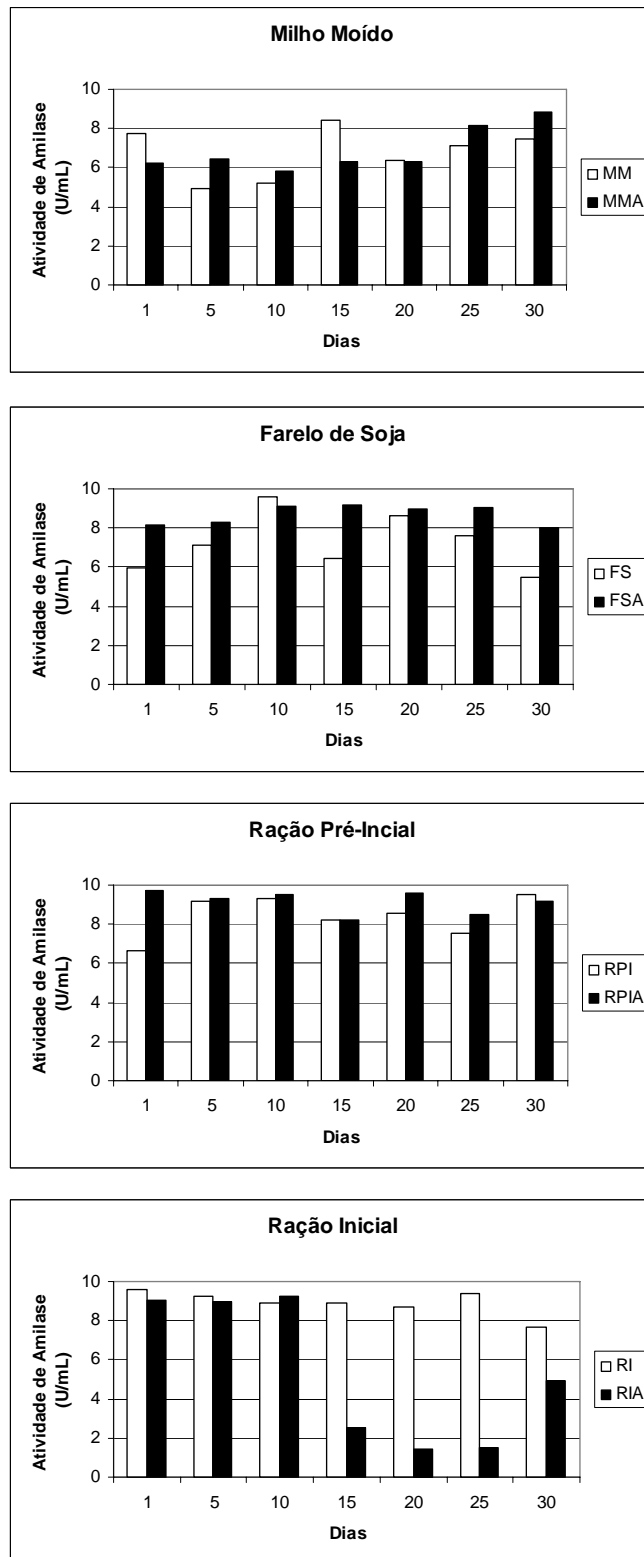


Figura 2. Teores de açúcar redutor no milho moído sem amilase (MM) e com amilase (MMA), farelo de soja sem amilase (FS) e com amilase (FSA), ração pré-inicial sem amilase (RPI) e com amilase (RPIA) e ração inicial sem amilase (RI) e com amilase (RIA) num período de 30 dias.

Na dosagem da enzima amilase no milho moído no período de 30 dias, houve aumento da sua dosagem ação da enzima exógena com aproximadamente 25 dias e com 30 dias (Figura 2). Para o farelo de soja, sua ação é contínua mostrando que a enzima exógena age durante todo o período experimental. Na ração pré-inicial, a ação da enzima exógena foi somente nos primeiros cinco dias. Na ração inicial, não há ação da enzima α -amilase de *Cryptococcus flavus*.

3.3. Perfil da α -amilase em rações de frangos de corte em função do pH do ácido e básico e da quantidade de enzima

Os resultados do experimento são apresentados nas Figuras 3, 4 e 5. As médias foram analisadas pelo SAEG e houve diferença estatística para todos os resultados. As médias foram comparadas teste de SNK com 5% de probabilidade.

AO (2005) analisou em seu trabalho a liberação de açúcares redutores aplicado no farelo de soja com a enzima α -galactosidase e demonstra aumento linear significativo da adição de enzima com a liberação de açúcares redutores. Este trabalho foi o único encontrado na literatura que relata a liberação de açúcares redutores com o acréscimo de enzimas em dietas para frangos.

Neste trabalho, mostrou-se o mesmo perfil, apresentado na Figura 4, quanto maior a quantidade de amilase adicionada aumenta-se a liberação de açúcares redutores em rações para frangos de corte. Observou-se com estes resultados que a ação da enzima amilase foi potencializada na ração de sorgo inicial e posteriormente as rações pré-iniciais com quantidade de enzima de 3,0 mL, e o pH de melhor atuação da enzima foi 8,0 (Figura 5) que equivale ao pH ótimo para a enzima α -amilase de *Cryptococcus flavus*.

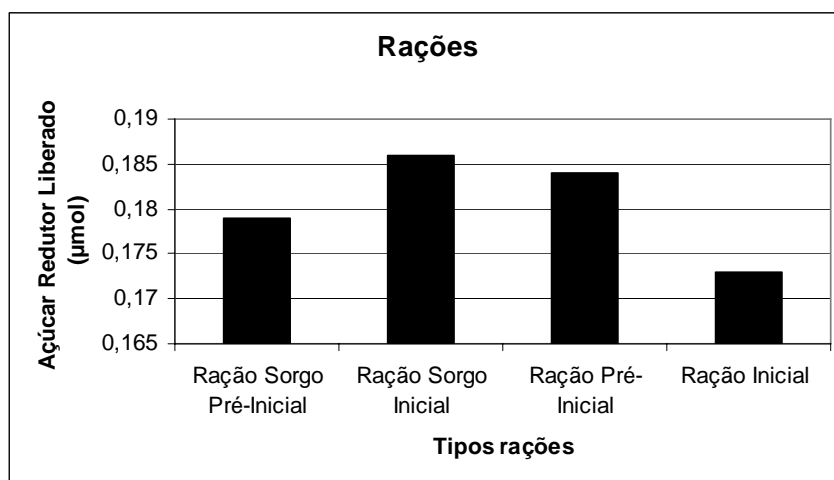


Figura 3. Liberação de açúcar redutor pelo método do DNS em rações.

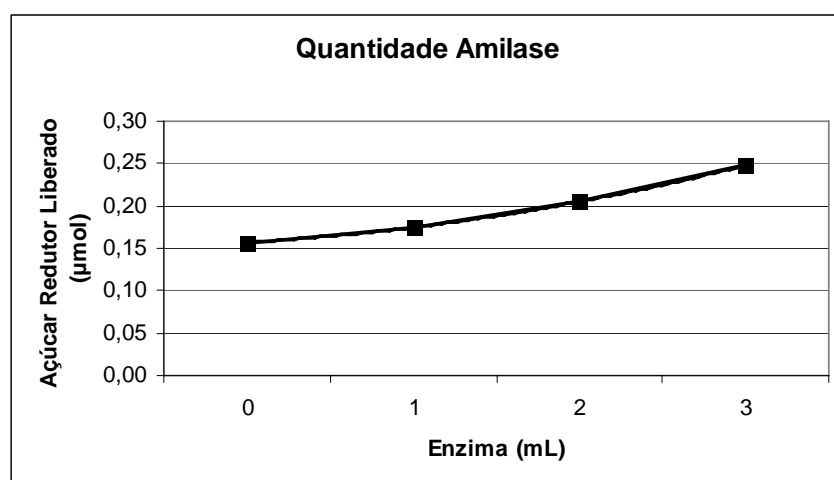


Figura 4. Quantidade da enzima α -amilase de *Cryptococcus flavus* acrescentada na ração com liberação de açúcar redutor pelo método do DNS.

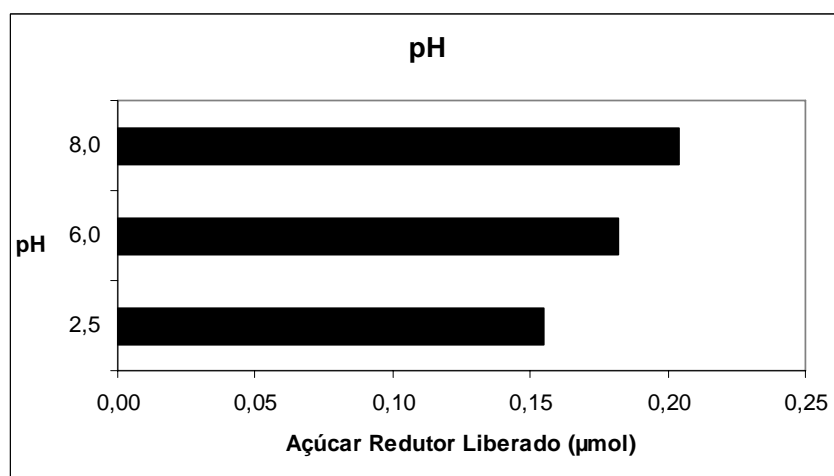


Figura 5. Efeito do pH na liberação de açúcar redutor pelo método do DNS.

GAUTHIER (2005) avalia o tempo de trânsito do alimento em diferentes compartimentos do trato gastrointestinal, o que corrobora com a hipótese deste experimento, pois depois da adição do ácido esperou-se 1 hora e 30 minutos para adição da base e depois de 1 hora, para se dosar a concentração de açúcares redutores. Este fato aponta maior liberação de açúcares redutores na região do intestino, o que acontece em vivo, demonstrando que este experimento in vivo condiz com *in vitro*.

Este experimento foi similar ao da empresa Novozymes que utilizou a simulação de um robô, que se alimenta como monogástrico. Este aparelho sofisticado composto de várias bombas controladas por computador simula as condições fisiológicas que condiz às condições gástrica e intestinal (BIOTIMES, 2001).

3.4. Perfil do açúcar redutor e proteína solúvel das rações experimentais

Os dados encontrados são variáveis, mas o perfil que se segue é que na fase inicial de cada período de sete dias, quando há acréscimo da enzima a liberação de açúcar redutor é mínima, mas com o passar dos dias esta liberação aumenta, o que possibilita tirar a conclusão sobre a ação da enzima, na quebra dos nutrientes disponibilizando mais energia prontamente disponível para o animal.

Os valores de proteína solúvel se tornam mais digestíveis com acréscimo da enzima e o efeito é contrário ao da liberação de açúcar redutor. Os dados encontrados por dia são mostrados na Tabela 5 e a interação dos dias são apresentados na Tabela 6.

Tabela 5. Concentrações de proteína solúvel e açúcar redutor em rações de frangos de corte no período de sete e 14 e 21 dias, suplementadas com amilase

Fase Pré-Inicial de um dia		
Rações*	Açúcar Redutor (μmol)	Proteína ($\mu\text{g/mL}$)
PIV	8,30c	155,75
PIVCry	20,30a	162,85
PIVAsp	15,27b	155,48
P (%)	0,00005	>>0,05
CV (%)	8,15	6,86
Fase Pré-Inicial de sete dias		
Rações	Açúcar Redutor (μmol)	Proteína ($\mu\text{g/mL}$)
PIV	12,72b	170,50a
PIVCry	17,75a	122,52b
PIVAsp	18,08a	149,35b
P (%)	0,0011	0,006
CV (%)	6,31	7,71
Fase Inicial oito dias		
Rações	Açúcar Redutor (μmol)	Proteína ($\mu\text{g/mL}$)
IV	11,70c	116,46b
IVCry	42,18a	161,04a
IVAsp	35,81b	146,73a
P (%)	0,00000	0,00258
CV (%)	5,76	6,42
Fase Inicial 14 dias		
Rações	Açúcar Redutor (μmol)	Proteína ($\mu\text{g/mL}$)
IV	10,67c	113,26b
IVCry	44,67a	145,31a
IVAsp	37,02b	129,52b
P (%)	0,00000	0,00923
CV (%)	2,90	6,38
Fase Inicial 15 dias		
Rações	Açúcar Redutor (μmol)	Proteína ($\mu\text{g/mL}$)
IV	13,09c	172,09a
IVCry	46,67b	98,53b
IVAsp	77,60a	83,83b
P (%)	0,0000	0,00002
CV (%)	3,05	6,47
Fase Inicial 21 dias		
Rações	Açúcar Redutor (μmol)	Proteína ($\mu\text{g/mL}$)
IV	15,26c	121,54a
IVCry	48,63b	59,35b
IVAsp	84,34a	73,94b
P (%)	0,00000	0,00005
CV (%)	5,85	7,37

^{abc}/Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna são diferentes pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade.

*(PIV) ração pré-inicial vegetal, (PIVCry) ração pré-inicial com α -amilase de *Cryptococcus*, (PIVAsp) ração pré-inicial com α -amilase de *Aspergillus*, (IV) ração inicial vegetal, (IVCry) ração inicial com α -amilase de *Cryptococcus*, (IVAsp) ração inicial com α -amilase de *Aspergillus*.

Tabela 6. Interação das concentrações de açúcar redutor e proteína solúvel dos períodos de 0 a 7, 8 a 14 e 15 a 21 dias com os tratamentos

Fase Pré-Inicial de um a sete dias		
Rações*	Açúcar Redutor (µmol)	Proteína (µg/mL)
PIV	10,50c	163,12
PIVCry	19,03a	142,69
PIVAsp	16,68b	152,41
Valor de P	0,00000	0,02527
Período	Açúcar Redutor (µmol)	Proteína (µg/mL)
Um dia	14,63	158,02
Sete dias	16,18	147,46
Valor de P	0,01154	0,06670
Interação	Açúcar Redutor (µmol)	Proteína (µg/mL)
PIV * 1 dia	8,30b	155,75a
PIV * 7 dias	12,72a	170,50a
PIVCry * 1 dia	20,30a	162,86a
PIVCry * 7 dias	17,75b	122,52b
PIVAsp * 1 dia	15,27b	155,47a
PIVAsp * 7 dias	18,08a	149,35a
Valor de P	0,00039	0,00351
CV (%)	7,20	7,28
Fase Inicial de oito a 14 dias		
Rações	Açúcar Redutor (µmol)	Proteína (µg/mL)
IV	11,19c	114,86c
IVCry	43,43a	153,18a
IVAsp	36,42b	138,12b
Valor de P	0,00000	0,00002
Período	Açúcar Redutor (µmol)	Proteína (µg/mL)
Oito dias	29,89	141,41
14 dias	30,79	129,36
Valor de P	0,19224	0,01224
Interação	Açúcar Redutor (µmol)	Proteína (µg/mL)
IV * 8 dia	11,70a	116,46a
IV * 14 dias	10,67a	113,26a
IVCry * 8 dia	42,18a	161,05a
IVCry * 14 dias	44,67a	145,31a
IVAsp * 8 dia	35,81a	146,73a
IVAsp * 14 dias	37,02a	129,52a
Valor de P	0,12013	0,34007
CV (%)	4,53	6,41
Fase Inicial de 15-21 dias		
Rações	Açúcar Redutor (µmol)	Proteína (µg/mL)
IV	14,17c	146,81a
IVCry	47,65b	78,94b
IVAsp	80,97a	78,89b
Valor de P	0,00000	0,00000
Período	Açúcar Redutor (µmol)	Proteína (µg/mL)
15 dias	45,78	118,15
21 dias	49,41	84,95
Valor de P	0,00544	0,00000
Interação	Açúcar Redutor (µmol)	Proteína (µg/mL)
IV * 15 dias	13,09a	172,09a
IV * 21 dias	15,25a	121,54b
IVCry * 15 dias	46,67a	98,53a
IVCry * 21 dias	48,63a	59,35b
IVAsp * 15 dias	77,59a	83,83a
IVAsp * 21 dias	84,34a	73,94a
Valor de P	0,16228	0,00084
CV (%)	4,77	6,88

^{abc}/Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna são diferentes pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade.

* (PIV) ração pré-inicial vegetal, (PIVCry) ração pré-inicial com α -amilase de *Cryptococcus*, (PIVAsp) ração pré-inicial com α -amilase de *Aspergillus*, (IV) ração inicial vegetal, (IVCry) ração inicial com α -amilase de *Cryptococcus*, (IVAsp) ração inicial com α -amilase de *Aspergillus*.

4. CONCLUSÕES

Ficou comprovada a ação de Allzyme Vegpro no farelo de soja como disponibilizador da proteína solúvel, apresentando uma viabilidade da sua aplicação no farelo de soja estocado por até 55 dias.

A enzima α -amilase de *Cryptococcus flavus* apresentou potencial para sua aplicação na ração pré-inicial até os primeiros cinco dias visando liberação de alta de açúcares redutores para o animal e fazendo com que o animal se alimente com fonte energética boa e sendo prontamente disponível para uso de manutenção e desempenho.

Também, pode ser concluído que a melhor ração com ação potencializada da enzima α -amilase de *Cryptococcus flavus* foi a de sorgo inicial, com ação secundária nas rações pré-iniciais, com dosagem de 3 mL, sendo demonstrado um perfil quase linear em resposta ao acréscimo da enzima, apresentando pH ótimo de ação de 8,0 para disponibilizar açúcar redutor.

Foi mostrado um perfil da liberação açúcar redutor e proteína solúvel em rações para frangos de corte (pré-inicial e inicial) a base de milho e farelo de soja, dados não encontrados na literatura. O perfil é crescente nos períodos de um a sete, oito a 14 e 15 e 21 dias para a liberação de açúcar redutor e inversamente, isto é decrescente para a solubilização de proteína em rações para os animais.

5. REFERÊNCIAS

AO, T. **Exogenous enzymes and organic acids in the nutrition of broiler chicks: effects on growth performance and in vitro and in vivo digestion**. Kentucky: University of Kentucky, 2005. 144p. Tese (Doctor of Philosophy in the College of Agricultural) - University of Kentucky, 2005.

BIOTIMES. **The robot that eats like a pig**. Biotimes, 10-11, 2001. Disponível site: <http://www.novozymes.com/en/MainStructure/PressAndPublications/BioTimes/Articles/2001/3.+September/The+robot+that+eats+like+a+pig.htm>, janeiro de 2007.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, n.1/2, p.248-254, 1976.

CHAMPE, P.C. & HARVEY, R.A. **Bioquímica ilustrada**. 2ªed. Porto Alegre: Artmed, 2000. 446 p.

- FUWA, H.J. A new method for microdetermination of amylase activity by use the amylose as the substrate. **Journal Biochemical**, v.41, p.583-603, 1954.
- GAUTHIER, R. La Salud Intestinal: Clave de la productividad (El caso de los Ácidos Orgânicos). In: PRECONGRESO CIENTIFICO AVICOLA IASA, XXVII CONVENCION ANECA-WPDC. Puerto Vallarta, Jal. México, 2002. **Anais eletrônicos...** [on line] Disponível em: <http://www.etsia.upm.es/fedna/capitulos/00CAP8.pdf>. Acesso em: 16/05/2005.
- GRACIA, M.I.; ARANÍBAR, M.J.; LÁZARO, R.; MEDEL, P.; MATEOS, G.G. α -Amylase Supplementation of Broiler Diets Based on Corn. **Poultry Science**, v.82, n.3, p.436-442, 2003.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p.426-428, 1956.
- MURAKAMI, A. & GARCIA, E.R.M. Suplementação enzimática de dietas à base de farelo de soja e soja extrusada sobre o desempenho de frangos de corte. **Informativo eletrônico da Alltech**. Site: http://www.alltech.com/Brasil/artigos/Pics/Murakami_Beans.pdf. Acesso em 2005.
- NELSON, D.L. & COX, M.M. **Lehninger: Princípios de Bioquímica**, 3^oed., Sarvier, 2003.
- ONDERCI, M; SAHIN, N; SAHIN, K; CIKIM, G; AYDÍN, A; OZERCAN, I; AYDÍN, S. Efficacy of Supplementation of α -Amylase-Producing Bacterial Culture on the Performance, Nutrient Use, and Gut Morphology of Broiler Chickens Fed a Corn-Based Diet. **Poultry Science**, v.85, n.3, p.505-510, 2006.
- ROSTAGNO, H.S., ALBINO, L.F.T, DONZELE, J.L. Composição de alimentos e exigências nutricionais. Tabelas brasileiras para aves e suínos; 2. ed. Editora UFV, Viçosa, 2005. 186p.
- SAEG. **Sistema de análise estatísticas e genéticas**. Universidade Federal de Viçosa, Versão 9.5, 2007.
- SAS. **Statistical Analysis System User's Guide: Stat**, Version 8.0. Cary: SAS Institute, 2000.

CAPÍTULO 4

SUPLEMENTAÇÃO DE α -AMILASE DE *Cryptococcus flavus* E *Aspergillus niger* HM2003 NA DIETA DE FRANGOS DE CORTE

1. INTRODUÇÃO

Com o aumento da produção e do consumo da carne de frango, grandes avanços ocorreram na área de nutrição. O uso de enzimas na ração faz parte deste avanço, pois melhoram o desempenho das aves. Enzimas têm sido usadas na alimentação animal a mais de 50 anos, todavia o seu uso intensivo tem sido reportado nos últimos 10 anos (SHEPPY, 2001).

A contribuição da biotecnologia com lançamento de enzimas pode contribuir na melhoria da eficiência alimentar e na produtividade das aves. A α -amilase atua aumentando a digestibilidade do amido. O amido representa em média 60 a 70% do peso dos grãos de cereais, sendo o constituinte de maior importância do ponto de vista nutricional (NOY & SKLAN, 1995). Em pesquisa realizada por ZANELLA (2001), ocorreu baixa digestibilidade ileal do amido em pintos de corte, alimentados com dietas à base de milho e de farelo de soja.

As enzimas pancreáticas durante os primeiros dias após eclosão podem limitar o crescimento das aves, pois são produzidas em quantidades insuficientes para atender o processo digestivo (GARCÍA et al., 2003 e GRACIA et al., 2003).

Os animais não retêm todos os nutrientes consumidos nas matérias primas, devido à própria disponibilidade destes no alimento e a própria capacidade limitada do trato digestivo do animal. A menor digestibilidade das matérias primas é, a princípio, o resultado da falta de enzimas endógenas para extrair os nutrientes dos ingredientes. A suplementação de enzimas pode complementar a ação das enzimas endógenas, melhorando o valor nutricional dos ingredientes e o desempenho das aves.

NOY & SKLAN (1995) e KOBAYASHI et al. (2002) afirmaram que as aves têm síntese limitada de enzimas pancreáticas nos primeiros dias após a eclosão e, assim, a suplementação torna-se necessária.

A amilase foi produzida por *Cryptococcus flavus* e *Aspergillus niger* HM2003 com substratos diferentes para aplicação na dieta na forma líquida para suplementar sua baixa concentração.

Objetivou-se, com este estudo, testar a suplementação dietética da α -amilase de *Cryptococcus flavus* e *Aspergillus niger* HM2003 sobre o desempenho, a digestibilidade e a viscosidade da ração e da digesta de frangos de corte.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Procedimentos gerais

A produção enzimática foi realizada no Laboratório de Enzimologia do Instituto de Ciências Biológicas (UFG) e no Centro de Biotecnologia (UFRGS). O experimento com frangos de corte foi realizado na Escola de Veterinária (UFG), nas dependências do setor de Avicultura do Departamento de Produção Animal.

Foram utilizados 360 pintos da linhagem Cobb, machos, de um dia de idade. Para condução dos ensaios, foram utilizadas três baterias de aço galvanizado com cinco andares e divisões com 0,80 x 0,75 x 0,25 m (comprimento x largura x altura) cada. Estas baterias foram instaladas em galpão de alvenaria com 12,96 x 2,96 m (38,36 m²) de dimensões internas, cumeeira com orientação norte-sul, pé-direito de 2,32 m, sem lanternim, coberto com telhas francesas. O galpão é rodeado por mureta de concreto com 0,46 m e tela de arame até o telhado com altura de 1,70 m, protegido na parte externa por cortina de ráfia e sistema com catracas para sua movimentação.

Antes da chegada do lote foram obedecidas as normas, tanto para o galpão quanto para as baterias, de limpeza e desinfecção das instalações (telas, cortinas, piso, área externa e equipamentos) com duração de sete dias, sendo dois para limpeza e cinco para vazios sanitário com pulverização de desinfetante a base de amônia quaternária e glutaraldeído.

O aquecimento de cada andar das baterias foi realizado com lâmpadas incandescentes de 60 W, a iluminação foi constante, sendo natural e artificial. Os comedouros e bebedouros foram do tipo calha, sendo limpos e abastecidos duas vezes ao dia. O aquecimento interno foi monitorado diariamente com termômetro de máxima e mínima e umidiostato, sendo associado ao manejo das cortinas para manter a temperatura interna do galpão adequada às aves.

Foram conduzidos, no período de outubro a novembro de 2006, dois experimentos do 1^o ao 21^o e do 8^o ao 21^o dias de idade sendo o primeiro para avaliar a adição da enzima na primeira semana (sete dias) e o segundo para avaliação da enzima aos de 8 a 21 dias, em delineamento inteiramente, sendo três com rações pré-iniciais e três com rações iniciais, as rações foram formuladas segundo recomendações de ROSTAGNO et al. (2005). As rações

pré-iniciais e iniciais são apresentadas na Tabela 1. Os tratamentos utilizados foram: dieta com ração pré-inicial sem enzima (RPI), dieta com ração pré-inicial com enzima de *Cryptococcus* (RPIcCry), dieta com ração pré-inicial com enzima de *Aspergillus* (RPIAsp), dieta com ração inicial sem enzima (RI), dieta com ração inicial com enzima de *Cryptococcus* (RIcCry) e dieta com ração inicial com enzima de *Aspergillus* (RIAsp). A ração e água foram oferecidos *ad libitum*. A pesagem das aves e das sobras de ração foi efetuada semanalmente.

Tabela 1. Composição percentual e nutricional das rações experimentais pré-inicial (1 a 7 dias) e inicial (8 a 21 dias), na matéria natural

Ingredientes (kg)	Ração pré-inicial	Ração inicial
Milho	58,954	60,210
Farelo de soja	34,877	33,954
Óleo vegetal	1,690	1,766
Fosfato bicálcico	1,905	1,826
Calcário	0,924	0,890
Sal	0,447	0,429
L-Lisina.HCl (%)	0,353	0,191
DL-Metionina99(%)	0,351	0,234
Premix mineral/vitamínico ¹	0,500	0,500
Composição Química		
Energia metabolizável (kcal/kg)	2.950	3.000
Proteína (%)	22,000	20,790
Triptofano (%)	0,293	0,276
Lisina (%)	1,466	1,263
Metionina + cistina (%)	1,041	0,897
Metionina (%)	0,684	0,554
Treonina (%)	0,850	0,809
Sódio (%)	0,223	0,214
Cálcio (%)	0,939	0,884
Fósforo disponível (%)	0,470	0,442

¹Suplemento mineral e vitamínico. Micromim Aves (suplemento mineral em mg): Manganês 150.000, Zinco 100.000, Ferro 100.000, Cobre 16.000, Cloreto de Colina 60.000 e Iodo 1.500. Premix Inicial (Suplemento vitamínico): Vitamina A 8.000.000 UI, Vitamina D₃ 2.000.000 UI, Vitamina E 15.000 UI, Vitamina K 1.800mg, Vitamina B₁ 1.800 mg, Vitamina B₂ 6.000 mg, Vitamina B₆ 2.800 mg, Vitamina B₁₂ 12.000 mg, Niacina 40.000 mg, Ácido Fólico 1.000 mg, Ácido Pantotênico 15.000 mg, Biotina 60 mg, Selênio 300 mg, Antioxidante 30 g.

2.2. Desempenho

Foram avaliados, para os experimentos do 1^o ao 21^o e do 8^o ao 21^o dias, os pesos das aves e das dietas no primeiro, sétimo, 14^o, e 21^o dias de idade. As aves do experimento de 8^o ao 21^o dias, as aves receberam as dietas sem enzimas com rações pré-iniciais, iguais ao do

controle do experimento do 1^o ao 21^o dias. As variáveis de desempenho avaliadas foram: ganho de peso (GP): calculado pela diferença entre os pesos médios das aves obtidos durante o período experimental; consumo de ração (CR): obtido pela diferença entre a quantidade da dieta oferecida no início e as sobras ao final das fases. Foi considerado o número de aves mortas no intervalo como critério para correção dos valores de consumo. O índice de conversão alimentar (CA) foi obtido pela relação entre ganho de peso total e consumo de ração total. O consumo de água (CAgua) foi obtido pela relação entre total de água ingerido e relação água por ração (RAR) foi obtida pela relação entre quantidade total de água ingerida dividido pelo consumo de ração.

2.3. Digestibilidade

A coleta de excretas produzidas pelas aves foi realizada no período entre o 4^o e o 7^o dia (Ensaio 1) e o 14^o e o 17^o dia (Ensaio 2) de idade, efetuada duas vezes ao dia durante os períodos experimentais. As dietas experimentais e as excretas foram acondicionadas sob congelamento e posteriormente enviadas ao Laboratório de Nutrição Animal da EV/UFG para determinação dos níveis de matéria seca (MS) e de proteína bruta (PB), seguindo a metodologia descrita por SILVA & QUEIROZ (2002).

Para preparar as amostras de excretas para análise, foram coletadas alíquotas, que foram identificadas e submetidas à pré-secagem em estufa retilínea de ventilação forçada (FANEM LTDA) a $55 \pm 5^\circ\text{C}$, e posteriormente trituradas em moinhos tipo Wiley, para realização das análises, de acordo com a metodologia descrita por SILVA & QUEIROZ (2002). Paralelamente, das amostras das rações experimentais foram determinados: matéria seca a 55°C das excretas em estufa de ventilação forçada com temperaturas de $55^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$ por 72 horas; matéria seca a 105°C das rações experimentais e das excretas em estufa regulada à 105°C , por 12 horas, sendo as análises realizadas em duplicata; nitrogênio total das rações experimentais e nas excretas utilizando-se o método de micro-Kjeldahl. Posteriormente, calculados os valores de proteína bruta pela multiplicação da % de N por 6,25; digestibilidade determinada pela equação entre o nutriente ingerido menos o excretado dividido pelo nutriente ingerido (MATTERSON et al., 1965); retenção de matéria seca obtida pela quantidade de matéria seca ingerida subtraída da quantidade excretada em relação ao ganho de peso; retenção de proteína bruta: determinada pela quantidade de proteína bruta ingerida subtraída da quantidade excretada dividida pelo ganho de peso. O cálculo da retenção de

nutrientes seguiu o descrito por NOY & SKLAN (2002), levando-se em consideração o balanço dos nutrientes e o ganho de peso registrado no período de quatro a sete dias.

2.4. Viscosidade

A viscosidade da digesta foi determinada, no Laboratório de Química da Universidade Federal de Goiás. Uma ave de cada tratamento, do experimento de 1 aos 7 dias de idade e do experimento de 8 a 21 dias de idade foi sacrificada por deslocamento cervical e retirou-se o intestino para a realização da coleta do conteúdo intestinal presente no fim do duodeno ao divertículo de Meckel. Para a coleta da digesta, o segmento intestinal selecionado foi comprimido manualmente da região cranial para a caudal, e o conteúdo foi coletado em copo Becker e transferido para Ependorff e submetido à centrifugação com 3000 rpm durante 3 minutos a 4^oC. Posteriormente, coletou-se 500 µL de solução que foi misturado com 15 mL de água, mantido a temperatura de 5^oC, para leitura no viscosímetro de Ostwald com capilar de 100 e banho termostático a 37^oC, para simular a temperatura da ave. Foi utilizado o picnômetro de 15 mL para determinar a densidade de cada líquido pela fórmula $d = m/v$ a 37^oC.

Para análise da viscosidade das rações utilizadas no experimento 1 aos 7 dias e no experimento 2 aos 21 dias de idade, procedeu-se a mesma metodologia. Foram pesadas 0,5 g das rações em Ependorff e misturadas com 1,5 mL de água destilada e coletou-se 500 µL do sobrenadante.

Todas as diluições foram levadas em conta para o cálculo final da viscosidade, sempre levando em consideração a viscosidade da água a 37^oC, uma vez que o viscosímetro de Ostwald, utiliza como padrão a resistência que a água para os cálculos finais.

A fórmula utilizada para cálculo foi $\eta_1 / \eta_2 = \rho_1 \tau_1 / \rho_2 \tau_2$ onde:

η_1 = Viscosidade da água a 37^oC;

η_2 = Viscosidade da amostra;

ρ_1 = Densidade da água a 37^oC;

ρ_2 = Densidade da amostra;

τ_1 = Tempo de escoamento da água;

τ_2 = Tempo de escoamento da amostra.

A medida de viscosidade é dada em centipoise (cPs) que equivale a 10⁻³ Pa.s.

2.5. Análise estatística

A análise estatística dos dados foi feita por análise de variância utilizando-se o sistema SAEG, versão 9.5 (2007). No caso de efeito significativo, as médias foram comparadas teste de Tukey ($P < 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Temperatura e umidade relativa

A temperatura e umidade relativa obtidos nos dois experimentos, que ocorreram simultaneamente (Tabela 2), estão nas faixas esperadas para a região onde foram conduzidos.

Tabela 2. Médias de temperatura ambiente e umidade relativa, obtida durante o período experimental

Dias	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)			Umidade relativa (%)		
	Máxima	Mínima	Média	Máxima	Mínima	Média
04 a 10/10/2006	29,7	23,8	26,8	67,0	39,1	53,1
11 a 17/10/2006	30,0	23,9	26,9	76,1	45,1	60,6
18 a 24/10/2006	28,8	21,9	25,4	89,6	49,9	69,7
Média	29,5	23,2	-	77,6	44,7	-

3.2. Desempenho

3.2.1. Suplementação de α -amilase de *Cryptococcus flavus* e *Aspergillus niger* HM2003 na dieta de frangos de corte na fase pré-inicial

O peso médio das aves utilizadas no início do experimento um foi de $49,72 \pm 0,68\text{g}$, peso médio do primeiro dia.

Nas Tabelas 3, 4 e 5 são apresentados os dados encontrados para o experimento 1 no período de 1 a 7, 8 a 14 e 15 a 21 dias de idade, respectivamente.

As rações utilizadas para o experimento 1 e para o experimento 2 com as respectivas siglas foram: dieta com ração pré-inicial sem enzima (RPI), dieta com ração pré-inicial com amilase de *Cryptococcus flavus* (RPI_{Cry}), dieta com ração pré-inicial com amilase de *Aspergillus niger* HM2003 (RPI_{Asp}), dieta com ração inicial sem enzima (RI), dieta com

ração inicial com amilase de *Cryptococcus flavus* (RICry) e dieta com ração inicial com amilase de *Aspergillus niger* HM2003 (RIAsp).

Tabela 3. Consumo de ração (CR), ganho de peso (GP), conversão alimentar (CA), consumo de água (CAgua), relação consumo água:ração (RAR), de 1 a 7 dias de idade de frangos alimentados com rações pré-iniciais suplementadas com amilase

Rações	CR (g)	GP (g)	CA	CAgua (mL)	RAR (mL/g)
RPI	124,5	114,4	1,089	250,0	2,017
RPI _{Cry}	129,1	118,1	1,094	249,0	1,932
RPI _{Asp}	127,6	119,9	1,064	257,0	2,017
CV (%)	4,92	3,54	5,39	4,39	5,35
Valor de P	>0,05	0,14608	>0,05	>0,05	0,37754

Tabela 4. Consumo de ração (CR), ganho de peso (GP), conversão alimentar (CA), consumo de água (CAgua), relação consumo água:ração (RAR), de 8 a 14 dias de idade de frangos alimentados com rações pré-iniciais suplementadas com amilase

Rações	CR (g)	GP (g)	CA	CAgua (mL)	RAR (mL/g)
RPI	288,0	268,7	1,073	866,0 ^{ab}	3,015
RPI _{Cry}	301,1	279,3	1,078	879,0 ^a	2,924
RPI _{Asp}	301,6	280,1	1,078	850,0 ^b	2,825
CV (%)	4,90	3,06	5,64	1,82	3,60
Valor de P	0,28306	0,09706	>0,05	0,03647	0,19666

^{ab}Médias seguidas por letras distintas na coluna são diferentes (Tukey - 5% de probabilidade).

Tabela 5. Consumo de ração (CR), ganho de peso (GP), conversão alimentar (CA), consumo de água (CAgua), relação consumo água:ração (RAR), de 15 a 21 dias de idade de frangos alimentados com rações pré-iniciais suplementadas com amilase

Rações	CR (g)	GP (g)	CA	CAgua (mL)	RAR (mL/g)
RPI	481,8	340,0	1,418	826,0	1,715
RPI _{Cry}	486,7	358,3	1,361	819,0	1,684
RPI _{Asp}	504,7	358,7	1,407	834,0	1,656
CV (%)	4,10	3,59	4,75	2,07	3,40
Valor de P	0,20895	0,06132	0,38333	>0,05	0,29470

Avaliando-se os dados obtidos do primeiro experimento, somente se observou influência da adição de enzima α -amilase de *Cryptococcus flavus* e *Aspergillus niger* HM2003, no consumo de água no período de 8 a 14 dias, com menor ingestão para a ração contendo enzima de *Aspergillus niger* HM2003. Não houve nenhuma alteração dos outros parâmetros avaliados.

Os dados deste experimento discordam dos de BRUM et al. (2006) que concluíram que a suplementação com até 45g/ton de α -amilase de *Aspergillus oryzae*, em dietas a base de milho e farelo de soja para frangos de corte, melhorou linearmente o ganho de peso e peso corporal das aves num período de um a 23 dias de idade, sendo o efeito maior no período de 14 a 23 dias de idade.

3.2.2 Suplementação de α -amilase de *Cryptococcus flavus* e *Aspergillus niger* HM2003 na dieta de frangos de corte na fase inicial

O peso médio das aves utilizadas no início do experimento dois foi de $203,09 \pm 13,37$ (peso médio de sete dias).

Não houve influência da adição de α -amilase de *Cryptococcus flavus* e *Aspergillus niger* HM2003 na dieta (Tabelas 6 e 7) sobre o desempenho das aves nos períodos de 8 a 14 e 15 a 21 dias de idade.

Tabela 6. Consumo de ração (CR), ganho de peso (GP), conversão alimentar (CA), consumo de água (CAgua), relação consumo água:ração (RAR), de 8 a 14 dias de idade de frangos alimentados com rações iniciais suplementadas com amilase

Rações	CR (g)	GP (g)	CA	CAgua (mL)	RAR (mL/g)
RI	312,4	242,3	1,292	817,0	2,625
RICry	333,3	254,2	1,314	833,0	2,503
RIAsp	312,3	256,4	1,217	836,0	2,683
CV (%)	5,76	4,94	6,72	2,10	5,49
Valor de P	0,15706	0,19493	0,21927	0,24600	0,16986

Tabela 7. Consumo de ração (CR), ganho de peso (GP), conversão alimentar (CA), consumo de água (CAgua), relação consumo água:ração (RAR), de 15 a 21 dias de idade de frangos alimentados com rações iniciais suplementadas com amilase

Rações	GP (g)	CR (g)	CA	CAgua (mL)	RAR (mL/g)
RI	311,8	455,9	1,461	842,0	1,851
RICry	323,5	466,3	1,442	842,0	1,806
RIAsp	316,2	442,6	1,401	837,0	1,896
CV (%)	3,31	4,18	4,08	2,01	5,19
Valor de P	0,24638	0,18395	0,28904	>0,05	0,36226

Os dados apresentados para os experimentos discordam de CARRÉ (2004) que afirmou que o sistema digestivo de aves para hidrólise do amido é caracterizado pela alta

atividade potencial. Entretanto, em contraste com mamíferos, o potencial das aves para completa digestão do amido pela degradação microbial na parte distal do trato digestivo é muito baixo. O uso da enzima α -amilase se constitui em boa alternativa para rações. Além disso, as aves possuem deficiência enzimática para α -amilase pancreática pós-eclosão na primeira semana de vida, mas com a ingestão de alimentos, ocorre estímulo para secreção dessa enzima.

Há discordância, também, com GARCIA et al. (2003) e JUNQUEIRA et al. (2001). GARCIA et al. (2003) que suplementaram α -amilase até sete dias de idade com melhoria no desempenho de animais nas outras fases. As principais razões que garantem esta prática estão sustentadas no fato de que estas aves apresentam necessidades nutricionais limitantes pelas dificuldades que têm de digerir e absorver nutrientes na primeira semana de vida. JUNQUEIRA et al. (2001) afirmaram que há consenso entre os nutricionistas de que o bom desenvolvimento inicial resulta em melhor desempenho no ciclo de produção. Isto se traduz em lotes uniformes e sem problemas ao término da criação. A alta relação entre peso corporal nos primeiros seis dias com peso corporal no final da 6^a e 7^a semanas é evidência da importância nutrição na primeira semana de criação de frangos.

3.3. Viscosidade

Os resultados deste experimento mostraram que a viscosidade da ração (VRação) e a viscosidade da digesta (VIntestinal) não apresentaram diferença significativa, nas fases de sete e 21 dias. As dietas formuladas são de baixa viscosidade, pois são compostas de milho e farelo de soja, portanto a amilase não exerceu efeito significativo sobre estas rações e nem no conteúdo intestinal. Os valores são diferentes numericamente da viscosidade da ração e da viscosidade da digesta. A Tabela 9 mostra os resultados obtidos e analisados para a VRação e VIntestinal.

A viscosidade já é um assunto bastante estudado na área da alimentação de aves, devido aos alimentos alternativos de alta viscosidade como cevada e centeio e outros de baixa viscosidade como sorgo, mandioca, ervilhas e milho (CARRÉ et al., 1994). WU et al. (2004) avaliaram a viscosidade do trigo usando xilanase, fitase e a combinação das enzimas. Metodologias diferentes são usadas para determinar a viscosidade dos alimentos e rações. Há autores que citam a viscosidade real e potencial e os valores encontrados na literatura são variáveis, pois dependem do equipamento e da metodologia utilizada. O tipo de viscosímetro utilizado também pode influenciar nos resultados, pois depende da calibração do aparelho e

do modo de utilização. Resultados encontrados são discutidos com relação aos valores encontrados em centipoise (cPs).

Usando rações a base de milho e soja CARVALHO (2006) analisou a viscosidade da digesta, com complexos enzimáticos contendo amilase e obteve valor médio de 2,18 cPs para machos. Anteriormente, ZANELLA (1998) encontrou valores de 2,5 centipoises (cPs) para viscosidade da digesta, com adição de complexo multienzimático contendo amilase, protease e xilanase para aves com 23 dias de idade.

Valores significativos foram encontrados por HADORN & WIEDMER (2001) que afirmaram a importância da suplementação enzimática desde o primeiro dia de idade. Os valores de 2,17 e 2,68 cPs diferiram, mas são parecidos aos encontrados na viscosidade da digesta neste trabalho.

GRACIA et al (2003) avaliaram a suplementação de α -amilase em dietas com milho em frangos de corte e encontraram valores de 2,34 cPs para 7 dias e 1,69 cPs para 28 dias para viscosidade intestinal. Apesar dos valores serem diferentes não houve diferença significativa entre a dieta controle e a suplementada com enzima, para sete e 28 dias de idade, o que corrobora com os resultados obtidos neste trabalho.

Tabela 9. Viscosidade da ração (VRação) e da digesta no intestino (VIntestinal) de frangos de corte aos 7 e 21 dias de idade

Dias	Rações	VRação (cPs)	VIntestinal (cPs)
7	RPI	2,82	2,11
	RPIcry	2,79	2,14
	RPIasp	2,81	2,13
	CV (%)	0,49	0,74
	Valor de P	0,17311	0,17079
21	RI	2,80	2,11
	RIcry	2,80	2,11
	RIasp	2,81	2,13
	CV (%)	0,33	0,96
	Valor de P	0,32379	0,31928

3.4. Digestibilidade das rações e das excretas

Na tabela 10 são apresentados os resultados obtidos para os dois experimentos. Os parâmetros avaliados não apresentaram diferença estatística. O acréscimo da enzima não afetou a digestibilidade na fase pré-inicial, apesar de ter causado alteração de peso para a esta fase comparado ao que recebeu a enzima na fase inicial.

Não houve diferença estatística para consumo de nitrogênio da matéria seca (Consumo N MS (g) igual a 64,72), todavia existiu diferença significativa estatística para a retenção (Ret (mg/g)) que é a diferença da proteína bruta ingerida subtraída da excretada dividida pelo seu ganho peso. A retenção (mg/g) da ração com α -amilase de *Aspergillus niger* HM2003 (34,68) foi diferente da ração isenta de enzima (25,00) e da ração com α -amilase de *Cryptococcus flavus* (24,48). Esta diferença pode ser associada ao ganho de peso, pois para outros fatores não houve diferença estatística. Isto implica numa maior utilização da proteína ingerida para o animal. Esse resultado indica maior eficiência digestiva das aves com relação à aplicação dessas enzimas. Apesar de ser essencialmente α -amilase, pode ter havido efeito positivo sobre a produção pancreática. STRINGHINI et al. (2006) realizaram experimento com diferentes níveis de proteína na ração pré-inicial e não obtiveram diferença estatística na retenção para machos (38,24 mg/g).

Tabela 10. Consumo de nitrogênio da matéria seca (Consumo N MS), nitrogênio excretado na matéria seca (N Exc MS), balanço de nitrogênio (BN), digestibilidade de nitrogênio (Dig N) e retenção (Ret) das excretas e rações colhidas nos períodos de 4 a 7 e de 18 a 21 dias

Fase pré-Inicial					
Rações	Consumo N MS (g)	N Exc MS(g)	BN (g)	Dig N (%)	Ret (mg/g)
RPI	30,8	10,933	19,9	64,4	26,4
RPI Cry	29,6	10,499	19,1	64,1	24,1
RPI Asp	31,5	9,800	21,7	68,9	26,6
Valor de P	0,26984	0,25673	0,23289	0,25036	>0,05
CV (%)	6,05	9,94	11,80	7,23	13,66
Fase Inicial					
Rações	Consumo N MS (g)	N Exc MS(g)	BN	Dig N (%)	Retenção
RI	63,5	35,2	28,2	44,5	25,0 ^b
RI Cry	65,0	30,8	34,2	52,3	24,4 ^b
RI Asp	65,7	29,4	36,3	55,6	34,6 ^a
Valor de P	>0,05	0,32705	0,07824	0,09299	0,00723
CV (%)	7,28	14,28	11,009	10,13	9,983

^{ab}Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna são diferentes pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade.

4. CONCLUSÃO

A suplementação do extrato contendo α -amilase em rações de frangos de corte não afetou desempenho e a viscosidade das rações e da digesta. Todavia, houve maior retenção de nitrogênio para a ração inicial contendo amilase de *Aspergillus niger* HM2003.

5. REFERÊNCIAS

- ALBINO, L.F.T. **Sistemas de avaliação nutricional de alimentos e suas aplicações na formulação de rações para frangos de corte**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1991. 141p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 1991.
- BRUM, P.A.R., AVILA, V.S., LIMA, G.J.M.M., COLDEBELA, A., SCHEUERMANN, G., USINGLER, F., TOIGO, G.C. Efeito da suplementação de α -amilase em dietas a base de milho e farelo de soja na digestibilidade da energia das rações e no desempenho de frangos de corte. **Comunicado Técnico da Embrapa**, 425, 2006.
- CARRÉ, B. Causes for variation in digestibility of starch among feedstuffs. **World's Poultry Science Journal**, v.60, n.1, p.76-89, 2004.
- CARRÉ, B., GOMEZ, J., MELCION, J.P., GIBOULOT, B. La viscosité des aliments destinés à l'aviculture. Utilisation pour prédire la consommation et l'excrétion d'eau. **INRA Productions Animales**, v.7, n.5, p.369-379, 1994.
- CARVALHO, J. C. C. **Complexos enzimáticos em rações fareladas para frangos de corte**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2006. 64p. Dissertação (Mestrado em Nutrição de Monogástricos) - Universidade Federal de Lavras, 2006.
- GARCÍA, M.C., CARRILLO, G.R.R., MARTINEZ, A.P., LÓPEZ, J.B. Disponibilidad del fósforo de la pasta de soya y sorgo-gluten de maíz, adicionadas con fitasa em pollos de engorda em iniciación. **Técnica Pecuária de México**, v.41, n.3, p.295-306, 2003.
- GRACIA, M.L., ARANIBAR, M.J., LAZARO, R., MEDEL, P., MATEOS, G.G. Alpha-amylase supplementation of diets based on maize. **Poultry Science**. v.82, n.3, p.436-442, 2003.
- HADORN, R.& WIEDMER, H. Effect of an enzyme complex in a wheat-based diet on performance of male and female broilers. **Journal of Applied Poultry Research**, v.10,n.4, p.340-346, 2001.
- JUNQUEIRA O.M., ARAÚJO, L.F., ARAÚJO, C.S.S., FARIA, D.E., LAURENTIZ, A.C., DAHLKE, F. Desempenho de Frangos de Corte Alimentados com Ovo em Pó. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.3, n.1, p.65-73, 2001.
- KOBAYASHI T., MURAI, A., OKADA, T.; OKUMURA, J. Influence of dietary phosphorus level on growth performance in chicks given corn-soybean diet supplemented with amylase and acid protease. **Animal Science Journal**, v.73, n.3, p.215-220, 2002.
- MATTERSON, L.S.; POTTER, L.M.; STUTZ, M.W. et al. **The metabolizable energy of feed ingredients for chickens**. Agricultural Experiment Station Research Report, University of Connecticut Storrs, v.11, 1965. 11p.
- NOY, Y.& SKLAN, D. Digestion and absorption in the young chick. **Poultry Science**, v.74, p.366-373, 1995.

NOY, Y. & SKLAN, D. Nutrient use in chicks during the first week posthatch. **Poultry Science**, v.81, n.3, p.391-399, 2002.

PENZ, A.M. JR & VIEIRA, S.L. Nutrição na primeira semana. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE MANEJO DE PINTOS DE CORTE. **Anais...**, Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas Editora, 1998. p.121-139.

ROSTAGNO, H.S., ALBINO, L.F.T, DONZELE, J.L. et al. **Composição de alimentos e exigências nutricionais**. Tabelas brasileiras para aves e suínos; 2. ed. Viçosa: Editora UFV, 2005. 186p.

ROTTER, B.A. The future of crude enzyme supplements in pig nutrition. **Pig News Information**, v.11, p.15-17, 1990.

SAEG. **Sistema de análise estatísticas e genéticas, versão 9.5**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2007.

SHEPPY, C. The current feed enzyme market and likely trends. In: BEDFORD, M. R.; PARTRIDGE, G. G. **Enzymes in farm animal nutrition**. CABI Publ., 2001. p.1-10

SILVA, D.J. & QUEIROZ, A.C. **Análises de alimentos** (métodos químicos e biológicos). 3.ed. Viçosa: Editora UFV, 2002. 235p.

STRINGHINI, J. S., ANDRADE, M. L., ANDRADE, L., XAVIER, S.A.G., CAFÉ, M.B., LEANDRO, N.S.M. Performance, nutrient balance and retention and biometrical measures of digestive organs of broilers fed different dietary protein levels in the pre-starter period. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.6, p.2350-2358, 2006.

WU, Y. B., RAVINDRAN, V., THOMAS, D. G., BIRTLES, M. J., HENDRIKS, W. H. Influence of phytase and xylanase, individually or in combination, on performance, apparent metabolisable energy, digestive tract measurements and gut morphology in broilers fed wheat-based diets containing adequate level of phosphorus. **British Poultry Science**, v. 45, n.1, p. 76-84, 2004.

ZANELLA, I. **Suplementação enzimática em dietas a base de milho e sojas processadas sobre a digestibilidade de nutrientes e desempenho de frangos de corte**. Cidade: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, 1998. 187p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, 1998.

ZANELLA, I. Suplementação enzimática em dietas avícolas. In: PRÉ-SIMPÓSIO DE NUTRIÇÃO ANIMAL, 2001, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria: UFSM, 2001. p.37-49

CAPÍTULO 5

BIOMETRIA DE ÓRGÃOS DIGESTIVOS DE FRANGOS DE CORTE COM SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA DE α -AMILASE DE *Cryptococcus flavus* E *Aspergillus niger* HM2003

1. INTRODUÇÃO

O peso dos órgãos é geralmente avaliado na observação da resposta do organismo animal a certos tratamentos (BROWN et al., 1985), já que esses órgãos podem apresentar hipo ou hipertrofia dependendo das condições nutricionais as quais são submetidos (AHMED et al., 1991; NYVACHOT & ATKINSON, 1995).

Segundo MARTINS et al. (2000), os frangos de corte têm grande capacidade de absorção dos nutrientes pelo trato digestivo e alguns componentes da dieta, juntamente com o conteúdo da microbiota intestinal, podem modificar a mucosa, resultando em espessamento da parede intestinal e diminuição da capacidade de digestão e absorção dos nutrientes.

No momento da eclosão, o sistema digestivo da ave está anatomicamente completo, mas sua capacidade funcional, de digestão e absorção ainda está imatura, se comparado às aves adultas (MAIORKA et al., 2002). Assim, pós-eclosão, o trato gastrintestinal sofre grandes alterações, como maturação funcional do intestino, as quais envolvem mudanças morfológicas e fisiológicas que proporcionam aumento na área de superfície de digestão e de absorção.

Na fase inicial de desenvolvimento do trato gastrintestinal, o índice de crescimento e o bom aproveitamento dos alimentos em aves saudáveis dependem do fornecimento de nutrientes e oxigênio aos tecidos. Os segmentos do trato gastrintestinal aumentam em tamanho muito mais rápido do que o corpo da ave durante as primeiras semanas de vida. É necessário um determinado período de maturação antes que o tamanho relativo do intestino e a produção do pâncreas atinjam as taxas de crescimento (NIR, 1998).

Segundo STRINGHINI et al. (2003), o conhecimento do peso dos órgãos das aves na fase pré-inicial se constitui em fator importante para caracterizar o bom desenvolvimento digestivo das aves. CROOM et al. (1999) afirmaram que, apesar de ocorrer aumento

individual de peso dos órgãos, a relação percentual do peso dos órgãos digestivos com o peso das aves se reduz com a idade, como é observado para frangos e perus.

KROGDAHL (1985) descreveu que o tamanho do pâncreas aumentou rapidamente na primeira semana. Com um dia representava 0,2% do peso corporal aumentando para 0,5% aos sete dias de idade das aves e diminuindo novamente até a oitava ou nona semana de idade, o que pode ser explicado pelo desenvolvimento crescente do órgão maximizando a produção de enzimas digestivas.

Aves selecionadas para terem rápido crescimento (linhagens de conformação), apresentam desenvolvimento do sistema digestivo precoce. O tamanho e peso do duodeno, jejuno e íleo, e dos órgãos anexos (fígado, pâncreas, moela e pró-ventrículo), aumentam significativamente durante as primeiras horas de vida (Figura 1). Cada órgão e cada porção do intestino se caracterizam por ter velocidade de crescimento própria (BIGOT et al., 2001). A velocidade de crescimento dos três segmentos intestinais e dos órgãos anexos é máximo entre 6 e 7 dias depois do nascimento, proporcionalmente ao peso vivo da ave. Todavia, o crescimento do pâncreas, duodeno e jejuno é mais rápido e mais precoce que o do fígado e do íleo.

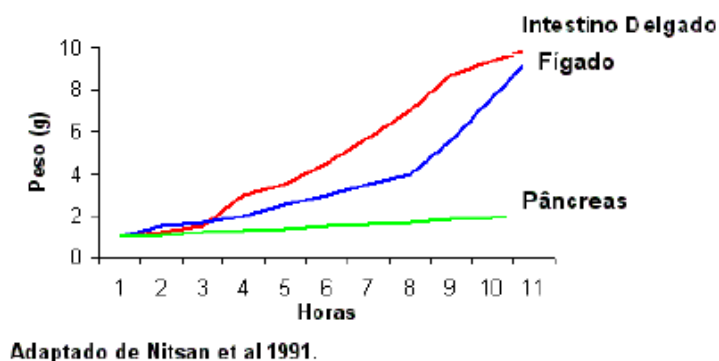


Figura 1. Evolução do peso do intestino delgado, fígado e pâncreas de pintos de corte durante as primeiras horas de vida (NITSAN et al., 1991).

A atividade de amilase é praticamente desprezível até o 2º dia de idade. Apenas entre o 2º e o 7º dia é que existe aumento na secreção desta enzima. A demora na secreção destas enzimas deve-se a adaptação das secreções aos nutrientes ingeridos pelo pintinho nas primeiras horas.

Os locais de maior absorção de nutrientes nas aves são o duodeno e jejuno, pois é onde estão os principais sítios de absorção. O aumento da digestibilidade aparente dos diferentes

nutrientes é o resultado das várias modificações que conduzem à maturação do sistema digestivo durante a primeira semana de vida (NOY e SKLAN, 1998).

As principais razões que justificam uma dieta específica na primeira semana de vida são: anatomia e fisiologia do aparelho digestivo diferenciada, necessidades nutricionais limitantes pelas dificuldades em digerir e absorver certos nutrientes, rápido desenvolvimento potencial nos primeiros dias de vida e grande dificuldade de garantir a sobrevivência em ambientes frios (MORAN JR., 1985; PENZ & VIEIRA, 1998b; CROOM et al. 1999).

Neste trabalho avaliou-se o efeito da suplementação do extrato contendo α -amilase de *Cryptococcus flavus* e *Aspergillus niger* HM2003, em rações pré-iniciais e iniciais para frangos de corte sobre os parâmetros de desenvolvimento do trato gastrintestinal (biometria dos órgãos).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Procedimentos gerais

A produção enzimática foi realizada no Laboratório de Enzimologia do Instituto de Ciências Biológicas (UFG) e no Centro de Biotecnologia (UFRGS). O experimento com frangos de corte foi realizado na Escola de Veterinária (UFG), nas dependências do setor de Avicultura do Departamento de Produção Animal.

Foram utilizados 360 pintos da linhagem Cobb, machos, de um dia de idade. Para condução dos ensaios, foram utilizadas três baterias de aço galvanizado com cinco andares e divisões com 0,80 x 0,75 x 0,25 m (comprimento x largura x altura) cada. Estas baterias foram instaladas em galpão de alvenaria com 12,96 x 2,96 m (38,36 m²) de dimensões internas, cumeeira com orientação norte-sul, pé-direito de 2,32 m, sem lanternim, coberto com telhas francesas. O galpão é rodeado por mureta de concreto com 0,46 m e tela de arame até o telhado com altura de 1,70 m, protegido na parte externa por cortina de ráfia e sistema com catracas para sua movimentação.

Antes da chegada do lote foram obedecidas as normas, tanto para o galpão quanto para as baterias, de limpeza e desinfecção das instalações (telas, cortinas, piso, área externa e equipamentos) com duração de sete dias, sendo dois para limpeza e cinco para vazios sanitário com pulverização de desinfetante a base de amônia quaternária e glutaraldeído.

O aquecimento de cada andar das baterias foi realizado com lâmpadas incandescentes de 60 W, a iluminação foi constante, sendo natural e artificial. Os comedouros e bebedouros foram do tipo calha, sendo limpos e abastecidos duas vezes ao dia. O aquecimento interno foi monitorado diariamente com termômetro de máxima e mínima e umidiostato, sendo associado ao manejo das cortinas para manter a temperatura interna do galpão adequada às aves.

Foram conduzidos, no período de outubro a novembro de 2006, dois experimentos do 1^o ao 21^o e do 8^o ao 21^o dias de idade sendo o primeiro para avaliar a adição da enzima na primeira semana (sete dias) e o segundo para avaliação da enzima aos de 8 a 21 dias, em delineamento inteiramente, sendo três com rações pré-iniciais e três com rações iniciais, as rações foram formuladas segundo recomendações de ROSTAGNO et al. (2005). As rações pré-iniciais e iniciais são apresentadas na Tabela 1. Os tratamentos utilizados foram: dieta com ração pré-inicial sem enzima (RPI), dieta com ração pré-inicial com enzima de *Cryptococcus* (RPICr), dieta com ração pré-inicial com enzima de *Aspergillus* (RPIAsp), dieta com ração inicial sem enzima (RI), dieta com ração inicial com enzima de *Cryptococcus* (RICr) e dieta com ração inicial com enzima de *Aspergillus* (RIAsp). A ração e água foram oferecidos *ad libitum*.

No 7^o e 21^o dias de idade, uma ave de cada repetição dos tratamentos foi identificada e transportada ao Laboratório de Doenças de Aves do Departamento de Medicina Veterinária da Escola de Veterinária da UFG e posteriormente sacrificadas por deslocamento cervical.

Na necropsia foram retiradas as vísceras (fígado, moela, pró-ventrículo e pâncreas) que compõe o trato gastrintestinal (TGI), as quais foram medidas e pesadas seguindo os seguintes passos:

- Comprimento do TGI, medido pelo tamanho do TGI desde a inserção do esôfago na orofaringe até a comunicação do intestino grosso com a cloaca;
- Peso do esôfago mais papo, separado após medida do comprimento do TGI;
- Peso do pró-ventrículo mais moela (com conteúdo remanescente) separado após medida do comprimento do TGI;
- Peso do pâncreas, após a sua separação da alça duodenal;
- Peso do intestino delgado, porção que compreende o final do estômago muscular até o início dos cecos.
- Peso do intestino grosso, representado pelo peso dos cecos, do cólon e do reto.
- Peso do fígado, dado pelo peso do fígado sem a vesícula.

Tabela 1. Composição percentual e nutricional das rações experimentais pré-inicial (1 a 7 dias) e inicial (8 a 21 dias), na matéria natural

Ingredientes (kg)	Ração pré-inicial	Ração inicial
Milho	58,954	60,210
Farelo de soja	34,877	33,954
Óleo vegetal	1,690	1,766
Fosfato bicálcico	1,905	1,826
Calcário	0,924	0,890
Sal	0,447	0,429
L-Lisina.HCl (%)	0,353	0,191
DL-Metionina99(%)	0,351	0,234
Premix mineral/vitamínico ¹	0,500	0,500
Composição Química		
Energia metabolizável (kcal/kg)	2.950	3.000
Proteína (%)	22,000	20,790
Triptofano (%)	0,293	0,276
Lisina (%)	1,466	1,263
Metionina + cistina (%)	1,041	0,897
Metionina (%)	0,684	0,554
Treonina (%)	0,850	0,809
Sódio (%)	0,223	0,214
Cálcio (%)	0,939	0,884
Fósforo disponível (%)	0,470	0,442

¹Suplemento mineral e vitamínico. Micromim Aves (suplemento mineral em mg): Manganês 150.000, Zinco 100.000, Ferro 100.000, Cobre 16.000, Cloreto de Colina 60.000 e Iodo 1.500. Premix Inicial (Suplemento vitamínico): Vitamina A 8.000.000 UI, Vitamina D₃ 2.000.000 UI, Vitamina E 15.000 UI, Vitamina K 1.800mg, Vitamina B₁ 1.800 mg, Vitamina B₂ 6.000 mg, Vitamina B₆ 2.800 mg, Vitamina B₁₂ 12.000 mg, Niacina 40.000 mg, Ácido Fólico 1.000 mg, Ácido Pantotênico 15.000 mg, Biotina 60 mg, Selênio 300 mg, Antioxidante 30 g.

Os parâmetros avaliados foram: o comprimento do TGI, o peso do esôfago + papo, do pró-ventrículo + moela, do pâncreas, do intestino delgado, do intestino grosso e do fígado. Todos os pesos obtidos foram utilizados no cálculo do peso relativo de cada órgão, pela fórmula: peso relativo do órgão = (peso do órgão / peso vivo) x 100.

2.2. Análise estatística

A análise estatística foi feita pelo SAEG 9.5 (UFV, 2007), utilizando teste de Tukey (P<0,10).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 2 apresenta os dados obtidos do experimento para peso relativo dos órgãos.

Não houve influência da suplementação enzimática para os sete dias com médias para peso da ave (167 g), comprimento do trato gastrintestinal (97,15 cm), peso do esôfago/papo (1,22%), peso do pró-ventrículo/moela (8,03%), peso do intestino delgado (7,38%), peso do intestino grosso (1,45%) e peso do fígado (4,14%) de frangos de corte.

Tabela 2. Biometria dos órgãos digestivos (peso relativo) de frangos de corte com 7 dias com dieta suplementada com amilase na primeira semana e 21 dias com dieta suplementada com amilase a partir da segunda semana. Peso da ave, comprimento do trato gastrintestinal, peso do esôfago/papo, peso do pró-ventrículo/moela, peso do pâncreas, peso intestino delgado, peso do intestino grosso e peso do fígado

Parâmetros	Rações				
	Fase Pré-Inicial			Valor P	CV (%)
7 dias	RPI	RPI _{Cry}	RPI _{Asp}		
Peso ave (g)	165	168	168	>0,05	3,04
Trato gastrintestinal (cm)	95,380	95,020	101,06	0,17785	7,33
Esôfago/Papo (%)	1,23	1,22	1,21	>0,05	11,17
Pró-Ventrículo/moela (%)	8,17	8,40	7,53	0,26398	10,34
Pâncreas (%)	0,47 ^a	0,41 ^b	0,37 ^b	0,00016	5,96
Intestino Delgado (%)	7,03	7,08	8,05	0,16431	11,99
Intestino Grosso (%)	1,34	1,46	1,55	0,18944	11,72
Fígado (%)	4,13	4,15	4,13	>0,05	9,23
21 dias	RI	RI _{Cry}	RI _{Asp}	Valor P	CV (%)
Peso ave (g)	779	781	788	>0,05	3,32
Trato gastrintestinal (cm)	114,870	120,300	116,440	>0,05	6,43
Esôfago/Papo (%)	0,65	0,66	0,64	>0,05	11,08
Pró-Ventrículo/moela (%)	4,02	3,91	3,48	0,14008	11,15
Pâncreas (%)	0,36 ^a	0,29 ^b	0,26 ^b	0,00006	7,72
Intestino Delgado (%)	3,54	3,29	3,50	>0,05	16,66
Intestino Grosso (%)	0,87	0,87	0,85	>0,05	9,037
Fígado (%)	3,44 ^a	2,71 ^b	2,75 ^b	0,01007	11,66

^{ab}/Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna são diferentes pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade.

*(RPI) ração pré-inicial, (RPI_{Cry}) ração pré-inicial com α -amilase de *Cryptococcus flavus*, (RPI_{Asp}) ração pré-inicial com α -amilase de *Aspergillus niger* HM2003, (RI) ração inicial, (RI_{Cry}) ração inicial com α -amilase de *Cryptococcus flavus*, (RI_{Asp}) ração inicial com α -amilase de *Aspergillus niger* HM2003.

Para o período de 21 dias, não houve influência da adição enzimática para o peso ave (782 g), comprimento do trato gastrintestinal (117,20 cm), peso esôfago/papo (0,65%), peso

do pró-ventrículo/moela (3,80%), peso intestino delgado (3,44%) e peso do intestino grosso (0,86%).

Em poucos estudos foram observados efeitos da dieta sobre o peso ou o desenvolvimento dos órgãos digestivos nesse período. Utilizando dietas pré-iniciais para pintos de corte com diferentes pesos ao primeiro dia (36,4 e 47,5 g), STRINGHINI et al. (2003) não verificaram diferenças para o peso relativo dos órgãos quando as aves receberam dieta pré-inicial até 4, 7 ou 10 dias de idade. ROCHA et al. (2003), avaliando diferentes níveis protéicos (20, 23 e 26%) e energéticos (2.850 e 3.000 kcal) na dieta pré-inicial, também não detectaram diferenças significativas para peso relativo dos órgãos (fígado, intestinos, moela e coração).

O peso relativo do pâncreas apresentou diferença significativa aos sete e 21 dias de idade. O maior peso foi observado no tratamento controle, para as duas idades, no qual não houve suplementação da enzima α -amilase. As diferenças do peso relativo do pâncreas da dieta controle para as rações com amilase foram: RPICry e RPIAsp equivale a 12,76% e 21,28%, respectivamente para os 7 dias, com média de 17,02% e para os 21 dias, RICry teve diminuição de 19,44% e para RIAsp de 27,77%, com média de 23,61%. Esta observação implica que com acréscimo da amilase exógena, o pâncreas reduz a produção a amilase endógena, fazendo com que diminua a sua funcionalidade e conseqüentemente o seu tamanho. KROGDAHL (1985) relatou que o tamanho do pâncreas aumentou rapidamente durante a primeira semana, aumentando de 0,2% do peso corporal no primeiro dia para 0,5% aos 7 dias, como resultado da crescente produção de enzimas digestivas.

O resultado encontrado neste trabalho, corrobora com KROGDAHL (1985), em que o peso relativo com sete dias para o tratamento que não recebeu enzima, com valor de 0,47%.

SAKOMURA et al. (2004) demonstraram que a idade das aves influenciou significativamente a taxa de crescimento do pâncreas, que diminuiu linearmente com a idade da ave. O valor máximo observado foi no 7º dia de idade. A partir dos 14 dias, a taxa foi diminuída semanalmente até a 4ª semana de idade. Entre a 4ª e 6ª semanas houve queda mais brusca. Segundo KROGDHAL & SELL (1989), NITSAN et al. (1991a,b) e NIR et al. (1993), o maior crescimento desse órgão ocorre entre a 1ª e 2ª semanas de idade das aves, reduzindo em seguida. O crescimento alométrico do pâncreas acompanha a curva de crescimento do frango, porém sua taxa de crescimento é maior nas primeiras semanas de idade das aves, uma vez que nessa fase ocorre a maturação fisiológica de seus órgãos digestivos, essencial na produção e liberação dos zimogênios das enzimas digestivas (MORAN JR., 1985).

O peso do fígado na fase inicial foi significativo, o que não ocorreu na fase pré-inicial. O maior peso foi encontrado na dieta sem suplementação da enzima amilase. A diminuição do fígado foi de 21,22% para RICry e 20,06 para RIAsp. STRINGHINI et al. (2002) encontraram diferenças no peso relativo do fígado aos sete dias de idade, sem efeitos posteriores aos 21 dias de idade, porém, os maiores valores foram encontrados no nível de 22% PB.

O máximo peso relativo dos órgãos do aparelho digestivo dos frangos de corte ocorre quando eles atingem de 3 a 8 dias de idade (DROR et al., 1977). NIR et al. (1993) comentam que o pâncreas e o fígado de pintos aumentam quatro e duas vezes de peso em relação ao peso corporal, na primeira semana de vida. NOY & SKLAN (1997) mostraram que até aproximadamente 14 dias de idade o crescimento da mucosa intestinal é mais lento do que o aumento do diâmetro e do comprimento do intestino. Alguns trabalhos relatam que ao retardar o início da alimentação das aves retarda-se também a maturação de algumas partes do sistema digestivo que só começam a se desenvolver a partir da presença de nutrientes no trato gastrintestinal, principalmente no fígado e no pâncreas (WYATT et al., 1985; GONZÁLES et al., 2000).

4. CONCLUSÃO

A suplementação do extrato contendo amilase produzida por *Cryptococcus flavus* e *Aspergillus niger* HM2003 na dieta reduziu o peso relativo do pâncreas aos sete e 21 dias em 17,02% e 23,61%, respectivamente, e do fígado aos 21 dias em 20,94%. Não houve alteração dos valores aos sete e 21 dias, respectivamente, para peso ave (g) 167 e 782, comprimento do trato gastrintestinal (cm) 97,15 e 117,2, peso esôfago e papo (%) 1,22 e 0,65, peso do pró-ventrículo e moela (%) 8,03 e 3,80, peso intestino delgado (%) 7,38 e 3,80, peso do intestino grosso (%) 1,45 e 0,86 e para peso do fígado aos 7 dias (%) de 4,14.

5. REFERÊNCIAS

AHMED et al. Activities of enzymes, of the pancreas and the lumen and mucosa of the small intestine in growing broiler cockerels fed on tannin-containing diets. **British Journal of Nutrition**, v. 65, n.2, p.189-197, 1991.

- BIGOT, K., TESSERAUD, S., TAOUIS, M., PICARD, M. Alimentation néonatale et développement précoce du poulet de chair. **INRA Productions Animales**, v.14, n.4, 219-230, 2001.
- BROWN, D. R.; SOUTHERN, L. L.; BAKER, D. H. A comparison of methods for organ weight data adjustments in chicks. **Poultry Science**, n.64, p.366-369, 1985.
- CROOM, W.J.; BRAKE, J.; COLES, B.A. et al. Is intestinal absorption capacity rate-limiting for performance in poultry. **Journal of Applied Poultry Research**, v.8, n.2, p.242-252, 1999.
- DROR Y, NIR I, NITSAN Z. The relative growth of internal organs in light and heavy breeders. **British Poultry Science**, v.18, p.493-496, 1977.
- GARCIA, R. G.; MENDES, A. A.; ANDRADE, C.; PAZ, I. C. L. A.; TAKAHASHI, S. E.; PELÍCIA, K.; KOMIYAMA, C. M.; QUINTEIRO, R. R. Avaliação do desempenho e de parâmetros gastrintestinais de frangos de corte alimentados com dietas formuladas com sorgo alto tanino e baixo tanino. **Ciências Agrotécnicas**, v.29, n.6, p.1248-1257, 2005.
- GONZÁLES, E., LEANDRO, N.S.M., VAROLI JR, J.C., TAKITA, T.S., LODDI, M.M. O tempo de jejum do neonato e a restrição alimentar precoce influenciando a produtividade de frangos de corte na idade de abate. **Revista Brasileira de Ciência Avícola** v.4, n.2, 2000.
- KROGDAHL, A. Digestion and absorption of lipids in poultry. **Journal of Nutrition**, v.115, n.5, p. 675-685, 1985.
- MAIORKA, A., MACARI, M., FURLAN, R.L., GONZALES, E. Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte. FUNEP/UNESP, Jaboticabal, São Paulo, 2002. 113-123p.
- MARTINS et al. Silagem de grãos úmidos de milho na alimentação de frangos de corte: peso dos órgãos e morfometria intestinal. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLA, 2000, Campinas. **Anais...** Campinas: FACTA, 2000. p. 49.
- MORAN Jr., E. T. Digestion and absorption of carbohydrates in fowl and events through perinatal development. **Journal of Nutrition**, v.115, n.5., p.665-671, 1985.
- NIR I, NITSAN Z, MAHAGNA M. Comparative growth and development of the digestive organs and of some enzymes in broiler and egg type chicks after hatching. **British Poultry Science**, v.34, p.523-532, 1993.
- NIR, I. Mecanismos de digestão e absorção de nutrientes durante a primeira semana. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLA, Campinas, 1998. **Anais...** Campinas, 1998. p.81-91
- NITSAN Z., BEN-AVRAHAM G., ZOREF Z., NIR I. Growth and development of the digestive organs and some enzymes in broiler chicks after hatching. **British Poultry Science**, v.32, p.515-523, 1991.
- NOY Y., SKLAN D. Yolk utilisation in the new-hatched chick. **British Poultry Science**, v.39, 446-451, 1998.
- NOY, Y. and SKLAN, D. Posthatch development in poultry. **Journal Applied Poultry Research**, v.6, n.3, p.344-354, 1997.
- NYVACHOTI, C. M.; ATKINSON, J. L. The effect of feeding high-tanning sorghum on digestive organ response and overall performance of broiler chicks. **Poultry Science**, v.74, Supplement 1, p.125, 1995.

PENZ Jr., A.M.; VIEIRA, S.L. Nutrição na primeira semana. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1998, Campinas. **Anais...** Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, 1998. p.121-139.

ROCHA, P. T., STRINGHINI, J. H., ANDRADE, M. A. et al. Desempenho de frangos de corte alimentados com rações pré-iniciais contendo diferentes níveis de proteína bruta e energia metabolizável. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.1, p.162-170, 2003.

STRINGHINI, J. H., ANDRADE, M. L., ROSA, R. M., ANDRADE, M. A., LEANDRO, N. S. M., CAFÉ, M. B., GONZALES, E. Nível de proteína bruta e balanço de aminoácidos essenciais da ração pré-inicial (1 a 7 dias) de pintos de corte. **Ciência Animal Brasileira**, v.3, n.1. p.21-30, 2002.

STRINGHINI, J. H., RESENDE, A. D., CAFÉ, M. B., LEANDRO, N. S. M., ANDRADE, M. A. Efeito do Peso Inicial dos Pintos e do Período da Dieta Pré-Inicial sobre o Desempenho de Frangos de Corte. **Revista Brasileira de Zootecnia.**, v.32, n.2, p.353-360, 2003.

WYATT, C.L., WEAVER JR, W.D., BEANE, W.L. Influence of egg size, eggshell quality and posthatch holding time on broiler performance. **Poultry Science**, v.64, p.2049-55, 1985.

CAPÍTULO 6

PERFIL BIOQUÍMICO DO FÍGADO E DO PÂNCREAS DE FRANGOS DE CORTE ALIMENTADOS COM DIETA CONTENDO α -AMILASE

1. INTRODUÇÃO

Compondo as estruturas do sistema digestório estão às glândulas anexas: o fígado e o pâncreas. O fígado é uma das maiores glândulas do corpo, sendo caracterizado pela multiplicidade de funções complexas (DELLMAN & BROWN, 1982). Segundo HARPER (1994), as funções hepáticas podem ser classificadas em cinco grupos principais: circulatórias, excretoras, metabólicas, de proteção e desintoxicação e hematológicas. As funções metabólicas no fígado, de acordo com GUYTON (1991), estão caracterizadas pelo conjunto de células hepáticas que se constituem em grande reservatório que reage quimicamente e possui elevado metabolismo, compartilhando substratos e energia de um sistema metabólico para outro, processando e sintetizando múltiplas substâncias que são transportadas para outras áreas do organismo e desempenhando inúmeras outras funções metabólicas.

No metabolismo das proteínas, o fígado destaca sua capacidade de sintetizar certos aminoácidos, bem como outros compostos nitrogenados, a partir de aminoácidos. Todos os aminoácidos não-essenciais podem ser sintetizados no fígado. Todavia, precisa da formação inicial do α -cetoácido e um grupamento amino é transferido por transaminação de um aminoácido disponível para o α -cetoácido, ocupando o lugar do oxigênio ceto (GUYTON, 1991).

No metabolismo de gorduras, o fígado desempenha papel fundamental e também de transporte. O fígado executa no metabolismo lipídico as seguintes funções principais: facilita a digestão e absorção dos lipídios pela produção da bile, que contém colesterol e sais biliares sintetizados no órgão; tem sistemas enzimáticos para sintetizar e oxidar ácidos graxos, triacilgliceróis, fosfolipídios e colesterol; sintetizar e secretar lipoproteínas plasmáticas; converte excesso de ácidos graxos a corpos cetônicos e desempenha papel essencial no metabolismo das lipoproteínas plasmáticas (HARPER, 1994). GUYTON (1991) cita as principais funções do fígado no metabolismo dos lipídios: degradação dos ácidos graxos em pequenos compostos passíveis de serem utilizados como fonte energética; síntese de

triglicerídeos, principalmente a partir de carboidratos, e em menor grau, a partir de proteínas e por último a síntese de outros lipídios a partir de ácidos graxos, sobretudo colesterol e fosfolipídios.

O fígado sintetiza grande parte das substâncias sangüíneas usadas no processo da coagulação. Entre estas encontram fibrinogênio, protrombina, globulina aceleradora e fator VII. A vitamina K é necessária nos processos metabólicos do fígado para formação da protrombina e dos fatores VII, IX e X. Na ausência da vitamina K, as concentrações destas substâncias caem acentuadamente e, praticamente, impede a coagulação do sangue (GUYTON, 1991).

NUNES (1998) aponta uma diferença funcional entre aves e mamíferos no metabolismo de lipídeos: em aves o sistema porta é a única via para todos os lipídeos e substâncias afins. A absorção dos lipídeos ocorre, principalmente, mediante sua incorporação nas micelas. Entretanto como o sítio de absorção dos ácidos graxos é diferente do sítio de absorção dos sais biliares, é provável que ocorra destruição da estrutura micelar antes da absorção. Nas aves, além do mecanismo de formação de micelas há outro mediado pela formação do complexo ácido graxo-proteína carreadora e independente da bile.

BACILA (2003) cita que em aves ocorre uma anormalidade metabólica hepática, denominada fígado gordo, com síndrome renal, para a qual são susceptíveis pintos de 5 a 7 semanas, bem como galinhas poedeiras obesas. Essa anormalidade metabólica hepática das aves domésticas é atribuída a dietas de grande teor energético ou à constituição genética da ave.

Ocorre, ainda, a anormalidade funcional do fígado citada por HARPER (1994) como fígado gordo (esteatose hepática). O fígado gordo é o desequilíbrio na velocidade de formação e liberação dos triacilgliceróis podendo se acumular no fígado. O acúmulo exagerado é considerado como condição patológica e quando este acúmulo se torna crônico, ocorrem alterações fibróticas nas células que progridem até cirrose e conseqüente disfunção hepática. O fígado gordo é enquadrado em duas categorias principais: a primeira está associada com níveis elevados de ácidos graxos livres plasmáticos resultantes da mobilização de gordura do tecido adiposo, ou da hidrólise dos triacilgliceróis das lipoproteínas, ou dos quilomícrons pela lipoproteína lipase nos tecidos extra-hepáticos; o segundo tipo de fígado gorduroso é, usualmente, devido ao bloqueio metabólico na produção de lipoproteínas plasmáticas, permitindo, assim, acumular triacilgliceróis.

SOMMERCORN & SWICK (1981) constataram em trabalho com células hepáticas de ratos, inibição da degradação de proteínas em função do nível de aminoácidos, demonstrando

que a velocidade desta degradação foi diminuída ou aumentada de acordo com a presença ou não de níveis adequados de aminoácidos.

O pâncreas é um órgão composto que tem funções endócrinas (secreções liberadas no sistema circulatório) e exócrinas (secreções liberadas dentro do sistema de ductos). A função endócrina responde pela síntese de insulina e glucagon (essenciais para o controle do metabolismo intermediário dos carboidratos) e a exócrina pela síntese de sais e enzimas digestivas (amilase, lipase, colipase) que constituem o suco pancreático (MACARI et al., 2002).

O suco pancreático é levado ao duodeno por dois ou três ductos (BRADLEY & GRAHAME, 1960) Ele possui pH básico e contém, mais especificamente, sais (Na^+ , Mg^{++} , HPO_4^- , HCO_3^- , bicarbonato de sódio) e várias enzimas digestivas que hidrolisam carboidratos, proteínas, lipídios, ácidos nucléicos, etc. (amilase, lipase, tripsina, nucleases, collagenases) ou pode atuar como cofatores (colipase, etc).

Para evitar a autodigestão das células, as enzimas pancreáticas proteolíticas e lipolíticas são secretadas na forma de precursores enzimáticos, podendo ser ativadas, posteriormente, no lúmen intestinal, por enzimas produzidas por células enteroendócrinas ou pela própria forma da enzima (MACARI et al., 2002).

A regulação da secreção exócrina do fígado e do pâncreas também é mediada pelo sistema nervoso autônomo, o qual inerva a musculatura lisa da vesícula biliar e ductos.

BACILA (2003) ressalta a importância das proteínas tissulares que ocupam posição central e dominante no metabolismo protéico, devido à sua íntima relação com o metabolismo hepático e às interações com outros tecidos por todo o corpo.

Segundo MAYNARD (1984), a transaminação é a reação de aminoácidos que ocorre na mitocôndria e no citosol das células do organismo. Possibilita o intercâmbio da amônia de um aminoácido para um α -cetoácido. A transaminase mais importante inclui o ácido glutâmico e ácidos α -cetoglutáricos, porém, a aspártico-oxaloacético transaminase é também significativa. A reação é reversível e exige vitamina B₆ como cofator e serve para promover os seguintes eventos: aminoácidos em excesso (essenciais) podem ser liberados de suas amônias para glutâmico e α -cetoácidos metabolizados no ciclo do ácido tricarboxílico para energia, aminoácidos dispensáveis podem ser sintetizados a partir de ácido glutâmico e de intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico. Dos aminoácidos essenciais, apenas lisina e treonina não participam da transaminação, pois seus α -cetoácidos não são utilizados para síntese de aminoácidos essenciais.

As aves possuem capacidade para transaminar aminoácidos. A alanina aminotransferase é muito ativa na mucosa intestinal tanto de pássaros como de suínos uma vez que podem usar ácido glutâmico para a maioria das necessidades do nitrogênio amino necessário para síntese de aminoácidos dispensáveis, o que não ocorre em outras espécies (BAKER, 1991).

Estas enzimas, também chamadas aspartato transaminase (GOT ou AST – EC 2.6.1.1) e alanina transaminase (GPT ou ALT – EC 2.6.1.2), localizam-se 70% no citosol e 30% na mitocôndria do hepatócito (NELSON & COX, 2003).

HARPER (1994) afirma que o tecido hepático é rico em ambas as transaminases, mas contém mais GPT do que GOT. Estas enzimas estão envolvidas no metabolismo de aminoácidos e carboidratos e se apresentam em alta concentração nos músculos, fígado e cérebro.

Em estudo feito por LEE & REAPER (1972) sobre a glutamato-oxaloacetato transaminase no fígado de frangos, foi observado que a presença de L-Glu na dieta estimulava as atividades transaminases e inibia as desidrogenases.

Contrapondo-se sobre este efeito, MORAES (1980) não encontrou efeito significativo de 5 a 15% de L-Glu sobre a GOT total no fígado de pintos de corte. MORAES (1998) não encontrou diferença significativa para a atividade de GOT no fígado de pintos de corte com 14 dias de idade, alimentados com dietas purificadas e suplementadas com 5,0; 7,5; 10,0; 12,5 e 15% de L-Glu. GUIMARÃES et al. (1996) observaram que a suplementação de L-alanina na dieta, aumentou a atividade da glutamato-oxaloacetato transaminase no fígado sugerindo melhor utilização do ácido L-glutâmico como fonte de nitrogênio não específico.

A fosfatase alcalina é encontrada nas seguintes partes do organismo vivo: fígado, ossos, rins, intestinos e placenta. Conforme HARPER (1994), a fosfatase alcalina é uma enzima que liberta o fosfato dos ésteres fosfóricos orgânicos e pode produzir o fosfato inorgânico que, então, reage com o cálcio para formar fosfato de cálcio insolúvel. A fosfatase não é encontrada na matriz, é somente encontrada nos osteoblastos do osso em crescimento. A fosfatase alcalina é um indicativo do remodelamento ósseo, uma vez que os osteoblastos são as maiores fontes desta enzima, sendo não só da fosfatase alcalina como também da fosfatase ácida (HARPER, 1994).

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

sanguíneo dessa enzima constitui, em geral, um bom indicador da velocidade de formação óssea (GUYTON, 1991).

Portanto, quando se aumenta a atividade osteoblástica que é estimulada pelo estresse causado sobre o esqueleto enfraquecido, podem-se ter alterações na concentração fosfatase alcalina. São encontrados altos níveis de fosfatase alcalina na cura do raquitismo, no hiperparatireoidismo, no sarcoma osteoblástico e em outras condições de regeneração óssea rápida, HARPER (1994).

A aplicação da enzima α -amilase em dietas para aves de corte tem contribuído para melhoria da eficiência alimentar e da produtividade das aves, principalmente na fase pós eclosão. Em aves, a análise do fígado e pâncreas é um bom indicativo para se verificar alterações em seus sistemas fisiológicos.

Neste trabalho avaliou-se o efeito da adição da α -amilase em dietas para frangos de corte sobre os parâmetros da amilase do pâncreas e do teor protéico e enzimático do fígado.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Procedimentos gerais

A produção enzimática foi realizada no Laboratório de Enzimologia do Instituto de Ciências Biológicas (UFG) e no Centro de Biotecnologia (UFRGS). O experimento com frangos de corte foi realizado na Escola de Veterinária (UFG), nas dependências do setor de Avicultura do Departamento de Produção Animal.

Foram utilizados 360 pintos da linhagem Cobb, machos, de um dia de idade. Para condução dos ensaios, foram utilizadas três baterias de aço galvanizado com cinco andares e divisões com 0,80 x 0,75 x 0,25 m (comprimento x largura x altura) cada. Estas baterias foram instaladas em galpão de alvenaria com 12,96 x 2,96 m (38,36 m²) de dimensões internas, cumeeira com orientação norte-sul, pé-direito de 2,32 m, sem lanternim, coberto com telhas francesas. O galpão é rodeado por mureta de concreto com 0,46 m e tela de arame até o telhado com altura de 1,70 m, protegido na parte externa por cortina de ráfia e sistema com catracas para sua movimentação.

Antes da chegada do lote foram obedecidas as normas, tanto para o galpão quanto para as baterias, de limpeza e desinfecção das instalações (telas, cortinas, piso, área externa e

equipamentos) com duração de sete dias, sendo dois para limpeza e cinco para vazio sanitário com pulverização de desinfetante a base de amônia quaternária e glutaraldeído.

O aquecimento de cada andar das baterias foi realizado com lâmpadas incandescentes de 60 W, a iluminação foi constante, sendo natural e artificial. Os comedouros e bebedouros foram do tipo calha, sendo limpos e abastecidos duas vezes ao dia. O aquecimento interno foi monitorado diariamente com termômetro de máxima e mínima e umidiostato, sendo associado ao manejo das cortinas para manter a temperatura interna do galpão adequada às aves.

Foram conduzidos, no período de outubro a novembro de 2006, dois experimentos do 1^o ao 21^o e do 8^o ao 21^o dias de idade sendo o primeiro para avaliar a adição da enzima na primeira semana (sete dias) e o segundo para avaliação da enzima aos de 8 a 21 dias, em delineamento inteiramente, sendo três com rações pré-iniciais e três com rações iniciais, as rações foram formuladas segundo recomendações de ROSTAGNO et al. (2005). As rações pré-iniciais e iniciais são apresentadas na Tabela 1. Os tratamentos utilizados foram: dieta com ração pré-inicial sem enzima (RPI), dieta com ração pré-inicial com enzima de *Cryptococcus* (RPICry), dieta com ração pré-inicial com enzima de *Aspergillus* (RPIAsp), dieta com ração inicial sem enzima (RI), dieta com ração inicial com enzima de *Cryptococcus* (RICry) e dieta com ração inicial com enzima de *Aspergillus* (RIAsp). A ração e água foram oferecidos *ad libitum*.

Um animal de cada tratamento foi sacrificado e, a seguir, fígado e pâncreas foram removidos, acondicionados em recipientes devidamente identificados e rapidamente congelados, usando-se nitrogênio líquido, com o intuito de cessar a atividade enzimática, e posterior armazenamento em sob congelamento. Este material foi homogeneizado (1g de tecido e 9mL de água) e depois centrifugado a 8000rpm a 4^oC por 10 minutos. Coletou-se o sobrenadante para a determinação, em triplicata, da amilase no pâncreas e teor protéico e atividade enzimática das enzimas fosfatase alcalina e transaminases por kits comerciais da DOLES. Todos os procedimentos foram feitos em banho de gelo água destilada para evitar a perda da atividade enzimática.

Tabela 1. Composição percentual e nutricional das rações experimentais pré-inicial (1 a 7 dias) e inicial (8 a 21 dias), na matéria natural

Ingredientes (kg)	Ração pré-inicial	Ração inicial
Milho	58,954	60,210
Farelo de soja	34,877	33,954
Óleo vegetal	1,690	1,766
Fosfato bicálcico	1,905	1,826
Calcário	0,924	0,890
Sal	0,447	0,429
L-Lisina.HCl (%)	0,353	0,191
DL-Metionina99(%)	0,351	0,234
Premix mineral/vitamínico ¹	0,500	0,500
Composição Química		
Energia metabolizável (kcal/kg)	2.950	3.000
Proteína (%)	22,000	20,790
Triptofano (%)	0,293	0,276
Lisina (%)	1,466	1,263
Metionina + cistina (%)	1,041	0,897
Metionina (%)	0,684	0,554
Treonina (%)	0,850	0,809
Sódio (%)	0,223	0,214
Cálcio (%)	0,939	0,884
Fósforo disponível (%)	0,470	0,442

¹Suplemento mineral e vitamínico. Micromim Aves (suplemento mineral em mg): Manganês 150.000, Zinco 100.000, Ferro 100.000, Cobre 16.000, Cloreto de Colina 60.000 e Iodo 1.500. Premix Inicial (Suplemento vitamínico): Vitamina A 8.000.000 UI, Vitamina D₃ 2.000.000 UI, Vitamina E 15.000 UI, Vitamina K 1.800mg, Vitamina B₁ 1.800 mg, Vitamina B₂ 6.000 mg, Vitamina B₆ 2.800 mg, Vitamina B₁₂ 12.000 mg, Niacina 40.000 mg, Ácido Fólico 1.000 mg, Ácido Pantotênico 15.000 mg, Biotina 60 mg, Selênio 300 mg, Antioxidante 30 g.

2.2. Análise estatística

A análise estatística dos dados foi feita utilizando-se o programa SAEG 9.5 (UFV, 2007) e na ocorrência de efeito significativo, utilizou-se o teste de Tukey com 10% de probabilidade para peso absoluto e 5% para perfil bioquímico do fígado e do pâncreas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A suplementação do extrato contendo α -amilase nas rações influenciou o peso absoluto do pâncreas aos sete dias e aos 21 dias de idade. O peso absoluto do fígado foi influenciado somente quando a suplementação ocorreu na fase inicial (Tabela 2). Valores

maiores do peso do pâncreas aos sete (0,776 g) e aos 21 dias (2,778 g) foram observados nas rações isenta de enzima. O fígado aos sete dias apresentou média de 6,899 g e aos 21 apresentou valor maior nas rações isenta de enzima (26,784 g). Devido a essa diferenciação de valores que poderá estar alterando o metabolismo animal, foi estudado o perfil bioquímico do pâncreas e do fígado.

Tabela 2. Peso absoluto do pâncreas e do fígado de frangos de corte aos sete e 21 dias de idade alimentados com dieta suplementada com amilase nas fases pré-inicial e inicial

Parâmetros	Fase pré-Inicial				Valor P	CV (%)
	7 dias	RPI	RPI _{Cry}	RPI _{Asp}		
Pâncreas (g)	0,776 ^a	0,686 ^b	0,626 ^b	0,00036	5,976	
Fígado (g)	6,798	6,968	6,932	>0,05	8,95	
21 dias	Fase Inicial*				Valor P	CV (%)
	RI	RI _{Cry}	RI _{Asp}			
Pâncreas (g)	2,778 ^a	2,254 ^b	2,020 ^b	0,00002	6,70	
Fígado (g)	26,784 ^a	21,270 ^b	21,716 ^b	0,01306	4,58	

^{ab/}Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna são diferentes pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade.

*(RPI) ração pré-inicial, (RPI_{Cry}) ração pré-inicial com α -amilase de *Cryptococcus flavus*, (RPI_{Asp}) ração pré-inicial com α -amilase de *Aspergillus niger* HM2003, (RI) ração inicial, (RI_{Cry}) ração inicial com α -amilase de *Cryptococcus flavus*, (RI_{Asp}) ração inicial com α -amilase de *Aspergillus niger* HM2003.

O perfil bioquímico do pâncreas e do fígado são apresentados nas Tabelas 3 e 4. Analisando o perfil bioquímico da α -amilase pancreática, observou-se que valores superiores estatisticamente foram encontrados tanto aos sete dias de idade (774,83 UI/L) como aos 21 dias (655,17 UI/L). Este fato pode estar correlacionado com o tamanho do pâncreas, uma vez que foram encontrados valores absolutos maiores em aves que receberam rações sem amilase. A α -amilase de *Cryptococcus flavus* e a *Aspergillus niger* HM2003, diminuíram o peso absoluto do pâncreas e conseqüentemente a atividade da amilase pancreática.

Para LIMA et al. (2002) a atividade da α -amilase pancreática foi determinada a 37°C (BERNFELD, 1955), pela dosagem da maltose liberada, a partir da hidrólise do amido (substrato), pela enzima presente no extrato pancreático. Os resultados desse experimento evidenciaram que o uso de enzima ou probiótico em rações de frangos de corte não tem efeito persistente na atividade das enzimas pancreáticas, não interferindo diretamente na produção das mesmas.

Tabela 3. Atividades da enzima amilase no pâncreas de frangos de corte aos sete e 21 dias de idade alimentados com dieta suplementada com amilase nas fases pré-inicial e inicial

Dias	Rações*	Amilase (UI/dL)
7	RPI	774.83a
	RPIcCry	733.79b
	RPIAsp	734.83b
	P (%)	0.00237
	CV (%)	2.167
21	RI	655.17a
	RIcCry	542.41b
	RIAsp	539.31b
	P (%)	0.00019
	CV (%)	5.85

^{ab}Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna são diferentes pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade.

*(RPI) ração pré-inicial, (RPIcCry) ração pré-inicial com α -amilase de *Cryptococcus flavus*, (RPIAsp) ração pré-inicial com α -amilase de *Aspergillus niger* HM2003, (RI) ração inicial, (RIcCry) ração inicial com α -amilase de *Cryptococcus flavus*, (RIAsp) ração inicial com α -amilase de *Aspergillus niger* HM2003.

Tabela 4. Concentração de proteína (Prot) e atividade das enzimas fosfatase alcalina (FA), glutamato-oxaloacetato transaminase (GOT) e glutamato-piruvato transaminase (GPT) no fígado de frangos de corte aos sete e 21 dias de idade alimentados com dieta suplementada com amilase nas fases pré-inicial e inicial

Dias	Rações*	Fase pré-Inicial			
		Prot (g/dL)	FA (UI/L)	GOT (UI/L)	GPT (UI/L)
7	RPI	1,78	247,36 ^b	229,11	70,67
	RPIcCry	1,94	274,70 ^{ab}	226,89	72,21
	RPIAsp	1,67	314,41 ^a	232,71	72,60
	P (%)	0,05745	0,00422	>0,05	>0,05
	CV (%)	8,79	9,94	9,84	9,05
		Fase Inicial			
Dias	Rações	Prot (g/dL)	FA (UI/L)	GOT (UI/L)	GPT (UI/L)
21	RI	1,51	235,98	195,92	59,22
	RIcCry	1,35	282,99	192,53	63,68
	RIAsp	1,36	266,35	211,00	68,59
	P (%)	0,17213	0,08333	0,19068	0,07827
	CV (%)	9,87	11,61	7,96	9,21

^{ab}Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna são diferentes pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade.

*(RPI) ração pré-inicial, (RPIcCry) ração pré-inicial com α -amilase de *Cryptococcus flavus*, (RPIAsp) ração pré-inicial com α -amilase de *Aspergillus niger* HM2003, (RI) ração inicial, (RIcCry) ração inicial com α -amilase de *Cryptococcus flavus*, (RIAsp) ração inicial com α -amilase de *Aspergillus niger* HM2003.

Resultados contrários aos autores acima foram encontrados, pois houve diferença na atividade enzimática de amilase tanto aos sete quanto aos 21 dias de idade no pâncreas. A

metodologia usada também foi diferente, pois se utilizou kits comerciais para análise do sobrenadante do triturado.

Depois dos primeiros dias, a atividade de amilase aumenta significativamente ($p < 0,05$) para um nível máximo e depois sua atividade fica reduzida (OSMAN & TANIOS, 1983). DUNNINGTON & SIEGEL (1995) verificaram que a atividade relativa de amilase em frangos selecionados para alto/baixo peso vivo aos 42 dias de idade teve uma queda no período de 6-8 dias, um pico aos 10 dias e depois caiu até 15 dias de idade.

A atividade específica de amilase pancreática de frangos de corte do nascimento até aos 20 dias segundo NITSAN et al. (1991) diminuiu durante os 3-6 primeiros dias após nascimento e aumentou cerca de 10-20% aos 11 dias de idade.

LIMA et al. (2002) evidenciaram que o uso de enzima ou probiótico em rações de frangos de corte não apresenta efeito persistente na atividade das enzimas pancreáticas, não interferindo diretamente na produção das mesmas. Já a temperatura de criação das aves parece interferir de forma aleatória na atividade das enzimas, quando do uso de aditivos na dieta. Com o aumento da idade, o estresse calórico causou diminuição significativa na produção e secreção de amilase pancreática, sendo esse efeito mais evidente no período final de criação.

O crescimento alométrico do pâncreas acompanha a curva de crescimento do frango, porém sua taxa de crescimento é maior nas primeiras semanas de idade das aves, uma vez que nessa fase ocorre a maturação fisiológica de seus órgãos digestivos, essencial na produção e liberação dos zimogênios das enzimas digestivas (MORAN JR., 1985). SAKOMURA et al. (2004), analisando a atividade da amilase, observaram um efeito linear com o avanço da idade da ave. Proporcionalmente, a fase de maior atividade da amilase foi entre a 1^a e a 2^a semanas de idade, quando valores médios aumentaram em 2,3 vezes. Estes resultados podem ser associados ao crescimento alométrico do pâncreas, que teve crescimento máximo nas duas primeiras semanas de idade. Entretanto, NITSAN et al. (1991) e NIR et al. (1993) observaram diminuição na atividade da amilase nas duas primeiras semanas de idade das aves. Este comportamento foi atribuído ao fato de que, nos primeiros dias de vida da ave, a absorção de nutrientes do saco vitelino pode interferir na produção enzimática (NITSAN et al., 1991). Deve-se considerar, que a presença e concentração do substrato dos alimentos, associadas à maturação dos órgãos digestivos, conforme a idade das aves são fatores que podem interferir na atividade das enzimas pancreáticas (MORAN JR., 1985; NITSAN et al, 1991; SELL et al., 1991). A atividade da amilase – uma enzima indutiva – depende da presença do substrato (RODWELL, 1990).

No fígado aos sete dias de idade não se obteve diferença estatística para concentração de proteína (1,80 g/dL de média), para as transaminases GOT (229,57 UI/L) e GPT (71,82 UI/L). O único parâmetro que apresentou diferença estatística foi a fosfatase alcalina aos sete dias de idade. O menor valor de atividade foi apresentado na ração com ausência da enzima α -amilase. Essa diferença pode ser atribuída a várias correlações metabólicas desde secreção pelos osteoblastos ou a algum fator hepático. Talvez a ação da enzima (extrato bruto) aplicado esteja ajudando na liberação de fósforo e para manter a homeostase, a atividade da fosfatase alcalina esteja aumentada, tentando também manter o equilíbrio da relação Ca:P, nas aves. Esta relação é de extrema importância para o equilíbrio do crescimento ósseo em aves. Outros parâmetros não apresentaram diferença significativa para a dieta aplicada implicando que não há nenhum dano hepático com a presença das enzimas nas rações.

Aos 21 de idade não houve diferença estatística para nenhum dos parâmetros avaliados. As médias são de 1,41 g/dL para concentração de proteína, 261,77 UI/L para fosfatase alcalina e para as transaminases de 199,82 UI/L para a GOT e 63,83 UI/L para a GPT.

4. CONCLUSÃO

A presença da enzima α -amilase de *Cryptococcus flavus* e *Aspergillus niger* HM2003 em rações para frangos de corte altera o metabolismo do pâncreas e do fígado. A atividade da enzima amilase no pâncreas diminuiu 5,23% aos sete dias para fase pré-inicial e 17,45% aos 21 dias para fase inicial. No fígado, aos sete e 21 dias, para fases pré-inicial e inicial, os valores não foram significativos para: concentração de proteína (1,80 e 1,41 g/dL), glutamato-oxaloacetato transaminase (229,57 e 199,82 UI/L) e glutamato-piruvato transaminase (71,82 e 63,83 UI/L). A atividade da fosfatase alcalina foi significativa aos sete dias, com menor valor na ração sem suplementação amilase (227,36 UI/L), e aos 21 dias não houve diferença significativa (261,77 UI/L).

5. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

BACILA, M. **Bioquímica veterinária**. São Paulo, 2nd ed. Robe, 2003. 583p.

BAKER, B. H. Parpioning off nutrients growth and others metabolic functions: efficiency and prorithy considerations. **Poultry Science**, v.70, p.1797-1805, 1991.

- DELLMANN, H.D. & BROWN, E.M. **Histologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1982. p.204.
- DUNNINGTON, E.A., SIEGEL, P.B. Enzyme activity and organ development in newly hatched chicks selected for high or low eight-week body weight. **Poultry Science**, v.74, p.761-70, 1995.
- GUYTON, A.C. **Tratado de Fisiologia Médica**. 8^o Edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A.,1991. 864p.
- HARPER, H.A. **Manual de Química Fisiológica**, 7^o Edição, São Paulo: Atheneu Editora, 1994. 763p.
- LEE, D. J. & REAPER, I. Effect of dietary glutamic acid on the changes with age in the liver levels of glutamic dehydrogenase, aspartic transaminase and alanine transaminase of chicks (*Gallus domesticus*) **Int. J. Biochem.**, v.3, p.73-77, 1972.
- LIMA, A.C.F., MACARI, M., PIZAURO JÚNIOR, J.M., MALHEIROS, E.B. 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.
- MACARI, M.; FURLAN, R.L.; GONZALES, E. **Fisiologia Aviária Aplicada a Frangos de Corte**, 1^a edição. Jaboticabal: Editora Funep, 2002. 375 p.
- MAYNARD, L. A. et alii. **Nutrição Animal** 3^o Ed, Traduzido por FIGUEIREDO, F.A.B.N. Rio de Janeiro: Editora Freitas de Barros, 1984. 518p.
- MORAES, G. H. K. de, Effects of dietary levels of L-glutamic acid in the activities of chicks liver glutamate–oxaloacetate transaminase and glutamate-dehydrogenase. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, XXVII, Caxambu, MG, 1998. **Anais...**São Paulo:SBBq, 1998 p.28.
- MORAES, G. H. K. de, Studies on non- specific nitrogen and D-amino acid metabolism in the chick. West Lafayette: Purdue University, 1980. 117 p. Tese (Doutorado em Bioquímica Animal) – Purdue University, 1980.
- MORAN JR., E.T. Digestion and absorption of carbohydrates in fowl and the events through perinatal development. **Journal Nutrition**, v.115, n.5, p.665-674, 1985.
- NELSON, D. L. & COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 3^oed, Sarvier, 2003.
- NIR, I. Mecanismos de digestão e absorção de nutrientes durante a primeira semana. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLA, Campinas, 1998. **Anais...** Campinas: Apinco, 1998. p.81-91.
- NIR, I. & NITSAN, Z. Metabolic and anatomical adaptations of light-bodied chicks to intermitent feeding. **British Poultry Science**, v.20, p.61-72, 1979.
- NIR, I., NITSAN, Z., MAHAGNA, M. Comparative growth and development of the digestive organs and of some enzymes in broiler and egg type chicks after hatching. **British Poultry Science**, v.34, p.523-532, 1993.
- NITSAN, Z., BEM-AVRAHAM, G., ZOREF, Z., NIR, I. Growth and development of the digestive organs and some enzymes after hatching in broiler chickens. **British Poultry Science**, v.32, p.515-23, 1991.
- NITSAN, Z.; DROR, Y.; SHAPIRA, N. The effect of forcefeeding on enzymes of liver, kidney, pancreas and digestive tract of chicks. **British Journal Nutrition**, v.32, p.241-271, 1974.

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

NUNES, I. J. **Nutrição animal básica**. 2^a ed. Belo Horizonte: Editora Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia (UFMG), 1998. p.86 e 142.

OSMAN, A.M. & TANIOS, N.I. The effect of heat on the intestinal and pancreatic levels of amylase and maltase of laying hens and broilers. **Comparative Biochemistry Physiology**, v.75a, n.4, p.563-7, 1983.

RODWELL, V.M. Enzimas: regulação da atividade. In: HARPER, H.A. (Ed.) *Bioquímica*. São Paulo: Ateneu, 1990. p.84-94.

ROSTAGNO, H.S., ALBINO, L.F.T, DONZELE, J.L. **Composição de alimentos e exigências nutricionais**. Tabelas brasileiras para aves e suínos; 2^a ed. Viçosa: Editora UFV, 2005. 186p.

SAKOMURA, N.K., DEL BIANCHI, M., PIZAURO JR., J.M. et al. Efeito da idade dos frangos de corte na atividade enzimática e digestibilidade dos nutrientes do farelo de soja e da soja integral. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.4, p.924-935, 2004.

SOMMERCORN, J.M. & SWICK, R.W. Protein degradation in primary monolayer cultures of rats hepatocytes. Further evidences for the regulation of proteins degradation by amino acids. **Journal of Biological Chemistry**, v.256, n.101, p.4816-4836, 1981.

CAPÍTULO 7

PERFIL BIOQUÍMICO DO SORO DE FRANGOS DE CORTE ALIMENTADOS COM DIETA SUPLEMENTADA COM α -AMILASE

1. INTRODUÇÃO

Em aves, a análise do soro é um bom indicativo para se verificar alterações em seus sistemas fisiológicos (GAW et al., 2001). Análises sangüíneas podem ser realizadas a partir de sangue total, no entanto, o soro e o plasma são amostras preferenciais para a maioria das mensurações (MOTTA, 2003). O soro é o líquido que se separa da parte sólida resultante da coagulação do plasma ou do sangue (VIEIRA, 1995).

CARDOSO e TESSARI (2003) mencionam que a idade das aves, condições ambientais e diferentes regiões ou países são fatores que podem afetar o estudo dos parâmetros hematológicos. Afirmam, ainda, que mesmo com o crescimento da atividade avícola, ocorreu grande desenvolvimento de métodos de diagnósticos e de profilaxia das doenças aviárias. Entretanto, aspectos básicos relacionados à fisiologia e às avaliações clínicas e laboratoriais foram pouco estudados.

A análise de diferentes atividades enzimáticas no soro sangüíneo oferece informações valiosas para o diagnóstico de uma série de condições mórbidas (LEHNINGER, 2002). BORSA et al. (2006) afirmaram que variáveis bioquímicas têm sido usadas como auxiliares do diagnóstico das enfermidades nos animais domésticos, contudo, existem poucos trabalhos sobre os níveis de referência dessas variáveis em aves, sendo talvez a causa da não utilização de exames de laboratório na área de patologia aviária. A enzima hepática costumeiramente incluída no perfil de triagem bioquímica sérica é a fosfatase alcalina (FERREIRA NETO et al., 1978; DUNCAN, 1982; MEYER et al., 1995).

A elevação dos níveis sérico-enzimáticos atribuída à disfunção hepática pode ser decorrente da ruptura dos hepatócitos, resultantes de necrose, ou das alterações no processo de colestase da fosfatase alcalina (KANEKO, 1989). O diagnóstico das enfermidades hepáticas em aves, segundo LUMEIJ e WESTERHOF (1987), não é prática muito simples, pois nem sempre se observa correlação entre alterações dos níveis séricos de enzimas hepáticas e a patologia do fígado.

A fosfatase alcalina (EC 3.1.3.1) é um grupo de isoformas de enzimas não-específicas que hidrolisam muitos tipos de ésteres de fosfato em pH alcalino. A fosfatase alcalina está elevada no soro devido à obstrução do duto biliar intra ou extrahepático, que é secundária à necrose do tecido hepático (KANEKO, 1989). Aumentos da atividade da fosfatase alcalina na doença hepática são resultado do aumento da síntese dessa enzima pelas células que revestem os canalículos biliares (GAW et al., 2001). Os osteoblastos secretam quantidade razoável de fosfatase alcalina quando estão depositando ativamente a matriz óssea. Devido à difusão de certa quantidade de fosfatase alcalina no sangue, o nível sanguíneo dessa enzima constitui também, indicador da formação óssea (CHRISTENSON, 1997).

O cálcio está envolvido em vários processos tanto bioquímicos quanto fisiológicos, sendo um importante elemento estrutural do tecido ósseo. Os ossos, embora aparentemente estáticos, são continuamente reconstituídos, ou seja, 20% do seu total de cálcio é renovado anualmente. As principais funções do cálcio no organismo são: ação sobre permeabilidade das membranas celulares; importante na coagulação sanguínea; funciona como ativador de enzimas e da contração muscular; atua sobre a transmissão dos impulsos nervosos e sobre a excitabilidade dos nervos (ALBUQUERQUE, 1988). O balanço de cálcio geralmente reflete o grau de acoplamento do processo de formação e destruição óssea. É importante reconhecer que 99% do cálcio corporal estão no osso, e não há possibilidade de formação óssea sem balanço positivo de cálcio (PERINI, 1992).

O cálcio no plasma encontra-se presente sob três formas diferentes. Cerca de 40% (1 mmol/L) do cálcio estão combinados às proteínas plasmáticas e, nesta forma, não se difundem através da membrana capilar. Outros 10% do cálcio (0,2 mmol/L) difundem-se através da membrana capilar, mas encontram-se combinados com outras substâncias do plasma e dos líquidos intersticiais (por exemplo, citrato e fosfato) sob forma não ionizada. Os 50% restantes de cálcio do plasma são difusíveis através da membrana capilar e ionizado. Por conseguinte, o plasma e os líquidos intersticiais possuem concentração normal de íons cálcio de aproximadamente 1,2 mmol/L ou 2,4 mEq/L, correspondendo a apenas metade da concentração plasmática total de cálcio. Esse cálcio iônico é importante para a maioria das funções do cálcio no organismo incluindo a formação óssea (GUYTON, 1991).

Para GANONG (1967), o cálcio livre está ionizado nos líquidos corporais sendo essencial para coagulação sanguínea, contrações musculares e funções do sistema nervoso. O cálcio ósseo é usado para atender as diferentes necessidades metabólicas de vários tecidos.

A redução da fração ionizada do cálcio sérico causa tetania. Esta pode ser devido ao aumento do pH sanguíneo (tetania alcalótica, tetania gástrica) ou a falta de cálcio oriunda de

absorção intestinal deficiente, diminuição de ingestão na dieta, aumento da excreção renal ou deficiência da paratireóide. O aumento da retenção de fósforo, como ocorre nas doenças tubulares renais, também predispõe os níveis baixos de cálcio no soro (HARPER, 1977).

O fósforo é essencial à estrutura óssea e ao metabolismo, uma vez que apresenta diversas formas estruturais complexas; suas fontes representam grande parcela dos custos da ração e, sendo assim, tem sido objeto de grande número de trabalhos científicos (LIMA, 1995). Dentre as funções do fósforo, destaca-se ser constituinte do DNA e RNA, que por sua vez são constituintes dos fosfolípidios e dos componentes de macromoléculas (LINKSWILLER, 1976).

Aproximadamente 85% do fósforo estão localizados no esqueleto, co-precipitado com cálcio no complexo hidroxiapatita, agindo como reservatório de fósforo para o organismo, o restante é encontrado nos músculos, cérebro e sangue.

Dentre as funções do fósforo destacam-se: formação dos ossos, manutenção das reações biológicas, formação de aminoácidos, transferência da informação gênica, atua como tampão e nos tecidos é importante para suprimento de energia. O fosfato inorgânico encontra-se principalmente sob duas formas no plasma: HPO_4^{-1} e $\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$ (GUYTON, 1991).

O nível elevado de fósforo na dieta dificulta a absorção do cálcio dietético, e nível plasmático também diminui o que induz a liberação do paratormônio, que induz a mobilização do cálcio e do fósforo dos ossos para o plasma sanguíneo, a fim de que se possa manter o equilíbrio homeostático do organismo. Na maioria das vezes, o cálcio e o fósforo ocorrem, no organismo, combinados entre si. No entanto, a carência de um ou de outro na dieta limita o valor nutritivo de ambos (HONMA, 1992).

Segundo MAYNARD et al. (1984), os níveis de fósforo do plasma são mais facilmente cambiáveis por meios dietéticos do que os de cálcio, já que o cálcio não é tão influenciado pela ingestão dietética.

Para SCOTT et al. (1976), o potássio é importante no auxílio à ATPase (proteína transportadora de íons através da membrana celular), atuando juntamente com sódio e magnésio. Os autores verificaram, ainda, que o potássio está relacionado com catabolismo da lisina. O hormônio regulador é responsável também por maior excreção de íon sódio, estimulando a bomba sódio e causando retenção aumentada de íons potássio e hidrogênio.

O papel dos eletrólitos na discondroplasia tibial tem sido estudado e é bem estabelecido que a acidose metabólica, induzida pelo cloreto de amônio ou pelo simples excesso de cloreto em relação ao sódio e potássio, aumenta a incidência de discondroplasia tibial. Desta forma, o balanço eletrolítico (cátion: ânion) então pode influenciar a ocorrência

da discondroplasia tibial. Com a finalidade de manter o equilíbrio ácido-básico, as aves regulam a excreção do sódio, potássio e cloro (MENDONÇA JR., 1990).

O cloro e o magnésio são importantes no metabolismo. Esses nutrientes são prontamente mensuráveis no sangue, e em parte seus níveis refletem sua ingestão dietética (GAW et al., 2001). O cloro é um dos principais eletrólitos do sangue, sendo responsável pelo equilíbrio ácido-básico (McDOWELL, 1992). É o ânion mais abundante do líquido extracelular, e desempenha importante papel na manutenção da distribuição de água no organismo, na pressão osmótica e na neutralidade elétrica (MOTTA, 2003). O cloro auxilia a passagem de nutrientes para dentro das células, particularmente de monossacarídeos e aminoácidos. Assim, níveis baixos desse mineral podem comprometer o metabolismo energético e protéico (LARBIER e LCLERQ, 1992). Parte do magnésio no organismo está associada ao cálcio e ao fósforo, no esqueleto. O restante é encontrado no músculo esquelético e cardíaco, rim, fígado e líquido intersticial. Somente um por cento do magnésio total se encontra no plasma (VIEIRA, 1995) e a concentração normal varia de 2 a 5 mg/dL dependendo da espécie (KANEKO, 1989). O magnésio age como ativador enzimático na maioria dos aspectos da bioquímica intracelular, incluindo a glicólise, o metabolismo oxidativo e o transporte transmembrana de potássio e de cálcio. Cerca de 30% do magnésio da dieta são absorvidos pelo intestino delgado e amplamente distribuídos para todos os tecidos metabolicamente ativos (GAW et al., 2001). A absorção deste mineral pode ser afetada pela quantidade de cálcio, fosfato, proteína, lactose ou álcool presente na dieta (MOTTA, 2003).

As proteínas plasmáticas do sangue são formadas por: albumina, globulinas alfa, beta, gama e fibrinogênio e a maioria são sintetizadas no fígado. Estas fazem parte de 20% do sangue e além de serem nutrientes essenciais para a vida, entre as suas funções, a de manter a pressão osmótica, serem reguladoras do mecanismo ácido-base do sangue, serem transportadoras de hormônios e formarem parte importante das enzimas e imunoglobulinas. É importante medir as proteínas plasmáticas no sangue para detectar processos inflamatórios graves (CHARLES NORIEGA, 2000).

A amilase é uma metaloenzima Ca^{2+} dependente que atua no intestino hidrolisando polímeros de glicose (amido, amilopectina e glicogênio) nas ligações glicosídicas α -1, 4, produzindo maltose e dextrina limite. A alfa-amilase está presente em vários tecidos (glândulas salivares, cérebro, pulmão), mas em maior quantidade no pâncreas e duodeno. Grande parte da amilase sangüínea é removida pela filtração renal e eliminada na urina. Portanto, uma das causas prováveis de hiperamilasemia é a diminuição da filtração glomerular. No entanto, se esta causa for eliminada, amilase tem alta especificidade para lesão

pancreática. A amilase está presente em vários tecidos, mas sua atividade está concentrada em pâncreas e duodeno (KRAMER, 1989).

A amilase sanguínea provém de duas fontes principais: pâncreas e glândulas salivares. Outras fontes potenciais de amilase sérica são os órgãos de reprodução e o fígado.

A amilase é uma hidrolase normalmente secretada pelas células acinares do pâncreas para o ducto pancreático e deste para o duodeno. No intestino, a amilase hidrolisa os carboidratos em seus componentes, os açúcares. Quando ocorre lesão das células acinares como na pancreatite, ou ocorrendo obstrução no fluxo do ducto pancreático como no carcinoma pancreático, a amilase fluirá para o sistema linfático intrapancreático e peritônio e, por drenagem, atingirá os vasos sanguíneos em concentração elevada. A amilase aumentará dentro de 12 a 24 horas após o início da doença, sendo rapidamente clareada pelos rins, atingindo os níveis normais em 48 a 72 horas.

Nos casos de pancreatite persistente, obstrução dos ductos pancreáticos e pseudocisto pancreático, os níveis de amilase no soro estarão persistentemente aumentados. Muito embora a dosagem da amilase seja um teste sensível para diagnóstico de doenças pancreáticas, ela não é específica. Outras doenças não pancreáticas podem elevar os níveis de amilase no soro como na perfuração do intestino, na úlcera péptica penetrante para o pâncreas e na obstrução duodenal.

As patologias que mais comumente apresentam valores altos de amilase são: pancreatite aguda primária, pancreatite crônica recidivante, úlcera péptica perfurada, perfuração de intestino, parotidite (caxumba), cetoacidose diabética, obstrução duodenal, colecistite aguda, gravidez ectópica e insuficiência renal.

Neste trabalho avaliou-se o efeito da suplementação do extrato contendo α -amilase em dietas pré-iniciais e iniciais para frangos de corte sobre os parâmetros sanguíneos: cálcio (Ca), fósforo (P), cloro (Cl), potássio (K), proteína (Prot) e das atividades das enzimas fosfatase alcalina (FA) e amilase (AM).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Procedimentos gerais

A produção enzimática foi realizada no Laboratório de Enzimologia do Instituto de Ciências Biológicas (UFG) e no Centro de Biotecnologia (UFRGS). O experimento com

frangos de corte foi realizado na Escola de Veterinária (UFG), nas dependências do setor de Avicultura do Departamento de Produção Animal.

Foram utilizados 360 pintos da linhagem Cobb, machos, de um dia de idade. Para condução dos ensaios, foram utilizadas três baterias de aço galvanizado com cinco andares e divisões com 0,80 x 0,75 x 0,25 m (comprimento x largura x altura) cada. Estas baterias foram instaladas em galpão de alvenaria com 12,96 x 2,96 m (38,36 m²) de dimensões internas, cumeeira com orientação norte-sul, pé-direito de 2,32 m, sem lanternim, coberto com telhas francesas. O galpão é rodeado por mureta de concreto com 0,46 m e tela de arame até o telhado com altura de 1,70 m, protegido na parte externa por cortina de ráfia e sistema com catracas para sua movimentação.

Antes da chegada do lote foram obedecidas as normas, tanto para o galpão quanto para as baterias, de limpeza e desinfecção das instalações (telas, cortinas, piso, área externa e equipamentos) com duração de sete dias, sendo dois para limpeza e cinco para vazios sanitários com pulverização de desinfetante a base de amônia quaternária e glutaraldeído.

O aquecimento de cada andar das baterias foi realizado com lâmpadas incandescentes de 60 W, a iluminação foi constante, sendo natural e artificial. Os comedouros e bebedouros foram do tipo calha, sendo limpos e abastecidos duas vezes ao dia. O aquecimento interno foi monitorado diariamente com termômetro de máxima e mínima e umidistato, sendo associado ao manejo das cortinas para manter a temperatura interna do galpão adequada às aves.

Foram conduzidos, no período de outubro a novembro de 2006, dois experimentos do 1^o ao 21^o e do 8^o ao 21^o dias de idade sendo o primeiro para avaliar a adição da enzima na primeira semana (sete dias) e o segundo para avaliação da enzima aos de 8 a 21 dias, em delineamento inteiramente, sendo três com rações pré-iniciais e três com rações iniciais, as rações foram formuladas segundo recomendações de ROSTAGNO et al. (2005). As rações pré-iniciais e iniciais são apresentadas na Tabela 1. Os tratamentos utilizados foram: dieta com ração pré-inicial sem enzima (RPI), dieta com ração pré-inicial com enzima de *Cryptococcus* (RPI_{Cry}), dieta com ração pré-inicial com enzima de *Aspergillus* (RPI_{Asp}), dieta com ração inicial sem enzima (RI), dieta com ração inicial com enzima de *Cryptococcus* (RI_{Cry}) e dieta com ração inicial com enzima de *Aspergillus* (RI_{Asp}). A ração e água foram oferecidos *ad libitum*.

Coletou-se o sangue, de uma ave por repetição de cada tratamento, aos sete dias de idade na fase pré-inicial e aos 21 na fase inicial, por punção cardíaca em tubos identificados que foram centrifugados a 6.000 rpm por 10 minutos, para obtenção do soro, no qual se procederam às análises dos minerais cálcio (Ca mg/dL), fósforo (P mmol/L), cloro (Cl

mmol/L) e potássio (K mmol/L), das atividades das enzimas fosfatase alcalina (FA UI/L) e amilase (AM U/dL) de proteína (Prot g/dL), através de kits comerciais DOLES.

2.2. Análise estatística

A análise estatística foi feita usando o programa SAEG 9.5 (UFV, 2007) e quando significativo, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey com 10% de probabilidade.

Tabela 1. Composição percentual e nutricional das rações experimentais pré-inicial (1 a 7 dias) e inicial (8 a 21 dias), na matéria natural

Ingredientes (kg)	Ração pré-inicial	Ração inicial
Milho	58,954	60,210
Farelo de soja	34,877	33,954
Óleo vegetal	1,690	1,766
Fosfato bicálcico	1,905	1,826
Calcário	0,924	0,890
Sal	0,447	0,429
L-Lisina.HCl (%)	0,353	0,191
DL-Metionina99(%)	0,351	0,234
Premix mineral/vitamínico ¹	0,500	0,500
Composição Química		
Energia metabolizável (kcal/kg)	2.950	3.000
Proteína (%)	22,000	20,790
Triptofano (%)	0,293	0,276
Lisina (%)	1,466	1,263
Metionina + cistina (%)	1,041	0,897
Metionina (%)	0,684	0,554
Treonina (%)	0,850	0,809
Sódio (%)	0,223	0,214
Cálcio (%)	0,939	0,884
Fósforo disponível (%)	0,470	0,442

¹Suplemento mineral e vitamínico. Micromim Aves (suplemento mineral em mg): Manganês 150.000, Zinco 100.000, Ferro 100.000, Cobre 16.000, Cloreto de Colina 60.000 e Iodo 1.500. Premix Inicial (Suplemento vitamínico): Vitamina A 8.000.000 UI, Vitamina D₃ 2.000.000 UI, Vitamina E 15.000 UI, Vitamina K 1.800mg, Vitamina B₁ 1.800 mg, Vitamina B₂ 6.000 mg, Vitamina B₆ 2.800 mg, Vitamina B₁₂ 12.000 mg, Niacina 40.000 mg, Ácido Fólico 1.000 mg, Ácido Pantotênico 15.000 mg, Biotina 60 mg, Selênio 300 mg, Antioxidante 30 g.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Perfis séricos de nutrientes são apresentados na literatura para diferentes dietas, linhagens e metodologias de análise empregadas. Além disso, os valores das enzimas e dos minerais no soro diferem de alguns autores, devido, também, a aparelhagem usada para as dosagens e o método de obtenção do soro.

A tabela 2 abaixo mostra o perfil das concentrações dos minerais, proteína e enzimas no soro de frangos de corte.

Tabela 2. Concentrações de cálcio (Ca), fósforo (P), cloro (Cl), potássio (K), proteína (Prot), fosfatase Alcalina (FA) e amilase (AM) no soro de frangos de corte aos 7 fase pré-inicial) e aos 21 dias de idade (fase inicial)

7 dias	Rações - Fase Pré-Inicial*			Valor de P	CV (%)
	RPI	RPICry	RPIAsp		
Ca (mg/dL)	5,71 ^b	6,90 ^a	5,99 ^{ab}	0,04377	11,10
P (mmol/L)	5,12 ^b	4,76 ^b	6,24 ^a	0,01132	12,45
Cl (mmol/L)	153,08 ^a	124,43 ^b	141,49 ^{ab}	0,03291	10,76
K (mmol/L)	6,39	6,54	6,12	>>0,10	11,02
Prot (g/dL)	1,85 ^b	2,00 ^b	2,50 ^a	0,00046	9,05
FA (UI/L)	969,69	979,98	974,66	0,35347	1,11
AM (U/dL)	583,41	553,69	554,50	>>0,10	8.29
21 dias	Rações - Fase Inicial			Valor de P	CV (%)
	RI	RICry	RIAsp		
Ca (mg/dL)	6,05	5,55	5,47	0,09844	7,35
P (mmol/L)	5,72 ^a	4,98 ^b	4,99 ^b	0,01084	6,96
Cl (mmol/L)	123,95	137,43	138,65	0,34475	12,67
K (mmol/L)	4,48 ^c	5,89 ^b	6,74 ^a	0,00010	9,60
Prot (g/dL)	3,65 ^a	2,97 ^b	3,12 ^b	0,02227	10,70
FA (UI/L)	969,08	961,08	970,56	>>0,10	1,48
AM (U/dL)	589,11	548,80	542,70	0,20434	7.47

^{abc/}Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna são diferentes pelo teste de Tukey (P<0,10).

* (RPI) ração pré-inicial, (RPICry) ração pré-inicial com α -amilase de *Crptococcus flavus*, (RPIAsp) ração pré-inicial com *Aspergillus niger HM2003*, (RI) ração inicial, (RICry) ração inicial com α -amilase de *Cryptococcus flavus*, (RIAsp) ração inicial com α -amilase de *Aspergillus niger HM2003*.

A menor concentração do íon cálcio no soro, aos sete dias de idade, foi encontrada nas rações isentas de enzimas (5,71 mg/dL). Aos 21 dias, a concentração média foi de 5,69 mg/dL. SILVA et al. (2002), trabalhando com dietas purificadas, encontrou valores de 5,97 mg/dL em rações com 10% de ácido glutâmico. VIEITES et al. (2004) acharam valores de 8,31 mg/dL em dietas com 20% de proteína bruta, trabalhando com diferentes balanços eletrolíticos, enquanto KIRKPINAR & BASMACIOGLU (2006) encontraram 9,96 mg/dL em dietas a base de milho e farelo de soja. Valores mais altos foram encontrados por LEDOUX

et al. (1992), de 10,14mg/dL na dieta controle, e GONZÁLES et al. (2001) cujo valor de referência para aves no Sul do Brasil foi de 10,9 mg/dL.

A concentração de fósforo foi influenciada pelas dietas tanto aos sete dias, quanto aos 21 dias, todavia seu perfil foi invertido com o tempo. Aos sete dias, o maior valor foi encontrado na ração com enzima de *Aspergillus niger* HM2003 (6,24 mmol/L) e, aos 21 dias, na ração isenta de enzimas (5,72 mmol/dL). Valores encontrados por SILVA et al. (2002) foram de 6,07 mg/dL para dieta com 10% de ácido glutâmico e VIEITES et al. (2004) encontraram 6,97 (mg/dL) para dieta com 20% de proteína bruta. Outro valor que se assemelha ao encontrado neste trabalho para esta variável é o de 8,00 mg/dL, segundo KIRKPINAR & BASMACIOGLU (2006). O valor de referência para o fósforo na região Sul do Brasil é de 7,7 mg/dL (GONZÁLES et al., 2001).

O perfil do cloro aos sete dias de idade foi influenciado significativamente pela suplementação da enzima α -amilase aos sete dias de idade. O maior valor encontrado foi na ração isenta de enzima (153,08 mmol/L). SOUZA et al. (2004) avaliaram a concentração de cloro no soro de aves por fotometria de chama e encontraram valores parecidos aos deste trabalho, para machos com valor de 105,58 (mEq/L). Aos 21 dias de idade não houve influência da adição enzimática na concentração deste íon no soro.

O potássio aos sete dias, não apresentou diferença estatística na sua concentração no soro com média de 6,35 mmol/L. Aos 21 dias de idade, sua concentração foi alterada significativamente apresentando maiores valores para rações com suplementação de enzimas. SOUZA et al. (2004) avaliaram, também, a concentração de potássio no soro de aves por fotometria de chama e encontraram o valor de 5,88 (mEq/L) para machos. IMAEDA (1999) encontrou valores de 4,33 mEq/L usando fotometria de chama para aves saudáveis.

Tanto aos sete como aos 21 dias de idade, houve diferença para proteína plasmática. Aos sete dias o maior valor foi encontrado na ração com adição de enzima de *Aspergillus niger* (2,50 g/dL). Aos 21 dias, o maior valor foi em ração isenta de enzima (3,65 g/dL). CARDOSO et al. (2003) apresentaram valores de 3,30, 3,00 e 3,68 (g/dL) para a primeira, segunda e terceira semana de vida de frangos de corte, respectivamente. Estes valores corroboram com os encontrados neste trabalho. MACIEL et al. (2007), analisando o perfil eletroforético das proteínas séricas de frangos de corte com 42 dias de idade, encontraram para a dieta padrão valor de 3,42 g/dL.

Os valores de fosfatase alcalina não foram significativos para os sete dias de idade (974,77 UI/L) e aos 21 dias (966,90 UI/L). KANASHIRO et al. (2001) encontraram valores de 1.029,67 U/L para fosfatase alcalina aos sete dias de idade e aos 23 o valor de 736,72

(U/L). O pico de atividade da amilase está entre os sete e o 13º dia em aves tratadas. Após essa idade, a atividade decresce gradualmente (MAHAGNA & NIR, 1996). KRAMER (1989) considera que a atividade da fosfatase alcalina decresce à medida que ocorre a maturação óssea. Osteoblastos secretam grande quantidade de fosfatase alcalina quando estão depositando hidróxiapatita ativamente na matriz óssea, devido à presença desta enzima no sangue, o nível desta enzima constitui, em geral, um bom indicador da velocidade de formação óssea (PARTHEMORE et al., 1993).

A atividade da amilase no soro aos sete dias de idade (563,89 U/dL) e aos 21 dias (560,20 U/dL) não diferiu estatisticamente das rações isentas e com presença de α -amilase. O mesmo perfil foi encontrado por KANASHIRO et al. (2001), que encontraram valores maiores aos sete dias (1.629,67 U/L) e aos 23 dias (1.116,69 U/L) sem diferença estatística, apesar dos valores serem diferentes do encontrado, devido à metodologia usada.

4. CONCLUSÃO

A presença do extrato contendo α -amilase de *Cryptococcus flavus* e *Aspergillus niger* HM2003 em rações, na fase pré-inicial apresentaram os seguintes valores significativos para os parâmetros sanguíneos, aos sete dias de idade: cálcio (6,90 e 5,99 mg/dL), fósforo (4,76 e 6,24 mmol/L), cloro (124,43 e 141,49 mmol/L), proteína plasmática (2,0 e 2,50 g/dL). Os parâmetros não significativos aos sete dias foram: potássio (6,35 mmol/L), atividade enzimática da fosfatase alcalina (974,77 UI/L) e amilase (563,89 U/dL). Na fase inicial aos 21 dias os resultados significativos foram: fósforo (4,98 e 4,99 mmol/L), proteína plasmática (2,97 e 3,12 g/dL). Os parâmetros não significativos foram: cálcio (5,69mg/dL), cloro (133,34 mmol/L), atividade enzimática da fosfatase alcalina (966,90 UI/L) e amilase (560,20 U/dL). Estes resultados serão usados como referência para a comunidade científica, pois ainda não são conhecidos valores no soro para rações contendo suplementação exógena de α -amilase.

5. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

ALBUQUERQUE, T.T.O. **Estudo do Desenvolvimento de Tíbias e Fêmures de Aves e Corte**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1988. 50p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, 1988.

- BORSA, A., KOHAYAGAWA, A., BORETTI, L.P. et al. Serum levels of hepatic enzyme function in clinically healthy broiler chickens. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.58, n.4, p.675-677, 2006.
- CARDOSO, A.L.S.P. e TESSARI, E.N.C. Estudo dos parâmetros hematológicos em frangos de corte. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.70, n.4, p.419-424, 2003.
- CHARLES NORIEGA, M.L.V.C. **Apuntes de hematologia aviar**: material didático para curso de hematologia aviária. Universidad Nacional Autónoma de México. Departamento de producción animal: Aves. México, 2000. 70p. (Apostila mimeo).
- CHRISTENSON, R.H. Biochemical marker of bone metabolism: an overview. **Clinical Biochemistry**, v.30, n.8, p.573-593, 1997.
- DUNCAN, J.R. & PRASSE, K.W. **Patologia clínica veterinária**. São Paulo: Guanabara Koogan, 1982. 217p.
- FERREIRA-NETO, J.M. & VIANA, E.S. **Patologia clínica veterinária**. Belo Horizonte: Rabelo Brasil, 1978. 279p.
- GANONG, W.F. **Review of medical physiology**, Los Altos: Lange Medical Publications, 1967. 322p.
- GAW, A.; COWAN, R.A.; O'REILLY, D.S.J.; STEWART, M.J.; SHEPHERD, J. **Bioquímica Clínica**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2001. 165p.
- GONZALEZ, F.H.D. et al. Incidência de doenças metabólicas em frangos de corte no sul do Brasil e uso do perfil bioquímico sanguíneo para o seu estudo. **Revista Brasileira Ciência Avícola**, v.3, n.2, p.141-147, 2001.
- GUYTON, A.C. **Tratado de Fisiologia Médica**. 80 Edição. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan S.A., 1991. 864p.
- HARPER, H.A. **Manual de Química Fisiológica**, 7a Edição. São Paulo: Atheneu Editora São Paulo, 1977. 600p.
- HONMA, N.H. **Efeito dos níveis nutricionais de cálcio sobre a capacidade reprodutiva e integridade dos ossos de galos reprodutores de corte**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1992. 63p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 1992.
- IMAEDA, N. Characterization of serum enzyme activities and eletrolyte levels in broiler chicks after death from sudden death syndrome. **Poultry Science**, v.78, n.1, p.66-69, 1999.
- KANASHIRO, A.M.I.; BOTTINO, J.A.; CASTRO, A.G.M.; FERREIRA, F.; FERREIRA, A. J. P. Influência da administração contínua de probióticos a frangos de corte sobre atividades enzimáticas séricas e concentração de colesterol plasmático. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.68, n.2, p.11-17, 2001.
- KANEKO, J.J. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**, 4ª ed. California: Academic Press, 1989. 932p.
- KIRKPINAR, F. & BASMACIOGLU, H. Effects of pelleting temperature of phytase supplemented broiler feed on tibia mineralization, calcium and phosphorus content of serum and performance. **Czech Journal of Animal Science**, v.51, n.2, p.78-84, 2006.
- KRAMER, J.W. Clinical enzymology. In: KANEKO, J.J. **Clinical biochemistry of domestic animal**. San Diego: Academic, 1989. p.338-363.

- LARBIER, M. & LECLERCQ, B. Metabolism of water and minerals. **Nutrition and Feeding of Poultry**. Leicestershire: Nottingham University Press, 1992.
- LEDOUX, D.R., BROWN, T.P., WEIBKING, T.S., ROTTINGHAUS, G.R. Fumonisin toxicity in broiler chicks. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, 4, 330-333, 1992.
- LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**, 3ª Ed. São Paulo: Editora Sarvier, 2002. 725 p.
- LIMA, I.L. **Disponibilidade de fósforo e de flúor de alguns alimentos e exigência nutricional de fósforo para frangos de corte**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1995. 121p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 1995.
- LINKSWILLER, H.M. Calcium. In: **Presence knowledge in nutrition**. Washington: Nutrition fFndation Publications, 1976. p.233-240.
- LUMEIJ, J.T. & WESTERHOF, F. Blood chemistry for the diagnosis of hepatobiliary disease in birds. **The Veterinary Quarterly**, v.9, n.3, p.255-61, 1987.
- MACIEL, R.M. et al. Electrophoresis profile of serum proteins in broilers fed with diets containing aflatoxins and/or natural clinoptilolite clay. **Ciência Rural**, v.37, n.3, p.744-749, 2007.
- MAHAGNA, M. & NIR, I. Comparative development of digestive organs, intestinal disaccharidases and some blood metabolites in broiler and layer-type chicks after hatching. **British Poultry Science**, v.37, p.359-371, 1996.
- MAYNARD, L. A. et alii. **Nutrição Animal** 3 Ed, Traduzido por FIGUEIREDO F, A. B. N. Rio de Janeiro: Editora Freitas de Barros, 1984. 587p.
- McDOWELL, L.R. Calcium and Phosphorus – **Minerals in animal and human nutrition**. Academic Press, San Diego, 1992. p.26-77
- MENDONÇA JR., C.X. Deformidades das Pernas em Frangos de Corte. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLA, Campinas, 1999. **Anais...** Campinas, 1990. p.29-41.
- MEYER, D.J.; COLES, E.H.; RICH,L, J. **Medicina de laboratório veterinário: interpretação e diagnóstico**. São Paulo: Roca, 1995. 308 p.
- MOTTA, V.T. **Bioquímica Clínica para o Laboratório**. 4ª ed. Porto Alegre: Editora Médica Missau, 2003. 419 p.
- PARTHEMORE, J.G.; BURTON, D.W.; DEFTOS, L.J. Associations and dissociations between serum bone Gla protein and alkaline phosphatase in skeletal metabolism. **Journal of Orthopaedic Research**, v.11, n.5, p.671-676, 1993.
- PERINI, D. T. **Efeitos do ácido L-Glutâmico e da vitamina D3 no desempenho e anormalidades das pernas de pintos de corte**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1992. 94p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) –Universidade Federal de Viçosa, 1992.
- SCOTT, M.L.; NESHEIN, M.C. e YOUNG, R.J. **Nutrition of the chicken**. 2 ed. Ithaca: M. L. Scott & Associates, 1976. p.285-304.
- SILVA, F.A., MORAES, G.H.K., RODRIGUES, A.C.P. Composição Química do Soro de Pintos de Corte Alimentados com Dietas Purificadas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.4, p.1783-1788, 2002

SOUZA, B.B., BERTECHINI, A.G., SANTOS, C.D., LIMA, J.A.F., TEIXEIRA, A.S., FREITAS, R.T.F. Balanço de potássio e desempenho de frangos de corte suplementados com KCL no verão. **Ciências Agrotécnicas**, Lavras, v.28, n.5, p.1160-1168, 2004.

VIEIRA, E.C.; FIGUEIREDO, E.A.; LEITE, J.I.A.; GOMES, M.V. **Química Fisiológica**, 2ª edição. São Paulo: Editora Ateneu, 1995, 345p.

VIEITES, F.M.; MORAES, G.H.K.; ALBINO, L.F.T. et al. Balanço eletrolítico e níveis de proteína bruta sobre parâmetros sanguíneos e ósseos de frangos de corte aos 21 dias de idade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.6, p.1520-1530, 2004.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho confirmou-se a viabilidade da produção da enzima α -amilase de *Cryptococcus flavus* (com extrato de levedura e ração pré-inicial para frangos) na forma de extrato bruto e *Aspergillus niger* HM2003 (proteína de soja e amido comercial) parcialmente purificado, na forma líquida, para suplementação na dieta de frangos de corte. A caracterização bioquímica da α -amilase de *Cryptococcus flavus*, mostrou-se estável em pH de 3,0 a 9,0 e termoestável na faixa de 30 a 70°C, com 80% de atividade até 120 minutos, sua estabilidade foi eficaz na simulação do trato gastrintestinal, o que permitiu incluí-la como aditivo na alimentação de frangos de corte.

A α -amilase em frangos de corte tem ação na parte do amido resistente e na suplementação da amilase endógena, uma vez que animais jovens, de um a sete dias de idade, têm baixa produção de amilase pancreática. A avaliação *in vitro* não correspondeu *in vivo*, pois a análise laboratorial não foi confirmada com os resultados de campo. A aplicação da enzima nas rações experimentais (*in vitro*) aumentou a liberação de açúcares redutores, disponibilizou a proteína solúvel e a atividade da amilase continuou estável no período experimental, obtendo melhor resultado para as rações pré-iniciais.

O experimento *in vivo* não confirmou que a adição de α -amilase produzida por microrganismos, como *Cryptococcus* e *Aspergillus* são eficientes para pintos de um a sete dias de idade. A enzima foi acrescentada também na fase de oito a 21 dias de idade, mas, também, não houve efeito, talvez pela produção endógena ter sido auto-suficiente, fazendo com isso o papel da hidrólise do amido completamente. A viscosidade da ração e da digesta foram avaliadas, apesar de rações a base de milho e farelo de soja serem de baixa viscosidade, e não se obteve diferenciação.

Para avaliar a ação da enzima no metabolismo animal foram feitas análise da biometria dos órgãos digestivos e o perfil bioquímico do fígado, pâncreas e soro. A biometria revelou que a ação da enzima diminuiu o peso relativo do fígado e do pâncreas, alterando consequentemente a atividade da amilase medida no pâncreas. As enzimas medidas no tecido hepático, assim como, as medidas no soro, servirão de referência para a comunidade científica.

Este estudo mostrou a importância da biotecnologia enzimática aliado ao setor de produção animal, pois há necessidade de novas alternativas para o aumento da produção de

alimentos saudáveis para a população e manutenção da cadeia produtiva do agronegócio brasileiro.

O uso de enzimas em rações tem tido um incremento importante na avicultura moderna. Muitas empresas têm se dedicado ao desenvolvimento de produtos, principalmente complexos enzimáticos, que atuam melhorando aspectos relacionados à digestibilidade de rações, principalmente daquelas com ingredientes não convencionais. Nesse trabalho, observou-se que as enzimas produzidas por *Cryptococcus* e *Aspergillus* não foram eficientes em permitir melhoria de aspectos relacionados ao desempenho e digestibilidade. Talvez, pela concentração da enzima aplicada. Porém, os resultados com enzimas comerciais ainda são bastante contestados em virtude da variação de resultados obtidos na literatura, o que caracteriza a importância dos resultados aqui obtidos. Entretanto, observou-se que não houve melhoria, o que justificaria a realização de pesquisas mais aprofundadas com estes microrganismos e as enzimas por ele produzidas, em outras concentrações. Espera-se, com isso, que a contribuição dessa pesquisa seja importante para abrir novos horizontes de duas áreas aliadas: a biotecnologia enzimática e a nutrição animal.