

MARIA CÂNDIDA SILVA CARELLI

**AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA DO ÁCIDO L-GLUTÂMICO E DA VITAMINA D
NAS ATIVIDADES DE ENZIMAS DIGESTIVAS DE PINTOS DE CORTE**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2000

A Deus.

Aos meus pais.

Ao meu filho.

AGRADECIMENTO

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, pela oportunidade de realização deste estudo.

Ao Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, pelas facilidades utilizadas no setor de Avicultura, na realização do experimento com frangos de corte, ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e ao laboratório de Enzimologia do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa, pelas facilidades utilizadas nas análises laboratoriais.

Ao CNPq, pela bolsa concedida, e à Roche, pelo fornecimento de misturas vitamínicas, na pessoa do Dr. José Maria Gama.

Ao professor George Henrique Kling de Moraes, pela orientação, e aos professores Maria Goreti de Almeida Oliveira e Luiz Fernando Teixeira Albino, pelo aconselhamento durante a execução dos trabalhos de campo e de laboratório.

Aos meus amigos do Laboratório de Bioquímica Animal e de Enzimologia, pela colaboração durante o desenvolvimento deste trabalho, e a todos os amigos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

MARIA CÂNDIDA SILVA CARELLI, filha de Augusto Antônio Carelli e Maria Célia Silva Carelli, nasceu em Carangola, Minas Gerais, em 5 de fevereiro de 1962.

Em 1985, formou-se no curso técnico de Química, UCMG, em Coronel Fabriciano, MG.

Em 1993, graduou-se em Química (bacharelado), pela Universidade Federal de Viçosa.

Em agosto de 1997, iniciou o curso de Mestrado em Agroquímica, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de tese em agosto de 2000.

ÍNDICE

	Página
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. α -Amilase e Lipase	4
2.1.1. Desenvolvimento do sistema enzimático-digestivo	5
2.2. Nitrogênio não-específico	10
2.3. Vitamina D	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1. Procedimentos gerais	18
3.2. Preparo das amostras de pâncreas	20
3.3. Preparo das amostras de quimo	20
3.4. Determinação da atividade de amilase no quimo	20
3.5. Determinação da atividade de lipase no quimo	21
3.6. Determinação da atividade da amilase no pâncreas	21
3.7. Determinação da atividade da lipase no pâncreas	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5. RESUMO E CONCLUSÕES	31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

RESUMO

CARELLI, Maria Cândida Silva, M.S., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2000. **Avaliação bioquímica do ácido L-glutâmico e da vitamina D nas atividades de enzimas digestivas de pintos de corte.** Orientador: George Henrique Kling de Moraes. Conselheiros: Maria Goreti de Almeida Oliveira e Luiz Fernando Teixeira Albino.

Os efeitos de níveis de nitrogênio não-específico combinados com níveis de vitamina D sobre as atividades de lipase e amilase do quimo e pâncreas foram estudados em um experimento conduzido com pintos de um dia, machos, Hubbard, criados em bateria aquecida com piso de tela elevado e alimentados *ad libitum* com água e dietas básicas purificadas, contendo todos os aminoácidos essenciais, vitaminas (exceto vitamina D) e minerais em níveis recomendados, por um período de 14 dias. O delineamento foi um fatorial 3 x 4 inteiramente casualizado, com quatro repetições de oito pintos cada e os tratamentos foram constituídos da dieta básica suplementada com 5, 10 e 15% de ácido L- glutâmico (L-Glu), combinados com 0, 5.000, 10.000 e 15.000 UI de vitamina D/kg de dieta (vit. D). Ao término do experimento, quatro aves de cada tratamento foram sacrificadas por deslocamento cervical, e os conteúdos da porção proximal do intestino delgado (quimo) e pâncreas foram removidos, homogeneizados com solução de HCl, pH 3,0, e imediatamente liofilizados. A seguir, alíquotas de cada amostra foram solubilizadas em água destilada e

deionizada, centrifugadas, e o sobrenadante foi utilizado para determinações das atividades enzimáticas de lipase e amilase. As atividades de lipase e amilase no pâncreas e no quimo foram determinadas com *kits* específicos IN VITRO DIAGNOSTICA LTDA. Os dados obtidos permitiram as seguintes observações: em animais alimentados com dietas com níveis baixos (5% L-Glu) de nitrogênio não-específico, foi observado aumento na atividade de lipase pancreática com a suplementação de vitamina D (até 15.000 UI); em dietas com níveis normais e altos (10 e 15% de L-Glu) de nitrogênio não-específico, a atividade de lipase pancreática dos pintinhos atingiu um máximo com suplementação de 10.000 UI de vitamina D; a atividade da lipase no quimo dos pintinhos variou acentuadamente, sem permitir observar alguma tendência; em dietas com nível baixo ou normal (5 e 10% de L-Glu) de nitrogênio não-específico, a atividade de amilase do pâncreas de pintinhos aumentou até a suplementação de 5.000 UI de vitamina D, e em níveis vitamínicos superiores (10 e 15.000 UI) houve uma redução na atividade; somente foi observada elevação da atividade da amilase do pâncreas de pintos com a suplementação de vitamina D em dietas com elevado teor de nitrogênio não-específico (15% de L-Glu); e a atividade da amilase no quimo dos pintos tendeu a valores mais elevados em animais alimentados com baixo nível de nitrogênio não-específico (5% de L-Glu).

ABSTRACT

CARELLI, Maria Cândida Silva, M.S. Universidade Federal de Viçosa, August 2000. **Biochemical evaluation of L-glutamic acid and vitamin D in the activities of digestive enzymes of chicks.** Adviser: George Henrique Kling de Moraes. Committee Members: Maria Goreti de Almeida Oliveira and Luiz Fernando Teixeira Albino.

The effects of non specific nitrogen levels combined with vitamin D levels in the chymo and pancreas lipase and amylase activities were studied in a experiment conducted with one day old chicks, male, Hubbard, raised in eletrically heated batteries with wired and fed *ad libitum* with water and purified aminoacids diets containing all essential aminoacids, vitamina (except vitamin D) and minerals at recomendated levels for a 14 days period. The experimental design was a 3 x 4 factorial with four replicates with eight chicks each and the treatments were formulated with the basic purified diet supplemented with 5, 10 and 15% L-glutamic acid combined with 0, 5,000, 10,000 and 15,000 IU of vitamin D/kg of diet. At the end of the experimental period, four chicks from each treatments were killed by cervical dislocation and the delgate intestine proximal portion and pancreas were removed. These were homogenized with HCl solution, pH 3,0 and immediately freezed-dried. After that, aliquots from each sample were solubilized in distilled and deionized water, centrifuged and the supernatants used for the determination of lipase and amylase activities

with IN VITRO DIAGNOSTICA LTDA specific kits. The data observed allowed the following observations: chicks fed low level of non specific nitrogen (5% L-Glu) had an increased in the pancreas lipase activities with vitamin D supplementation from 0 to 15,000 IU/kg of diet; chicks fed normal and higher levels of non specific nitrogen (10 and 15% L-Glu) showed a maximum activity when supplemented with 10,000 IU of vitamin D; chymo lipase activities varied so much without any rational tendency; chicks fed low and normal level of non specific nitrogen (5 and 10% L-Glu) had higher pancreas amylase activities with 5,000 IU of vitamin D and at higher levels of vitamin D (5,000 and 15,000 IU) these activities were reduced; only chicks fed higher non specific level (15% L-Glu) showed a positive effect of vitamin D supplementation; differently from the other results observed chymo amylase activity had a tendency to be higher in chicks fed low level of non specific nitrogen.

1. INTRODUÇÃO

A idade de abate em frangos de corte vem sendo reduzida com sucesso, em razão dos avanços significativos na genética, na nutrição e no manejo das aves utilizadas para produção de carne. Essa tendência enfatiza a importância do crescimento durante a primeira semana de vida, que chega a constituir 16% do período de produção de aves. A indústria avícola continua com o objetivo básico de produção de aves em um tempo mais curto e de um produto com melhor qualidade nutricional. A aceleração do processo de crescimento tem levado ao aparecimento de deformidades ósseas, limitando o desempenho das aves usadas para produção de carne. A locomoção das aves é vital para bom desempenho e não deve ser afetada por disfunções estruturais. As anormalidades da locomoção são endêmicas e comumente referidas como fraqueza de pernas. Os problemas de pernas têm sido identificados como condrodistrofia, raquitismo, discondroplasia tibial, gota nas articulações, arqueamento de pernas, artrite, sinovites, osteomielite, perose e osteoporose. HULAN e BIRD (1972) concluíram que estas deformidades podem conduzir a uma debilitação das aves e à morte subsequente.

Pesquisas têm sido realizadas utilizando dietas purificadas de aminoácidos, que apresentam como principal vantagem o rigoroso controle de nutrientes ingeridos pelo animal. As dietas purificadas são utilizadas também para estudar a essencialidade de alguns aminoácidos. Os aminoácidos L-glutâmico e L-aspartico são considerados fonte de nitrogênio muito úteis para

aves (SUGAHARA e ARIYOSHI, 1967). Também, com dietas purificadas, tem sido possível estudar a indução nutricional de algumas enzimas em aves (MORAES, 1980; GUIMARÃES et al., 1996, 1997; RIBEIRO et al., 1995a). Estudos enfocando diferentes níveis de vitamina D na dieta também têm sido realizados, já que a vitamina D é uma das mais importantes substâncias regulatórias da concentração de cálcio no corpo e do metabolismo dos ossos. A deficiência de vitamina D em frangos de corte está comumente associada com decréscimo de cálcio sangüíneo e uma falha para mineralizar efetivamente o osso em desenvolvimento. MORAES et al. (1997) observaram que pintos de corte alimentados com 12,5% de L-glutâmico e elevado nível de vitamina D (25.000 UI/ kg de dieta) não apresentaram deformações ósseas nas pernas. Todavia, esses animais apresentaram desenvolvimento inadequado. PERINI (1993) observou alterações significativas na composição mineral parcial de tíbias e fêmures com a elevação de vitamina D da dieta.

Amilase e lipase, enzimas da classe das hidrolases, catalisam reações que implicam a ruptura hidrolítica de ligações químicas. A amilase (EC 3.2.1.1) rompe ligações glicosídicas de, por exemplo, amido e glicogênio. Há dois tipos de amilases: α -amilase, que é encontrada na saliva e no suco pancreático e hidrolisa ligações $\alpha(1\rightarrow4)$ distantes das ramificações, produzindo maltose, dextrina e um pouco de glicose; e β -amilase, que é encontrada no malte e hidrolisa ligações $\alpha(1\rightarrow4)$ alternadas, produzindo maltose e um pouco de glicose.

A amilase mais importante no processo de digestão no intestino delgado é a amilase pancreática (α -1,4-glucano-4-glucano hidrolase). Trata-se de uma endoenzima, que hidrolisa ligações $\alpha(1\rightarrow4)$ internas de polissacarídeos glicosídicos.

A lipase, ou triacilglicerol éster hidrolase (EC 3.1.1.3), presente no suco pancreático, catalisa a hidrólise de triacilgliceróis e ésteres carboxílicos em solução aquosa. A maior parte da dieta consiste em triacilgliceróis formados por ácidos carboxílicos de cadeia longa. No trato gastrointestinal, esses lipídios são emulsificados pela ação detergente dos sais biliares e, posteriormente, hidrolisados pela lipase pancreática. Os produtos resultantes consistem numa mistura de ácidos graxos e monoacilgliceróis. Assim, considerando que aves jovens alimentadas com dietas com baixo nível de nitrogênio não-específico

têm apresentado grande diversidade de anomalias nas pernas, foram objetivos deste trabalho:

- Testar três níveis de nitrogênio não-específico, na forma do aminoácido sintético ácido L-glutâmico, combinados com quatro níveis de colecalciferol (vitamina D₃), visando estudar seus efeitos nas atividades de algumas enzimas digestivas e do metabolismo de nitrogênio.
- Investigar as possíveis interações entre vitamina D₃ e ácido L- glutâmico nas referidas atividades enzimáticas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. α -Amilase e Lipase

A α -amilase (*α -1,4 glucano- 4-glucano hidrolase*, EC 3.2.1.1) do grupo das hidrolases é uma endoenzima que hidrolisa ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow4)$ internas de polissacarídeos. A α -amilase é produzida no pâncreas e secretada para o intestino delgado, principal local de digestão de polissacarídeos como amido e glicogênio. O amido é composto de duas frações: amilose e amilopectina. A ação da α -amilase sobre a amilose produz maltose e maltotriose; praticamente nenhuma glicose livre é liberada nesse processo. A ação da α -amilase sobre a amilopectina produz dextrinas e maltose. O glicogênio assemelha-se à amilopectina, sendo também hidrolisado pela α -amilase, resultando nos mesmos produtos.

A α -amilase consiste numa mistura de isoenzimas de massas moleculares em torno de 50.000 e contém um átomo de Ca^{2+} por molécula. O papel do Ca^{2+} na α -amilase é manter as estabilidades secundária e terciária da molécula. Não há nenhuma evidência para indicar que o Ca^{2+} tenha função direta, ligando ou transformando o substrato.

A lipase (*glicerol- éster hidrolase*, EC 3.1.1.3) é uma enzima da classe das hidrolases. Nos animais, é secretada pelo pâncreas, indo atuar no intestino

delgado, local mais importante da digestão lipídica. Quando ingeridos como parte da dieta, os triacilgliceróis são emulsificados no trato gastrointestinal pela ação detergente dos sais biliares, sendo hidrolisados por lipases. Os produtos resultantes consistem numa mistura de ácidos graxos, mono e diacilgliceróis. A lipase é uma enzima capaz de efetuar uma reação hidrolítica muito rápida entre duas fases não-miscíveis. O substrato encontra-se na fase lipídica, enquanto moléculas de água necessárias para hidrólise estão presentes na fase aquosa. A reação enzimática ocorre na interface óleo-água. O íon Ca^{2+} aumenta a taxa de hidrólise de triacilgliceróis. Este não é um efeito na enzima, mas devido a remoção dos ácidos graxos livres, como sais de cálcio insolúveis.

2.1.1. Desenvolvimento do sistema enzimático-digestivo

Várias pesquisas têm sido desenvolvidas no sentido de estudar as variações nas atividades de enzimas digestivas durante a digestão e absorção de alimentos. BARASH et al. (1993) concluíram que existem diferenças no efeito de vários regimes de alimentação na produção e secreção de enzimas pancreáticas. De acordo com O'SULLIVAN et al. (1991), os níveis de enzimas digestivas em órgãos e o conteúdo do trato gastrointestinal são influenciados pela genética dos animais, o composição alimentar e integridade do alimento. O estudo da interação entre alimentação, genética e idade tem revelado respostas sobre o mecanismo de produção de carne em pintos e perus.

O crescimento é um processo durante o qual os órgãos se desenvolvem e se tornam funcionais. O aumento do peso dos órgãos digestivos é essencial à atividade secretória do pâncreas para alcançar o crescimento máximo em idade precoce (NITSAN et al., 1991b). NITSAN et al. (1991b) propuseram que a adaptação de alimentos exógenos era associada com aumentos em peso do trato gastrointestinal e com o nível de enzimas digestivas. Segundo estes autores, os pesos de proventrículos, intestino delgado, fígado e pâncreas aumentaram mais rapidamente durante os primeiros nove dias de idade que o peso corporal bruto. Eles concluíram que, em pintos, a atividade das enzimas também aumentou com a idade e pode ser fator limitante para digestão durante as primeiras semanas de vida.

NIR et al. (1994) sugeriram que a secreção de enzimas pancreáticas no intestino seja regulada por um mecanismo de realimentação ativado pela concentração dos produtos delas. De acordo com GREEN e LYMAN (1972), a quantidade de quimo no trato gastrointestinal media a síntese de enzima digestiva e a secreção desta no pâncreas. Quantidades excessivas de quimo causadas pela alimentação aumentam a secreção de enzimas pancreáticas no intestino. Esta secreção alta foi observada para todas as enzimas. Assim, parece que existe diferença no efeito dos vários regimes de alimentação na secreção das enzimas pancreáticas (BARASH et al., 1993).

A digestão dos alimentos e a absorção de nutrientes são completadas pelas enzimas e pelos mecanismos de transporte localizados na mucosa intestinal. A digestão começa com as enzimas pancreáticas, mas a digestão completa de certos carboidratos e peptídeos depende da atividade de enzimas produzidas por células da superfície da mucosa intestinal. CORRING e BOURDON (1977) observaram que a falta de hidrólise enzimática proveniente do pâncreas no lúmen intestinal diminui a digestibilidade aparente dos componentes dietéticos e reduz o crescimento. A entrada excessiva de alimento pode limitar a produção de enzimas digestivas, como foi verificado em gansos com alimentação forçada de até cinco vezes a quantidade consumida por eles em alimentação *ad libitum* (NIR et al., 1973).

Estudando o crescimento e desenvolvimento enzimático-digestivo em frangos de cortes, NITSAN et al. (1991a) observaram que pintos são chocados com algumas reservas de enzimas pancreáticas que são produzidas durante o crescimento embrionário. Estas reservas diminuem rapidamente porque a atividade de enzimas que ocorre durante este período é menor que as requeridas para secreção no intestino e para manter as concentrações iniciais.

Segundo HULAN e BIRD (1972), a secreção de enzimas pancreáticas em pintos é afetada pela composição da dieta. A adaptação dietética pancreática para regulação da síntese e secreção de enzimas em mamíferos e aves domésticas foi revista por BRANNON (1990). A regulação de enzimas proteolíticas foi influenciada pela ação sinérgica entre colecistoquinina e aminoácidos (YANG et al., 1988), mas a regulação de amilase e lipase não foi elucidada. Taxas de produção de enzima pelo pâncreas de peru (KROGDAHL

e SELL, 1989) e pinto (PUBOLS, 1991) têm demonstrado claramente um aumento com a idade (NITSAN et al., 1991a; SELL et al., 1991).

IKENO e IKENO (1991) encontraram atividade de amilase em embrião de pintos com seis dias de idade. Esta atividade aumentou depois de seis dias de incubação. NITSAN et al. (1991a) verificaram diminuição na atividade específica de amilase no pâncreas de pintos de até cinco dias de idade, ocorrendo então aumento até os oito dias de idade. Em contraste, MARCHAIM e KULKA (1967) mostraram aumento na atividade específica da amilase em pintos de 17 dias de incubação, quando comparados com os de dois dias de idade. SELL et al. (1991) observaram aumento relativamente grande na atividade da amilase em aves depois da eclosão, e o aumento continuou até seis dias de idade. KROGDAHL e SELL (1989) também constataram aumento na atividade da amilase em aves após a eclosão. O aumento apresentou-se rápido durante os 14 primeiros dias de idade e tendeu a estabilizar depois de 21 dias. Em aves, SELL et al. (1991) mostraram que a atividade da amilase no pâncreas aumentou por um fator de 1,6 entre o segundo e o quarto dia de idade.

A atividade relativa da amilase no pâncreas, em pintinhos, aumentou até o oitavo dia de idade, quando ocorreu um máximo na atividade, e, então, diminuiu lentamente (NITSAN et al., 1991a). NOY e SKLAN (1995) observaram que a atividade da amilase estava relativamente baixa até o quarto dia de idade, possivelmente porque nenhum carboidrato estava presente na gema do ovo, havendo, então, aumento relativamente rápido de secreção com a idade.

Nos conteúdos intestinais de pintinho, nenhuma mudança na atividade específica da amilase foi observada até dois dias de idade, aumentando até os 15 dias de idade, quando a atividade era cinco vezes maior que na eclosão (MARCHAIM e KULKA, 1967). NITSAN et al. (1991b) concluíram que os níveis de enzimas nos conteúdos intestinais diferem daqueles do pâncreas e parecem ser linearmente dependentes.

LEPKOVSKY et al. (1964) concluíram que a amilase pancreática é a enzima menos estável nos conteúdos intestinais, quando comparada com proteases e lipases. Vários estudos indicam má digestibilidade de gordura durante as semanas iniciais (CAREW et al., 1972; WHITEHEAD e FISHER, 1975; KROGDAHL e SELL, 1989), e isto pode ser devido à baixa atividade da lipase (KROGDAHL e SELL, 1989) ou falta de bÍlis. POLIN e HUSSEIN (1982)

verificaram que os sais biliares suplementares aumentam a digestão de gorduras em pintos com mais de 7 dias de idade. KROGDAHL e SELL (1989) mostraram que a atividade específica da lipase em aves diminui durante a primeira semana de vida e, então, aumenta, atingindo um máximo aos 32 dias de idade; a atividade da lipase no intestino não mudou durante os primeiros 14 dias de vida.

ESCRIBANO et al. (1988) observaram que a atividade da lipase no pâncreas de perus jovens aumentou quatro vezes entre 18 dias de incubação e um dia de idade. SELL et al. (1991) mostraram aumento relativamente grande na atividade específica da lipase em aves entre a eclosão e um dia de idade, com pequena mudança depois desse período. Segundo NOY e SKLAN (1995), a atividade da amilase diminui menos ao longo do intestino que a de outras enzimas.

NITSAN et al. (1991a) verificaram que a atividade específica da lipase em pintinhos diminuiu durante os primeiros 6 dias de vida e, então, aumentou, atingindo o máximo aos 21 dias. Estes autores mostraram também que a atividade relativa da lipase em pintinhos aumentou até o oitavo dia de idade, atingindo o máximo aos 17 dias, diminuindo lentamente depois. A atividade da lipase nos intestinos de pintinhos aumenta gradativamente com a idade em um fator de 2,5 vezes, até o vigésimo terceiro dia de idade. HULAN e BIRD (1972) notaram que uma alimentação baseada em dieta com baixa taxa de gordura, para pintinhos de até 21 dias de idade, reduzia a atividade específica da lipase e concluíram que a ingestão de gordura pode afetar a produção de lipase.

Em algumas instâncias, os aumentos na atividade total de enzimas podem ser muito pequenos para manter o ritmo de aumentos em entradas de alimentos. Por exemplo, um atraso na secreção de lipase, em relação à entrada de alimentos, pode contribuir para utilização relativamente pobre de lipídios dietéticos durante os primeiros 10 dias ou logo depois da eclosão.

Segundo NOY e SKLAN (1995), a secreção duodenal diária líquida de amilase, tripsina e lipase apresentou-se baixa até o quarto dia de idade e aumentou 100, 50 e 20 vezes, respectivamente, durante 21 dias. A contribuição do íleo para absorção do ácido graxo diminuiu depois de sete dias. A digestão de nitrogênio no intestino delgado passou de 78% no quarto dia para 92% no vigésimo primeiro dia, considerando que a digestão de ácido graxo e amido

variava de 82 a 89% nesse período. Aparentemente, a digestibilidade de amido e lipídios é fator limitante no crescimento de pintinhos jovens. O desaparecimento do padrão de enzima no intestino delgado é semelhante para amilase, tripsina e lipase. Todas tiveram o fluxo líquido mais alto no duodeno e atividade diminuída rapidamente entre o duodeno e o jejuno, e menos rapidamente depois disso. A atividade da amilase diminuiu um pouco menos ao longo do intestino, em relação às outras enzimas examinadas.

KROGDAHL e SELL (1984) relataram aumentos na atividade de tripsina pancreática e atividade de amilase durante os primeiros 21 dias de idade e sugeriram que a atividade da lipase pancreática pode ser um fator limitante na digestão de lipídios em aves jovens. A atividade da lipase aumentou menos e mais lentamente que as outras enzimas, comparando-se com as encontradas no pâncreas.

NITSAN et al. (1991a) mostraram que as atividades específicas da tripsina, amilase e lipase no pâncreas diminuíram dos primeiros 3 até os 6 dias de idade, aumentando de 10 a 20% aos 14, 11 e 21 dias para tripsina, lipase e amilase, respectivamente. A atividade de todas as enzimas aumentou com a idade e alcançou atividade máxima no oitavo dia, para amilase e lipase, e no décimo primeiro dia, para tripsina e quimotripsina. A atividade específica da amilase não mudou durante os primeiros dois dias de idade, mas aumentou constantemente até o décimo sétimo dia, quando estava cinco vezes maior. Os valores máximos de atividade enzimática no intestino delgado foram atingidos em quatro dias para lipase, 11 dias para tripsina e quimotripsina e 17 dias para amilase.

O desenvolvimento de secreção de enzimas digestivas no pinto logo após a eclosão poderia ser um fator limitante na digestão e, subsequente-mente, na entrada do alimento e no crescimento.

NITSAN et al. (1995) mostraram que a síntese de enzimas no pâncreas e a secreção destas para o intestino delgado anteriormente ao sétimo dia de idade não foram aumentadas na mesma taxa que a entrada de alimento, resultando na utilização inferior do alimento.

Em idades mais avançadas, quando a capacidade para síntese de enzima foi completamente desenvolvida, o aumento da entrada de alimento foi acompanhado por aumento na secreção de enzimas (NIR et al., 1973).

Alguns pesquisadores, no intuito de melhorar a digestibilidade e o sistema enzimático-digestivo, utilizam diferentes tipos de dietas. Por exemplo, LU et al. (1988), estudando os efeitos do excesso de zinco dietético em pintos, concluíram que as atividades de amilase pancreática e de enzimas exportáveis, como lipase, tripsina e quimotripsina, foram diminuídas com o nível de zinco na alimentação.

ALMIRALL et al. (1995), em estudo sobre a viscosidade intestinal em pintinhos, verificaram que a atividade da lipase e amilase foi significativamente baixa em pintos alimentados com cevada, em comparação com os alimentados com milho, e que, quando a β -glucanase foi adicionada à dieta, a atividade das enzimas aumentou significativamente, mas não alcançou o nível dos alimentados com milho. Verificaram também que a viscosidade teve efeito estimulante na secreção pancreática e nos sais biliares.

Em ratos, IKEGAMI et al. (1990) mostraram que fibras viscosas aumentaram as atividades de enzimas digestivas no pâncreas e em conteúdos do intestino delgado. No entanto, a eficiência da digestão e a absorção de nutrientes não foram melhoradas por esses aumentos nas atividades das enzimas pancreáticas.

2.2. Nitrogênio não-específico

A necessidade de uma fonte de nitrogênio não-específico para bom desempenho tem sido constatada por vários pesquisadores (FEATHERTON, 1976; MARUYAMA et al., 1976; MORAES et al., 1984; GUIMARÃES et al., 1993a, b; RODRIGUES e MORAES, 1995; SILVA e MORAES, 1995). O nitrogênio não-específico é utilizado para a síntese de aminoácidos não-essenciais e outros compostos nitrogenados.

O aminoácido ácido L-glutâmico, de acordo com SCOTT et al. (1976), promove rápido crescimento, sendo necessária sua suplementação em dietas purificadas de aves de corte. BAKER e MOLITORES (1974) verificaram que pintos alimentados com dietas purificadas com baixo teor de nitrogênio não-específico apresentaram redução de 50% do ganho de peso, em relação a pintos alimentados com dietas suplementadas com 3% de ácido L-glutâmico.

Tem sido demonstrado que a elevação do nível de nitrogênio não-específico melhora o desempenho (ganho de peso corporal e conversão alimentar) e reduz a incidência de problemas de pernas (CORNÉLIO, 1995; GUIMARÃES et al., 1993a, b). MURUYAMA et al. (1976) verificaram que ao se utilizar ácido L-aspártico, L-alanina ou misturas de fontes de nitrogênio, como citrato de amônio, carbonato de amônio, uréia, xantina e uracila, estes foram menos eficientes que o aminoácido L-glutâmico para permitir o máximo de crescimento de pintos de até 14 dias de idade. Todavia, FEATHERTSON (1976) demonstrou que o aminoácido L-glutâmico ou as misturas isonitrógenas de outros aminoácidos não-essenciais resultaram em pintos com ganho de pesos similares.

GUIMARÃES (1988) constatou que ácido L-glutâmico é fonte de nitrogênio não-específico eficiente para promover o crescimento de pintos de corte, equivalendo à mistura de ácido L-glutâmico e L-alanina. RODRIGUES et al. (1996) observaram que pintos alimentados com 12,5% de ácido L-glutâmico apresentaram melhor crescimento ósseo que aqueles que receberam 5,0%, confirmando que o nível de nitrogênio não-específico de dietas purificadas é fundamental para o desenvolvimento de pintos, conforme observações feitas por FEATHERTSON (1976), MARUYAMA et al. (1976) e MORAES et al. (1987). De acordo com SILVA e MORAES (1995), embora o nível de 7,5% de L-Glu na dieta pareça satisfazer o requerimento de nitrogênio não-específico para crescimento máximo, o nível de 12,5% de L-Glu foi necessário para reduzir significativamente a incidência de problemas de pernas. O nível de ácido L-glutâmico é ainda variável, conforme observações feitas por diversos autores. MORAES et al. (1984) e GUIMARÃES et al. (1993a) verificaram ser necessário 10% de L-Glu ou quantidades isonitrógenas da mistura ácido L-glutâmico e L-alanina para bom desempenho de pintos criados em baterias aquecidas ou no chão.

MORAES et al. (1984), ao alimentarem pintos com dietas purificadas, contendo 10% de ácido L-glutâmico, observaram melhor ganho de peso em relação àqueles alimentados com 5% de L-Glu. RIBEIRO (1990), ao alimentar pintos de corte com dietas purificadas contendo 6,25% de ácido L-glutâmico, verificou alta incidência de problemas de pernas. No entanto, ao elevar o nível

de ácido L-glutâmico para 12,5%, constatou redução significativa dos problemas de pernas, mas não os eliminou totalmente.

RODRIGUES et al. (1996) observaram que a elevação do nível de ácido L-glutâmico de 5,0 para 12,5% aumentou a fração de proteínas colagenosas e diminuiu a fração de proteínas não-colagenosas ósseas (extraídas com EDTA). Isso poderia explicar a redução da incidência de problemas de pernas observada por RODRIGUES e MORAES (1995), em pintos de corte alimentados com 12,5%, em relação àqueles que foram submetidos às dietas com 5% de ácido L-glutâmico. Essa relação entre os teores de proteínas não-colagenosas e a incidência de problemas de pernas é explicável, considerando que o aumento de Gla-proteínas (componentes das proteínas não-colagenosas) não somente inibe a mineralização óssea, como também pode estimular o aumento da liberação de cálcio do osso (PRICE et al., 1980).

A utilização do ácido L-glutâmico como fonte de nitrogênio não-específico envolve a transaminação com ácido oxaloacético ou piruvato, que permite a síntese de ácido L-aspártico e L-alanina, respectivamente, os quais estão relacionados com ácido L-glutâmico pelas enzimas glutamato-oxaloacetato transaminase (GOT) e glutamato-piruvato transaminase (GPT) (SUGAHARA e ARIYOSH, 1967). GUIMARÃES et al. (1996) observaram que a L-alanina presente na dieta aumentou a atividade da GOT no fígado, sugerindo melhor utilização do ácido L-glutâmico como fonte de nitrogênio não-específico. MORAES (1980) não encontrou efeito significativo de 5,0 e 12,5% de ácido L-glutâmico na dieta sobre a atividade de GOT, mas uma tendência a maiores atividades com aumento do nível de nitrogênio não-específico da dieta. RIBEIRO et al. (1995c) observaram que a atividade da GDH no fígado mostrou tendência em ser maior nos pintos submetidos a 6,25% de ácido L-glutâmico que com misturas isonitrógenas equivalentes a 12,5% de ácido L-glutâmico. Esses resultados indicam que o alto nível de nitrogênio não-específico na dieta pode ser responsável pela inibição da atividade da GDH.

A maior parte dos organismos superiores tende a recuperar a amônia derivada do catabolismo dos L-aminoácidos por meio da reação catalisada pela L-glutamato desidrogenase (GDH). Posteriormente, o L-aminogruppo do L-glutamato poderá ser retirado por transaminação e produzir outros L-aminoácidos. Contudo, determinada fração de amônia, proveniente do metabolismo

aminoacídico, é excretada pelas aves na forma de ácido úrico, sendo, também, o produto final do metabolismo das purinas nas aves.

LEE e REAPER (1972) observaram inibição da atividade da GDH no fígado de frangos com a presença de ácido L-glutâmico na dieta. Também, segundo MORAES (1980), a atividade da GDH no fígado de pintos tendeu a decrescer com o aumento de L-Glu na dieta. KREBS e BELLAMY (1960) verificaram que o melhor caminho para o metabolismo do ácido L-glutâmico é via transaminação. No entanto, BALAZS (1963) observou que alta concentração de ácido L-glutâmico torna o caminho por desidrogenase mais importante.

2.3. Vitamina D

O envolvimento da vitamina D com o sistema endócrino é essencial para o processo de desenvolvimento, crescimento e remodelagem óssea (NORMAN e HURWITZ, 1993). É sabido que a presença de quantidades adequadas de 1,25 di-hidroxi-vitamina D₃ é requerida para crescimento normal, maturação e mineralização do osso, e para a manutenção do tecido ósseo maduro (ANDERSON e TOVERUD, 1994).

A vitamina D, em termos de estrutura, disponibilidade, metabolismo e modo de ação, é mais propriamente considerada um hormônio esteróide que uma vitamina. O mais aceito é que esta vitamina funciona como pré-hormônio ou precursor para metabólitos mais polares, dois dos quais 1,25-di-hidroxi-vitamina D₃ (1,25 (OH)₂D₃) e 24,25-di-hidroxi-vitamina D₃ (24,25 (OH)₂D₃), que são os principais mediadores de sua atividade. É importante salientar que (24,25 (OH)₂D₃) é uma das formas ativas de vitamina D, importante na formação normal do tecido ósseo.

Esta vitamina é considerada a mais importante de todas as substâncias regulatórias que governam a concentração plasmática de cálcio e o metabolismo do osso (De LUCA, 1993). O hormônio esteróide vitamina D é um mediador principal da homeostase do esqueleto. O osso é o maior sítio fisiológico para a ação de 1,25 (OH)₂D₃. Este hormônio esteróide regula os principais eventos associados à formação e reabsorção óssea. Os componentes anabólicos e catabólicos da homeostase óssea são mediados pelos efeitos de 1,25 (OH)₂D₃ no osteoblasto. Vários genes relacionados aos

osteoblastos, que incluem a osteocalcina, são modulados em nível transcricional pela ação da vitamina D (BREEN et al., 1994). O receptor para vitamina D é uma proteína de 48 Kda (humanos) e 60 Kda (aves), com alta homologia com outros membros da superfamília de hormônios esteróides (DESAI et al., 1995).

A vitamina D₃ (colecalférol) é absorvida na presença de sais biliares no jejuno e transportada por uma proteína específica que a protege da oxidação e inativação. Ela sofre duas hidroxilações, uma no fígado e outra nos rins, produzindo a 1,25 (OH)₂ D₃, que é reconhecidamente a mais ativa e potente forma da vitamina (McDOWELL, 1989). A vitamina C é importante na conversão de vitamina D₃ na forma funcional 1,25 (OH)₂ D₃. A síntese de vitamina C nos rins de frango durante as primeiras 2-3 semanas de idade não parece adequada ao processo de calcificação (BAINS, 1994). ROBERTSON e EDWARDS (1994) avaliaram um possível sinergismo entre ácido ascórbico e a 1,25 (OH)₂ D₃ em frangos, nos ossos e nas variáveis sanguíneas. Os resultados obtidos são concordantes com os de outros pesquisadores, em que a suplementação das dietas com 10 µg/kg de 1,25 (OH)₂ D₃ reduz a incidência e severidade de discondroplasia tibial em frangos alimentados com dieta marginal em cálcio. A 1,25 (OH)₂ D₃, por si só, não funciona no processo de mineralização, mas tem funções importantes no osteoblasto, onde estimula a produção de proteínas e permite a mobilização do osso pelo hormônio da tireóide. Também, inicia a ativação do osteoclasto, que é o primeiro passo no processo de remodelagem do osso, um processo que é requerido para a manutenção normal do osso (De LUCCA, 1993).

A relação entre 1,25 (OH)₂ D₃ e fosfatase alcalina do osso é importante na elucidação do papel da vitamina D na função osteoblástica, devido à aparente associação dessa enzima com o aumento da atividade anabólica do osteoblasto. Essa enzima poderia estar envolvida na mineralização, pelo aumento local na concentração do íon fosfato e, ou, pela hidrólise dos inibidores da cristalização, como o pirofosfato (SPIESS et al., 1986). A deficiência de vitamina D aumenta a matriz óssea não-mineralizada, que resulta em raquitismo. A administração de 1,25 (OH)₂ D₃ a animais deficientes em vitamina D estimula a reabsorção óssea. A 1,25 (OH)₂ D₃ promove a mineralização do osso osteoblástico diretamente ou atua na

mineralização indiretamente, por meio do fornecimento de cálcio e fósforo suficiente para a nova matriz óssea formada (SUDA et al., 1990).

As principais funções do $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ são de estimular a absorção de cálcio e fósforo pelas células intestinais, mediar o remodelamento do osso e, no rim, aumentar a reabsorção tubular de cálcio e fósforo. Possui, ainda, outros efeitos biológicos não diretamente relacionados com transporte mineral ou mineralização, incluindo metabolismo dos esteróis na pele, estimulação de diferenciação de macrófagos, modificação na atividade T-linfocítica e influência na secreção de uma série de peptídios hormonais (HAUSSLER, 1986).

Concentrações de cálcio e fósforo inorgânico são correguladas pelo hormônio paratireóide e pela vitamina D, que atuam direta ou indiretamente no intestino, no osso e nos rins das aves e servem como fonte e tecido-alvo para a vitamina D (WIDEMAN, 1987). Deficiência de vitamina D em frangos de corte jovens e perus está comumente associada com decréscimos no cálcio sangüíneo, alargamento da epífise cartilaginosa e falha para mineralizar efetivamente o osso em desenvolvimento. Os efeitos da deficiência de vitamina D podem ser revertidos pelo tratamento com colecalciferol dietético ou doses fisiológicas de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (VAIANO et al., 1994).

Estudos bioquímicos dos receptores de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ indicam que o modo de ação do esteroide vitamina D é similar ao daqueles de hormônios esteróides e tireoidianos, com o metabólito sendo complexado por uma proteína ligante de alta afinidade. Foram detectados receptores para $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ em diversos tecidos de aves, ratos, porcos, macacos e homem. Os tecidos analisados foram os seguintes: intestino, rim, tecido ósseo, paratireóide, pâncreas, placenta, membrana corioalantóica (aves) e útero; em todos estes foram detectados receptores para $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (HENRY e NORMAN, 1984; POLS et al., 1990). O receptor, estando ligado ao metabólito, induz a formação de uma proteína que altera a função nas células-alvo. A proteína receptora de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ tem peso molecular entre 50 e 60 KD e se liga ao hormônio com alta afinidade ($K_d = 10^{-11}$) e seletividade maior que para outros metabólitos da vitamina D. A proteína receptora apresenta grupos sulfídricos essenciais com ambos os centros de ligação do DNA e hormônio (HAUSSLER, 1986). Recentes trabalhos sugerem que o receptor para $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ é, por si só, modulado, seja quantitativamente, pela presença dos metabólitos, seja

qualitativamente, pela fosforilação na presença de $1,25 (OH)_2 D_3$ (PIKE e SLEATOR, 1985).

O complexo receptor-hormônio está fortemente associado com o núcleo ou a cromatina da célula. Ocorre estimulação seletiva da tradução do DNA, que resulta na biossíntese de nova molécula de RNA mensageiro, que sintetiza a proteína necessária para gerar a resposta biológica do hormônio. No caso de $1,25 (OH)_2 D_3$, existe evidência de que a localização intracelular do esteróide no tecido-alvo é realmente nuclear (NORMAN et al., 1982), demonstrando que o metabólito ativo da vitamina D atua como hormônio e não como vitamina (NORMAN, 1968).

PRICE e BAUKOL (1980), estudando células de osteosarcoma de ratos, demonstraram a produção de Gla-proteína óssea (BGP) em resposta ao metabólito ativo da vitamina D. Essa proteína, devido à presença dos resíduos GLA, tem a propriedade de se ligar a íons cálcio. A concentração de BGP no osso e no soro foi reduzida em animais com dietas deficientes de vitamina D e aumentou após a administração de $1,25 (OH)_2 D_3$.

Receptores para $1,25 (OH)_2 D_3$ estão presentes nos osteoblastos, mas não nos osteoclastos, indicando que as principais células-alvo de osso são osteoblastos (MERKE et al., 1986). O complexo hormônio-receptor ativa a produção de várias proteínas não-colagenosas, entre elas a osteocalcina (PRINCE et al., 1976).

Alguma evidência existe de que $1,25 (OH)_2 D_3$ estimula a diferenciação de osteoblastos e, indiretamente, a maturação e atividade de osteoclastos. Os osteoclastos não apresentam receptores para $1,25 (OH)_2 D_3$, porém respondem aos fatores liberados pelos osteoblastos ativados. Altas concentrações de $1,25 (OH)_2 D_3$ produzem aumento no número e na atividade de osteoclastos ativados, resultando no aumento da taxa de reabsorção óssea (ANDERSON e TOVERUD, 1994).

O metabólito $1,25 (OH)_2 D_3$ estimula a síntese de osteocalcina nas células osteoblásticas em cultura, e seu efeito é bloqueado pelos inibidores da RNA polimerase II, que sugere atuar em nível de transcrição. Similarmente a outros receptores de hormônios esteróides, o receptor para $1,25 (OH)_2 D_3$ contém uma região de ligação ao esteróide e um domínio de ligação ao DNA, que sugere estar envolvido na regulação transcricional. O metabólito $1,25$

(OH)₂ D₃ controla a expressão de vários outros genes, que incluem colágeno tipo I, proteína da matriz que contém ácido γ -carboxi-glutâmico (Gla), hormônio da paratireóide, e uma família de proteínas de ligação ao cálcio, chamadas calbindinas.

HAUSCHKA et al. (1982) relacionaram Gla proteínas com mineralização do tecido ósseo. Estes autores demonstraram que os ossos de aves alimentadas com dietas deficientes de vitamina D, quando comparados com ossos de aves alimentadas com dietas normais, em região de baixa mineralização, não apresentam variações do nível de Gla proteínas totais, mas um grande aumento de outra Gla proteína de peso molecular maior, que seria uma precursora da osteocalcina. Alguns autores defendem que as Gla proteínas, apesar de terem função na mineralização, primeiro aparecem como precursoras da osteocalcina, requerendo vitamina D para sua conversão.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Procedimentos gerais

O experimento foi conduzido no setor de Avicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, com o objetivo de estudar o perfil enzimático da amilase e lipase do trato digestivo em pintos de corte.

Foram utilizados 240 pintos de um dia, machos, Hubbard, por um período de 14 dias. Utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado, segundo esquema fatorial 3 x 4 (três níveis de ácido L-glutâmico e quatro níveis de vitamina D₃), com quatro repetições de cinco aves cada, considerado a unidade experimental. Os animais foram pesados e distribuídos aleatoriamente nos tratamentos, que se constituíram de uma dieta básica purificada, contendo todos os aminoácidos essenciais, incluindo prolina, glicina, minerais e vitaminas (exceto vitamina D₃), suplementada com três níveis de ácido L- glutâmico (5, 10 e 15%) combinados com quatro níveis (0, 5.000, 10.000, 15.000 UI/kg de dieta) de vitamina D₃ (Quadro 1).

Quadro 1 – Dietas experimentais purificadas

Ingredientes	Dietas											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Ácido L-glutâmico (%)	5	10	15	5	10	15	5	10	15	5	10	15
Aminoácidos essenciais ^{1/} (%)	8,94	8,94	8,94	8,94	8,94	8,94	8,94	8,94	8,94	8,94	8,94	8,94
Mistura vitamínica ^{2/} (%)	4,48	4,48	4,48	4,48	4,48	4,48	4,48	4,48	4,48	4,48	4,48	4,48
Mistura mineral ^{3/} (%)	9,10	9,10	9,10	9,10	9,10	9,10	9,10	9,10	9,10	9,10	9,10	9,10
Óleo de soja (%)	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00
Bicarbonato de sódio (%)	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Vitamina D (UI/kg de dieta)	0,0	0,0	0,0	5.000	5.000	5.000	10.000	10.000	10.000	15.000	15.000	15.000
Amido (%) q.s.p.	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

^{1/} Em% da dieta: L-Arg.HCl = 1,15; L-His.HCl.H₂O = 0,41; L-Lis.HCl = 1,14; L-Tir = 0,45; L-Fen = 0,5; L-Trp = 0,15; L-Met = 0,35; L-Cis = 0,35; L-Tre = 0,65; L-Leu = 1,0; L-Iso = 0,6; L-Val = 0,69; L-Pro = 0,4; e Gli = 1,0 (SASSE e BAKER, 1973).

^{2/} Quantidade/kg de dieta: Colina 70% = 3,3 g; Retinil palmitato = 5.000 U.I.; D-alfa-Tocoferil acetato = 22 U.I.; Menadiona sódio bissulfito = 2,0 mg; Inositol = 1 g; Riboflavina = 9 mg; Tiamina.HCl = 6 mg; Pantotenato de cálcio = 20 mg; Niacina = 50 mg; Piridoxina = 8 mg; Ácido fólico = 2 mg; Biotina = 0,3 mg; B₁₂ (0,1%) = 20 mg; BHT = 0,125 mg; e excipiente = 30 g (FEATHERSTON e ROGLER, 1978).

^{3/} Em mg/kg de dieta: CaCO₃ = 18.652,6; CaHPO₄.2 H₂O = 30.530; K₂HPO₄ = 11.220; NaCl = 6.000; FeSO₄ = 200; ZnO = 122,5; CuSO₄.5 H₂O = 15; MnSO₄.H₂O = 510; KI = 40; MgCO₃ = 2.500; NaMoO₄.2 H₂O = 1,0; NaSeO₃ = 0,22; e excipiente = 30.300 (FEATHERSTON e ROGLER, 1978).

As aves foram alojadas em baterias aquecidas com pisos de tela elevados e receberam água e dieta *ad libitum* durante todo o período experimental de 14 dias. Ao término do período experimental, quatro aves de cada tratamento foram pesadas e sacrificadas por deslocamento cervical e tiveram removido o conteúdo da porção proximal do intestino delgado (quimo) e pâncreas. Essas amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, para que as atividades enzimáticas fossem interrompidas, identificadas e posteriormente utilizadas para determinações dos teores de proteínas totais e das atividades enzimáticas.

3.2. Preparo das amostras de pâncreas

O pâncreas, imediatamente após a sua remoção, foi limpo de toda gordura periférica, cortado em fatias com bisturi, homogeneizado em HCL pH 3,0, congelado em nitrogênio líquido, liofilizado e armazenado a - 4 °C.

3.3. Preparo das amostras de quimo

O quimo, imediatamente após ter sido removido do intestino delgado, foi homogeneizado em HCL pH 3,0, congelado em nitrogênio líquido, liofilizado e armazenado a - 4 °C.

3.4. Determinação da atividade de amilase no quimo

De cada amostra liofilizada do quimo foram retirados 3,0 mg, que foram solubilizados com 1,0 mL de água deionizada. As amostras foram centrifugadas a 7.000 x g por 10 minutos a - 4 °C. Do sobrenadante foram retiradas alíquotas para determinação da atividade de amilase no quimo. Para essa determinação, foi utilizado o *kit* produzido pela IN VITRO DIAGNOSTICA LTDA, que consiste na adição de iodo à solução contendo amido, resultando no desenvolvimento de um complexo de cor azul. Dentro de certos limites, mantendo-se a concentração de iodo constante, a alteração produzida na cor pelo amido degradado é proporcional à concentração de amilase na amostra. A atividade é determinada a 660 nm.

3.5. Determinação da atividade de lipase no quimo

De cada amostra de quimo liofilizada foram retirados 3,0 mg, que foram solubilizados com 1,0 mL de água deionizada; em seguida, a solução foi centrifugada a 7.000 x g por 10 minutos a - 4 °C. Do sobrenadante foi retirada uma alíquota para determinação da atividade de lipase. Para essa determinação, foi utilizado o *kit* produzido pela IN VITRO DIAGNOSTICA LTDA, que consiste na hidrólise de um tioéster pela lipase, liberando o tioálcool correspondente e ácido butírico. O tioálcool reage com ácido 5,5 ditio-bis-2-nitrobenzóico em meio tamponado, formando um ânion de coloração amarela, cuja intensidade de cor é proporcional à concentração da enzima e apresenta a absorção máxima em 412 nm.

3.6. Determinação da atividade da amilase no pâncreas

De cada amostra de pâncreas liofilizada foi retirado 0,1 mg, que foi solubilizado com 1,0 mL de água; essa solução foi centrifugada a 7.000 x g por 10 minutos. Do sobrenadante foram retiradas alíquotas para determinação da atividade de amilase no pâncreas. Para essa determinação, foi utilizado o *kit* produzido pela IN VITRO DIAGNOSTICA LTDA, que consiste na adição de iodo à solução contendo amido, resultando no desenvolvimento de uma cor azul. Dentro de certos limites, mantendo-se a concentração de iodo constante, a alteração produzida na cor pelo amido degradado é proporcional à concentração de amilase na amostra e apresenta a absorção máxima em 660 nm.

3.7. Determinação da atividade da lipase no pâncreas

De cada amostra de pâncreas liofilizada foram retirados 3,0 mg e solubilizados com 1,0 mL de água deionizada; essa solução foi centrifugada a 7.000 x g por 10 minutos. Do sobrenadante foram retiradas alíquotas para determinação da atividade de lipase no pâncreas. Para essa determinação foi utilizado o *kit* produzido pela IN VITRO DIAGNOSTICA LTDA, que consiste na hidrólise de um tioéster pela lipase, liberando o tioálcool correspondente e ácido butírico. O tioálcool reage com ácido 5,5 ditio-bis-2-nitrobenzóico em

meio tamponado, formando um ânion de coloração amarela, cuja intensidade de cor é proporcional à concentração da enzima e apresenta a absorção máxima em 412 nm.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados referentes às atividades específicas da lipase encontradas no pâncreas e no quimo dos animais experimentais constam do Quadro 2.

Quadro 2 – Atividades enzimáticas específicas (U/mg) de lipase do pâncreas e do quimo de pintos de corte aos 14 dias de idade

	Vitamina D (UI)	Ácido L-glutâmico (%)			Média
		5	10	15	
Pâncreas	0	169	146	64	126
	5.000	353	292	635	427
	10.000	468	1.071	260	600
	15.000	1.281	444	358	694
Média		568	488	329	
Quimo	0	3.794	2.392	2.870	3.019
	5.000	5.487	1.239	541	2.422
	10.000	2.724	1.449	489	1.554
	15.000	2.964	4.209	1.164	2.779
Média		3.742	2.322	1.266	

A Figura 1 contém as variações das atividades específicas da lipase no pâncreas encontradas no animais aos 14 dias de idade. Pode ser observado que os animais alimentados com dietas contendo 5% de ácido L-glutâmico tiveram um aumento acentuado na atividade da lipase pancreática com aumento da suplementação de vitamina D na dieta.

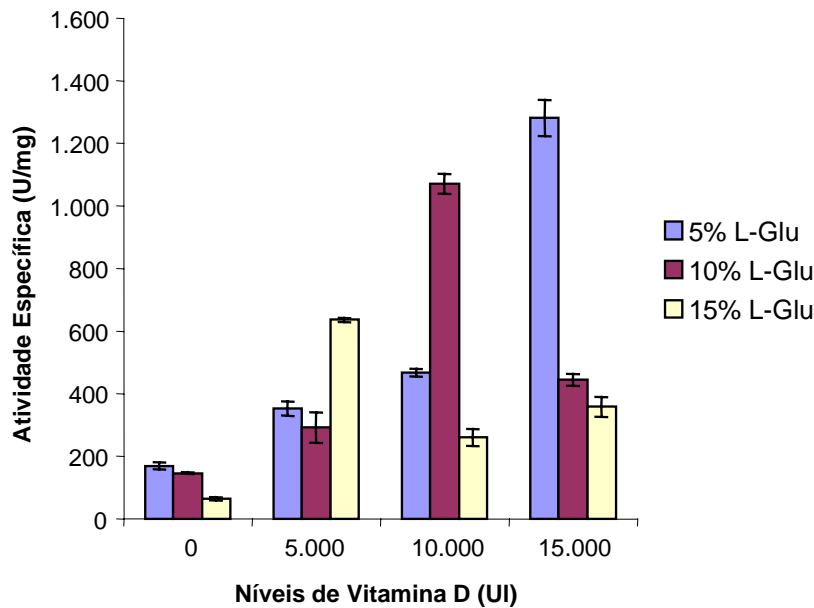


Figura 1 – Atividade específica de lipase do pâncreas de pintos de corte, machos, Hubbard, alimentados com dietas purificadas suplementadas com 5, 10 e 15% de ácido L-glutâmico (L-Glu), combinados com 0, 5.000, 10.000 e 15.000 UI de vitamina D/kg de dieta, respectivamente 1, 2, 3 e 4, aos 14 dias de idade.

A maior atividade observada foi nos animais suplementados com 15.000 UI de vitamina D (1281,51). Neste nível baixo (5%) de ácido L-glutâmico, houve aumento de 7,57 vezes na atividade da lipase dos animais que receberam 15.000 UI de vitamina D, em relação àqueles que não receberam suplementação vitamínica.

Da mesma forma, animais alimentados com dietas contendo 10% de ácido L-glutâmico tiveram aumento na atividade específica de lipase pancreática com suplementação de vitamina D. O máximo de atividade foi observado

com 10.000 UI de vitamina D (1.071,31 UL). Neste caso, o aumento na atividade foi de 7,29 vezes aquele obtido no animais sem suplementação vitamínica D. O aumento da suplementação de vitamina D para 15.000 UI resultou numa redução de 2,41 vezes a atividade de lipase. Todavia, houve aumento de 3,01 vezes na atividade, em relação à não-suplementação de vitamina D.

Os animais alimentados com dietas contendo 15% de ácido L-glutâmico atingiram atividade máxima (635,89) com suplementação de 5.000 UI de vitamina D. Esse aumento foi de 9,88 vezes aquele observado nos animais sem suplementação. Os animais que receberam 10 e 15 mil UI de vitamina D tiveram redução na atividade específica de lipase, em relação àqueles que foram suplementados com 5.000 UI. Essas reduções foram de, respectivamente, 2,44 e 1,77 vezes.

Em geral, independentemente do nível de suplementação de ácido L-glutâmico, as menores atividades observadas foram menores nos animais que não receberam suplementação de vitamina D. Também, em geral, aumentos na suplementação de ácido L-glutâmico reduziram a necessidade de vitamina D para se atingir a máxima atividade.

A Figura 2 mostra os valores da atividade específica da lipase no quimo dos animais aos 14 dias de idade. Os valores de atividades no quimo apresentaram variações mais acentuadas do que no pâncreas.

A suplementação de 5% de ácido L-glutâmico resultou na maior atividade de lipase no quimo, observada quando os animais receberam 5.000 UI de vitamina D. Essa atividade foi maior 1,44 vez que a observada nos animais que não foram suplementados com vitamina D. Aumentando-se a suplementação de vitamina D para 10.000 e 15.000 UI, houve redução na atividade de, respectivamente, 1,39 e 1,28 vezes em relação à não-suplementação vitamínica.

Os animais alimentados com dietas contendo 10% de ácido L-glutâmico apresentaram redução na atividade específica da lipase quando a suplementação de vitamina D foi de 5.000 e 10.000 UI de vitamina D. A maior atividade observada foi nos animais que receberam 15.000 UI de vitamina D. Esse aumento foi de 1,75 vez o observado nos animais que não receberam vitamina D.

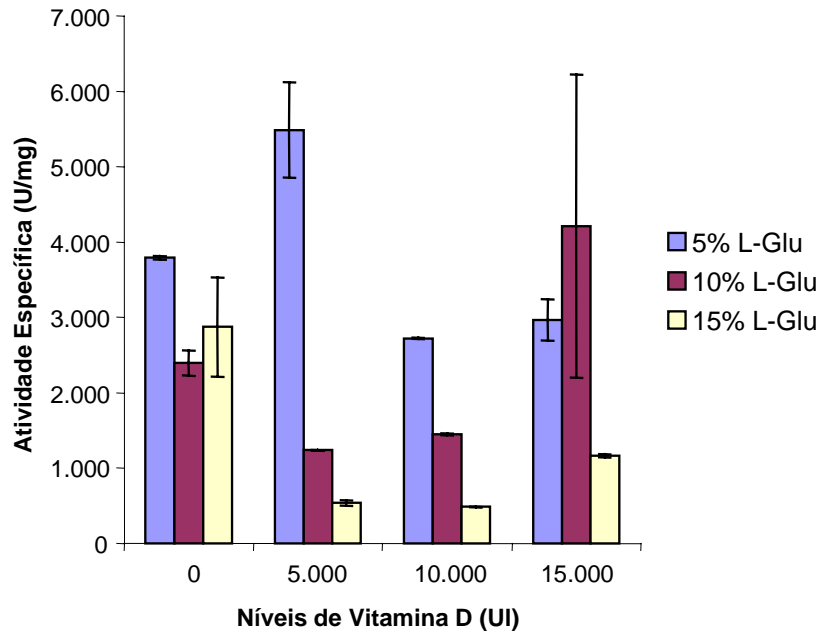


Figura 2 – Atividade específica de lipase do quimo de pintos de corte, machos, Hubbard, alimentados com dietas purificadas suplementadas com 5, 10 e 15% de ácido L-glutâmico (L-Glu), combinados com 0, 5.000, 10.000 e 15.000 UI de vitamina D/kg, respectivamente 1, 2, 3 e 4, de dieta, aos 14 dias de idade.

Observação similar pode ser feita para animais alimentados com dietas contendo 15% de ácido L-glutâmico. Na ausência da suplementação de vitamina D, foi constatada a maior atividade específica, 2.870,65 UL. Com suplementações de 5.000 e 10.000 UI de vitamina D houve reduções de 5,3 e 5,86 vezes, respectivamente. Por outro lado, a maior suplementação de vitamina D (15.000 UI/kg de dieta) resultou num aumento de 2,37 vezes na atividade específica no quimo.

Em geral, pode ser observado que, com 5% de ácido L-glutâmico, as atividades específicas no quimo foram maiores do que com 10 e 15% de ácido L-glutâmico na ausência e suplementação de 5.000 e 10.000 UI de vitamina D. Também, a suplementação de 5.000 ou 10.000 UI de vitamina D, combinados com 10 ou 15% de ácido L-glutâmico, resultou em redução da atividade específica. Nesses dois níveis de ácido L-glutâmico, houve aumento da atividade específica com suplementação de 15.000 UI de vitamina D.

No Quadro 3 estão as atividades específicas de amilase do pâncreas e do quimo de animais aos 14 dias de idade.

Quadro 3 – Atividades enzimáticas específicas (U/mg) da amilase do pâncreas e do quimo de pintos de corte, machos, Hubbard, aos 14 dias de idade

	Vitamina D (UI)	Ácido L-glutâmico (%)			Média
		5	10	15	
Pâncreas	0	645.798	777.460	675.183	699.480
	5.000	3.612.371	6.621.792	1.323.424	3.852.537
	10.000	625.744	2.750.959	1.732.932	1.703.212
	15.000	1.515.414	3.709.074	2.183.668	2.469.385
Média		1.599.865	3.464.821	1.478.801	
Quimo	0	410.349	148.788	58.199	205.779
	5.000	407.572	254.557	93.605	251.911
	10.000	35.307	176.673	214.578	142.186
	15.000	329.201	216.559	97.187	214.316
Média		295.607	199.144	115.892	

Na Figura 3 encontram-se as flutuações das atividades específicas da amilase pancreática dos animais experimentais. Observa-se, nesta figura, que animais alimentados com dietas contendo 5% de ácido L-glutâmico apresentaram aumento na atividade da enzima à medida que se aumentou o nível de vitamina D de 0 para 5.000 UI.

Em nível de 10.000 UI de vitamina D ocorreu uma redução na atividade da enzima, aumentando novamente quando este nível chegou a 15.000 UI. A atividade máxima da amilase foi observada em animais alimentados com 5% de ácido L-glutâmico, combinado com 5.000 UI de vitamina D; neste caso, houve aumento na atividade de 5,59 vezes, comparado com os que não receberam suplementação de vitamina D.

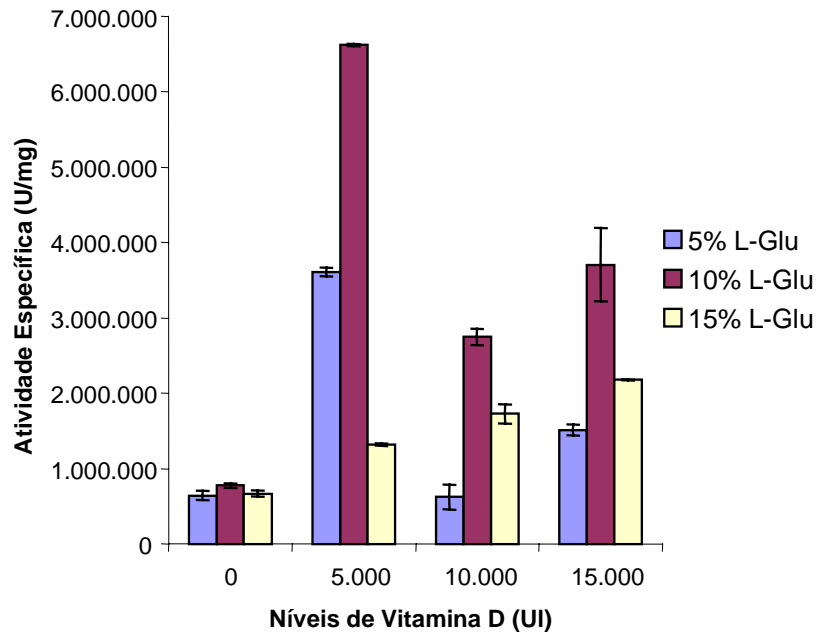


Figura 3 – Atividade específica de amilase do pâncreas de pintos de corte, machos, Hubbard, alimentados com dietas purificadas suplementadas com 5, 10 e 15% de ácido L-glutâmico (L-Glu), combinados com 0, 5.000, 10.000 e 15.000 UI de vitamina D/kg de dieta, respectivamente 1, 2, 3 e 4, aos 14 dias de idade.

Em animais alimentados com dietas contendo 10% de ácido L-glutâmico, foram verificados os maiores valores de atividade da amilase no pâncreas. A atividade máxima obtida foi em animais alimentados com dietas que combinavam 10% de ácido L-glutâmico e 5.000 UI de vitamina D; neste nível, houve aumento de 8,51 vezes em relação aos que não receberam suplementação de vitamina D. Já em animais que receberam dietas contendo 15% de ácido L-glutâmico, pôde-se observar aumento na atividade da amilase à medida que se aumentaram os níveis de vitamina D. A maior atividade foi observada quando o nível de vitamina D era de 15.000 UI; esse aumento foi de 3,23 vezes, quando comparado com o de animais que receberam dietas sem suplementação de vitamina D.

Na Figura 4 constam as variações das atividades específicas da amilase no quimo, encontradas em animais aos 14 dias de idade.

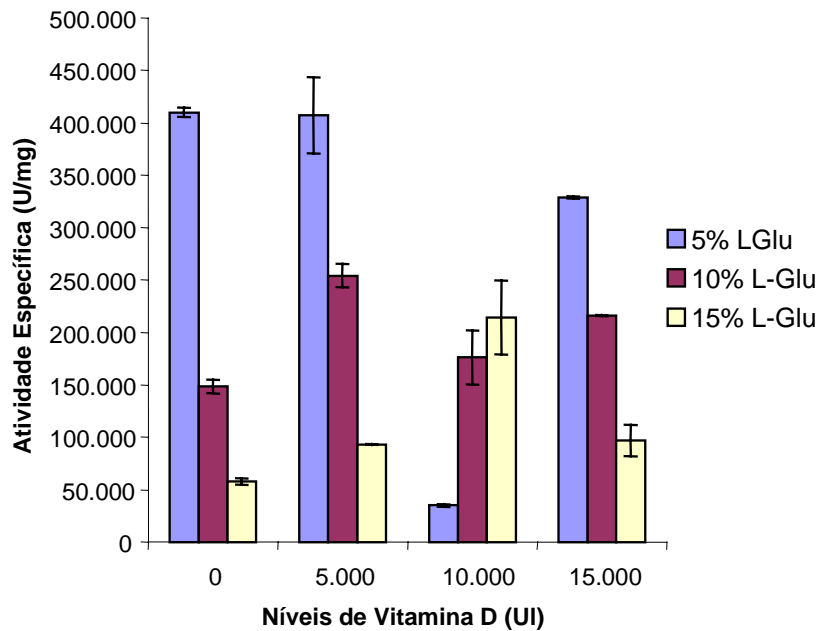


Figura 4 – Atividade específica de amilase do quimo de pintos de corte, machos, Hubbard, alimentados com dietas purificadas suplementadas com 5, 10 e 15% de ácido L-glutâmico (L-Glu), combinados com 0, 5.000, 10.000 e 15.000 UI de vitamina D/kg de dieta, respectivamente 1, 2, 3 e 4, aos 14 dias de idade.

Em geral, os animais alimentados com dietas contendo 5% de ácido L-glutâmico apresentaram os maiores valores de atividade da amilase no quimo. A atividade máxima foi observada em animais alimentados com 5% de ácido L-glutâmico e sem suplementação de vitamina D. O aumento na atividade da enzima foi de 11,62 vezes, quando comparado com o de animais que receberam dietas contendo 10.000 UI de vitamina D.

Em animais que receberam dieta contendo 10% de ácido L-glutâmico foi observado aumento na atividade da amilase quando se aumentaram os níveis de vitamina D de 0 para 5.000 UI, ocorrendo em seguida pequena redução na atividade da enzima quando o nível de vitamina D era de 10.000 UI, voltando a aumentar com 15.000 UI de vitamina D. A atividade máxima observada foi em animais alimentados com 10% de ácido L-glutâmico, combinado com 5.000 UI de vitamina D; esse aumento foi de 1,71 vez, em comparação com os que receberam dietas sem suplementação de vitamina D.

Já nos animais alimentados com dietas contendo 15% de ácido L-glutâmico, foi observado aumento nas atividades da enzima à medida que se aumentava o nível de vitamina D; isto ocorreu até o nível de 10.000 UI de vitamina D, podendo-se observar, em seguida, redução em nível de 15.000 UI de vitamina D. A atividade máxima observada foi em animais alimentados com 15% de ácido L-glutâmico e 10.000 UI de vitamina D. Esta atividade aumentou 3,68 vezes, quando comparada com a de animais que não receberam suplementação de vitamina D.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

Com o objetivo de estudar os efeitos de níveis de nitrogênio não-específico combinados com níveis de vitamina D, um experimento foi conduzido, durante 14 dias, utilizando pintos de um dia, machos, Hubbard, criados em baterias aquecidas com piso de tela elevado e alimentados *ad libitum* com água e dietas experimentais purificadas, contendo todos os aminoácidos essenciais, vitaminas (exceto vitamina D) e minerais em níveis recomendados. O delineamento foi um fatorial 3 x 4 inteiramente casualizado, com quatro repetições de oito pintos cada. Os tratamentos foram formulados pela suplementação da dieta básica com 5,10 e 15% de ácido L-glutâmico, combinados com 0, 5.000, 10.000 e 15.000 UI de vitamina D/kg de dieta. Ao término do experimento, quatro animais de cada tratamento foram sacrificados por deslocamento cervical, e os conteúdos da porção proximal do intestino delgado (quimo) e os pâncreas foram removidos, homogeneizados com solução de HCL, pH 3,0, e imediatamente liofilizados. A seguir, alíquotas de cada amostra foram solubilizadas em água destilada e deionizada, centrifugadas, e o sobrenadante foi utilizado para determinações das atividades enzimáticas de lipase e amilase. As atividades de lipase no pâncreas (LP) e no quimo (LQ) e de amilase no pâncreas (AP) e no quimo (AQ) foram determinadas com *kits* específicos IN VITRO DIAGNOSTICA LTDA. Os dados obtidos neste experimento permitem as seguinte observações:

1. Em dietas com níveis baixos (5%) de nitrogênio não-específico, foi observado aumento na atividade de lipase pancreática de pintos com suplementação de vitamina D.
2. Em dietas com níveis normais e altos (10 e 15%) de nitrogênio não-específico, a atividade de lipase pancreática dos pintos atingiu um máximo com suplementação de 10.000 UI de vitamina D.
3. A atividade da lipase no quimo variou acentuadamente, sem permitir observar alguma tendência.
4. Em dietas com nível baixo ou normal (5 e 10%) de nitrogênio não-específico, a atividade de amilase do pâncreas de pintos aumentou até a suplementação de 5.000 UI de vitamina D, e em níveis vitamínicos superiores houve redução na atividade.
5. Somente foi observada elevação da atividade da amilase do pâncreas de pintos com a suplementação de vitamina D em dietas com elevado teor de nitrogênio não-específico.
6. A atividade da amilase no quimo dos pintos tendeu a valores mais elevados em animais alimentados com baixo nível (5%) de nitrogênio não-específico.
7. Os resultados encontrados permitem observar que a atividade da lipase no quimo foi muito maior que no pâncreas.
8. No caso da atividade da lipase no pâncreas e no quimo, observou-se que, quanto maior o nível de vitamina D, menor o nível de ácido L-glutâmico.
9. A atividade de amilase encontrada no pâncreas foi maior que no quimo, ao contrário da lipase.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMIRALL, M., FRANCESCH, M., PEREZ-VENDRELL., M., BRUFAU, J., ESTEVE-GARCIA, E. The differences in intestinal viscosity produced by barley and β -glucanase alter digesta enzyme activities and ileal nutrient digestibilities more in broiler chicks than in cocks. **J. Nutr.**, v.125, n.4, p.947-955, 1995.
- ANDERSON, J.J.B., TOVERUD, S.U. Diet and vitamin D: a review and emphasis on human function. **J. Nutr. Biochem.**, v.5, n.2, p.58-65, 1994.
- BAINS, B.S. Broilers suffer from dyschondroplasia and femoral necrosis. **World's Poultry Science Journal**, v.50, n.1, p.109-111, 1994.
- BALAZS, R. Control of glutamate metabolism in brain and liver mitochondrial systems. **J. Biol. Chem.**, v.89, n.1, p.44, 1963.
- BARASH, I., NITSAN,Z ., NIR, I. Adaptation of light-bodied chicks to meal feeding: gastrointestinal tract and pancreatic enzymes. **Br. Poult. Sci.**, v.34, n.1, p.35-42, 1993.
- BRANNON, P.M., Adaptation of the exocrine pancreas to diet. **Annu. Rev. Nutr.**, v.10, p.88-105, 1990.

- BREEN, E.C., VAN WIJNEN, A.J., LIAN, J.B., STEIN, G.S., STEIN, J.L. *In vivo* occupancy of the vitamin D responsive element in the osteocalcin gene supports vitamin D-dependent transcriptional upregulation in intact cells. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.91, n.26, p.12902-12906, 1994.
- CAREW, L.B., MACHEMER, R.H., SHARP, R.W., FOSS, D.C. Fat absorption by the very young chick. **Poult. Sci.**, v.51, n.3, p.738-742, 1972.
- CORNÉLIO, L. R. **Efeitos do ácido L-glutâmico e da relação cálcio e fósforo no desempenho e anormalidades de pernas de pintos de corte.** Viçosa: UFV, 1995. 54p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, 1995.
- CORRING, T., BOURDON, D. Exclusion of pancreatic exocrine secretion from intestine in the pig: existence of a digestive compensation. **J. Nutr.**, v.107, n.7, p.1216-1221, 1977.
- De LUCA, H.D. Vitamin D: 1993. **Nutrition Today**, November/December, v.28, n.6, p.6-11, 1993.
- DESAI, R.K., VAN WIJNEN, A.J., STEIN, J.L., STEIN, G.S., LIAN, J.B. Control of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor-mediated enhancement of osteocalcin gene transcription: effects of perturbing phosphorylation pathways by okadaic acid and staurosporine. **Endocrinology**, v.136, n.12, p.5685-5693, 1995.
- ESCRIBANO, F., RAHN, B.E., SELL, J. Development of lipase activity in yolk membrane and pancreas of young turkeys. **Poult. Sci.**, v.67, n.7, p.1089-1097, 1988.
- FEATHERTON, W.R. Adequacy of glutamic acid synthesis by the chick for maximal growth. **Poult. Sci.**, v.55, n.6, p.2479-2480, 1976.
- FREEDLAND, R.A., MARTIN, K.D., MCFARLAND, L.Z. A survey of glutamic dehydrogenase activity in four tissues of normal and starved coturnix. **Poult. Sci.**, v.45, n.5, p.985-991, 1966.
- GREEN, G.M., LYMAN, R.C. Feedback regulation of pancreatic enzyme secretion as a mechanism for trypsin inhibitor induced hypersecretion in rats. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.140, n.1, p.6-12, 1972.
- GUIMARÃES, V.M. **Efeito de aminoácidos dispensáveis e indispensáveis no desempenho e anomalias das pernas de pintos de corte.** Viçosa: UFV, 1988. 54p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, 1988.

- GUIMARÃES, V.M., MORAES, G.H.K. de, FONSECA, J.B., ROSTAGNO, H.S. Efeitos de aminoácidos não essenciais no desenvolvimento e incidência de problemas de pernas em pintos de corte. **Rev. Soc. Bras. Zootec.**, v.22, n.4, p.699-705, 1993a.
- GUIMARÃES, V.M., MORAES, G.H.K., FONSECA, J.B., ROSTAGNO, H.S. Efeitos do ácido L-glutâmico, L-prolina e L-lisina da dieta no desenvolvimento e incidência de problemas de pernas em pintos de corte. **Rev. Soc. Bras. Zoot.**, v.22, n.4, p.584-590, 1993b.
- GUIMARÃES, V.M., MORAES, G.H.K., FONSECA, J.B., ROSTAGNO, H.S. Efeitos de aminoácidos não essenciais da dieta sobre glutamato-oxaloacetato transaminase hepática e composição química parcial de tíbias e fêmures de pintos de corte. **Rev. Soc. Bras. Zoot.**, v.25, n.3, p.481-493, 1996.
- GUIMARÃES, V.M., RIBEIRO, M., MORAES, G. H. K. Effects of dietary non essential amino acids and pyridoxine in the chick liver glutamic-oxaloacetate transaminase activities. In: REUNIÃO ANUAL DA SBBQ, 26, 1997, Caxambu. **Anais...**, São Paulo: USP, 1997. p.26.
- HAUSCHKA, P.V., LIAN, P.V., GALLOP, P.M. Alterations of the gamma-carboxyglutamic acid and osteocalcin concentrations in vitamin D-deficient chick bone. **J. Biol. Chem.**, v.257, n.9, p.4999-5003, 1982.
- HAUSSLER, M.R. Vitamin D receptors: nature e function. **Ann. Rev. Nutr.**, v.6, p.527-562, 1986
- HENRY, M., NORMAN, A.W. Vitamin D: metabolism and biological actions. **Annu. Rev. Nutr.**, v.4, p.493-520, 1984.
- HULAN, H. W. & BIRD, F. H. Effect of fat level in isonitrogenous diets on the composition of avian pancreatic juice. **J. Nutr.**, v.102, n.4, p.459-468, 1972.
- IKEGAMI, S., TSUCHIHASHI, F., HARADA, H., TSUCHIHASHI, N., NISHIDE, E., INNAMI, S. Effect of viscous indigestible polysaccharides on pancreatic-biliary secretion and digestive organs in rats. **J. Nutr.**, v.120, p.353-360, 1990.
- IKENO, T., IKENO, K. Amylase activity increases in the yolk of fertilized eggs during incubation in chickens. **Poult. Sci.**, v.70, n.10, p.2176-2179, 1991.
- JIN, S., CORLESS, A., SELL, J.L. Digestiva system development in post-hatch poultry. **World's Poult. Sci. J.**, v.54, n.4, p.335-345, 1998.
- KREBS, H.A., BELLAMY, D. The interconversion of glutamic acid and aspartic acid in respiring tissues. **J. Biochem.**, v.75, p.523-529, 1960

- KROGDAHL, A., SELL, L. Development of digestive enzymes and fat digestion. In: WORLD POULTRY CONGRESS, 17, 1984, Helsinki. **Proceedings...** Helsinki: 1984. p.52-354.
- KROGDAHL, A., SELL, J.L. Influence of age on lipase, amylase, and protease activities in pancreatic tissue and intestinal contents of young turkeys. **Poult. Sci.**, v.68, n.11, p.1561-1568, 1989.
- LEE, D.J.W., REAPER, L. 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.
- LEPKOVSKY, S., WAGNER, M., FURUTA, F., OZONE, K., KOIKE, T. The proteases, amylase and lipase of the intestinal contents of germ-free and conventional chickens. **Poult. Sci.**, v.43, n.3, p.722-733, 1964.
- LU, J., COMBS, G.F. Effect of excess dietary zinc on pancreatic exocrine function in the chick. **J. Nutr.**, v.118, n.6, p.681- 689,1988.
- MARCHAIM, U., KULKA, R.G. The non-parallel increase of amylase, chymotrypsinogen and procarboxypeptidase in the developing chick pancreas. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.164, p.553-559, 1967.
- MARUYAMA, K., SUNDE, M.L., HARPER, A.E. Is L-glutamic acid nutritionally a dispensable aminoacid for the young chick? **Poult. Sci.**, v.55, n.1, p.45-60, 1976.
- MERKE, J., KLAUS, G., HUGEL, U. WALDHERR, R., RITZ, E. No 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptores on osteoclasts of calcium-deficient chicken despite demonstrable receptors on circulating monocytes. **J. Clin. Invest.**, v.77, p.312-314, 1986.
- McDOWELL, L.R. **Vitamins in animal nutrition. Comparative aspects to human nutrition.** New York, Academic Press,1989. 486p.
- MORAES, G.H.K., PERINI, D.T., OLIVEIRA, T.T, MIRANDA, L.C.G., REIS. F.P., ROSTAGNO, H.S. Efeitos do ácido L-glutâmico e vitamina D₃: sobre desempenho e anormalidades das pernas de pintos de corte. **R. Bras. Zootec.**, v.26, n.4, p.773-778, 1997.
- MORAES, G.H.K. **Studies on non-specific nitrogen and D-aminoacid metabolism in the chicks.** West Laffayette: Purdue University, 1980. 117p. These (Ph.D.) - Purdue University, 1980.

- MORAES, G.H.K., ROGLER, J.C., FEATHERSON, W.R. Effects of a nonspecific deficiency on growth rate and leg problems in chicks. **Poult. Sci.**, v.63, n.2, p.344-353, 1984.
- MORAES, G.H.K. de, ROGLER, J.C., FEATHERSTON, W.R. Effects of D-amino acid oxidase in chicks. **Poult. Sci.**, v.66, n.1, p.98-102, 1987.
- NIR, I., TWINA, Y., GROSSMAN, E., NITSAN, Z. Quantitative effect of pelleting on performance, gastrointestinal tract and behaviour of meat-type chickens. **Br. Poult. Sci.**, v.35, n.4, p.589-602, 1994.
- NIR, I., NITSAN, Z., VAX, A. The influence of force feeding and supplementation on the metabolisable energy of diets, digestibility of nutrients, nitrogen retention and digestive enzymes output in geese. **Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique**, v.13, p.465-479, 1973.
- NITSAN, Z., BEN-AVRAHAM, G., ZOREF, Z., NIR, I. Growth and development of the digestive organs and some enzymes in broiler chicks after hatching. **Br. Poult. Sci.**, v.32, n.3, p.515-523, 1991a.
- NITSAN, Z., DUNNINGTON, E., SIEGEL, P.B. Organ growth and digestive enzyme levels to fifteen days of age in lines of chickens differing in body weight. **Poult. Sci.**, v.70, n.10, p.2040-2048, 1991b.
- NITSAN, Z., TURRO-VINCENT, LIU, G., DUNNINGTON, E., SIEGEL, P.B. Intubation of weight-selected chicks with soybean oil or residual yolk: effect on early growth and development. **Poult. Sci.**, v.74, n.6, p.925-936, 1995.
- NORMAN A.W. The mode of action of vitamin D. **Biol. Rev.**, v.43, p.97-137, 1968.
- NORMAN, A.W., HURWITZ, S. The role of vitamin D endocrine system in avian bone biology. **J. Nutr.**, v.123, n.2, p.310-316, 1993.
- NORMAN, A.W., ROTH, J., ORCI, L. The vitamin D endocrine system: steroid metabolism, hormone receptors and biological response. **Endocr. Rev.**, v.3, p.331-366, 1982.
- NOY, Y., SKLAN, D. Digestion and absorption in the young chick. **Poult. Sci.**, v.74, n.3, p.366-373, 1995.
- O'SULLIVAN, N.P., DUNNINGTON, E.A., LARSEN, A.S., SIEGEL, P.B. Correlated responses in lines of chickens divergently selected for fifty-six-day body weight. 3. Digestive enzymes. **Poult. Sci.**, v.71, n.4, p.610-617, 1992.

- OLIVEIRA, J.E., OLIVEIRA, M.G.A., MORAES, G.H.K., DONZELE, J.L., MOURA, G.S. Development of pancreas amylase and lipase activities in piglets. In: REUNIÃO ANUAL DA SBBQ, 25, 1996, Caxambu. **Anais...** São Paulo: USP, 1996. p.28.
- LIVEIRA, J.E., OLIVEIRA, M.G.A., MORAES, G.H.K., DONZELE, J.L., MOURA, G.S. Effects of weaning at different ages on pancreas amylase and lipase activities in piglets. In: REUNIÃO ANUAL DA SBBQ, 25, 1996, Caxambu. **Anais...** São Paulo: USP, 1996. p.28.
- PERINI, D.T. **Efeitos do ácido L-glutâmico e da vitamina D₃ no desempenho e anormalidades das pernas de pintos de corte.** Viçosa: UFV, 1993. 94p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, 1993.
- PIKE, J.W., SLEATOR, N.M. Hormone- dependent phosphorylation on the 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor in mouse fibroblasts. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.131, n.1, p.378-385, 1985.
- POLIN, D., HUSSEIN T.H. The effect of bile acid on lipid and nitrogen retention carcass composition, and dietary metabolizable energy in very young chicks. **Poult. Sci.**, v.61, n.8, p.1697-1707, 1982.
- POLS, H.A., BIRKENHAGER, J.C., FOEKENS, J.A., VAN LLUWEN, P.T. Vitamin D: modulador of cell proliferation and differentiation. **Biochem. Molec. Biol.**, v.37, n.6, p.873-876, 1990.
- PRICE, P.A., BAUKOL, S.A. 1,25-dihydroxy vitamin D₃ increases synthesis of the vitamin-K-dependent bone protein by osteosarcoma cells. **J. Biol.Chem.**, v.255, n.24, p.11660-11663, 1980.
- PRICE, P.A., OTSUKA, A.S., POSER, J.W., KRISTAPONIS, J., RAMAN, N. Characterization of a gama- carboxyglutamic acid-containing protein from bone. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.73, n.5, p.1447-1451, 1976.
- PUBOLS, M.H. Ratio of digestive enzymes in chick pancreas. **Poult. Sci.**, v.70, n.2, p.337-342,1991.
- RIBEIRO, M. **Efeitos de fontes e níveis de nitrogênio não-específico no desenvolvimento e incidência de anomalias nas pernas de pintos de corte.** Viçosa: UFV, 1990. 82p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, 1990.
- RIBEIRO, M., MORAES, G.H.K., FONSECA, J.B. Efeitos de fontes e níveis de nitrogênio não-específico em dietas purificadas no desenvolvimento de pintos de corte. **Rev. Soc. Bras. Zoot.**, v.24, n.5, p.88-98, 1995a.

- RIBEIRO, M., MORAES, G.H.K., FONSECA, J.B. Efeitos de ácido L-glutâmico, L-alanina e L-prolina da dieta em pintos de corte: I - Desempenho, incidência de problemas de pernas e composição química de fêmures. **Rev. Soc. Bras. Zoot.**, v.24, n.5, p.768-777, 1995b.
- RIBEIRO, M., MORAES, G.H.K., SANT'ANNA, R., FONSECA, J.B. Efeitos de ácido L-glutâmico, L-alanina e L-prolina da dieta em pintos de corte: II - Glutamato desidrogenase (GDH) hepática, aminoácidos e ácidos e ácido úrico séricos. **Rev. Soc. Bras. Zoot.**, v.24, n.5, p.778-787, 1995c.
- ROBERTSON, K.D., EDWARDS, H.M. Effects of ascorbic acid and 1,25-dihydroxycholecalciferol on alkaline phosphatase and tibial dyscondroplasia in broilers chickens. **Br. Poult. Sci.**, v.35, n.5, p.763-773, 1994.
- RODRIGUES, A.C.P., MORAES, G.H.K. Efeitos de ácido L-glutâmico e de Vitamina K da dieta no desempenho e nas anomalias das pernas de pintos de corte. **Rev.Ceres**, v.42, n.248, p.270-278, 1995.
- RODRIGUES, A.C.P., MORAES, G.H.K., ROSTAGNO, H.S., FONSECA, J.B. Efeitos do ácido L-glutâmico e da vitamina K no comprimento e na composição química parcial de tíbias e fêmures de pintos de corte. **Rev. Ceres**, v.43, n.249, p.567-580, 1996.
- SCOTT, H.M., NESHEIN, M.C., YOUNG, R.J. **Nutrition of the chickens**. 2.ed. Ithaca, M.L. Scott & Associates, 1976. p.285-304.
- SELL, J.L., ANGEL, C.R., PIQUER, F.J., MALLARINO, E.G., AL-BATSHAN. Development patterns of selected characteristics of the gastrointestinal tracts of young turkey poults. **Poult. Sci.**, v.70, n.5, p.1200-1205, 1991.
- SILVA, F.A., MORAES, G.H.K. Effects of L-glutamic acid on growth and partial chemical composition of tibia and femur of chicks. In: REUNIÃO ANUAL DA SBBQ, 24, 1995, Caxambu. **Anais...** São Paulo: SBBQ, 1995. p.52.
- SOARES, J.M., OLIVEIRA, M.G.A., DONZELE, J.L., MORAES, G.H.K. Atividade enzimática da tripsina e quimotripsina do pâncreas e do quimo de leitões do nascimento aos 35 dias de idade. **Rev.Ceres**, v.46, n.264, p.125-139, 1999.
- SOARES, J. M., OLIVEIRA, M. G. A., MORAES, G. H. K. de, DONZELE, J. L. Trypsin and chymotrypsin development in piglets. In: REUNIÃO ANUAL DA SBBQ, 24, 1995, Caxambu. **Anais...** São Paulo: USP, 1995. p.51.
- SOARES, J. M., OLIVEIRA, M.G.A., DONZELE, J.L., MORAES, G.H.K. Effects of weaning at different ages on trypsin and chymotrypsin activities of piglets. In: REUNIÃO ANUAL DA SBBQ, 24, 1995, Caxambu. **Anais...** São Paulo: USP, 1995. p.52.

- SPIESS, Y.H., PRICE, P.A., DEFTOS, J.L., MANOLAGAS, S.C. Phenotype-associated changes in the effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on alkaline phosphatase and bone Gla-protein of rat osteoblastic cells. **Endocrinology**, v.118, n.4, p.1340-1346, 1986.
- SUDA, T., SHINKI, T., TAKAHASHI, N. The role of vitamin D in bone and intestinal cell differentiation. **Ann. Rev. Nutr.**, v.10, p.195-211, 1990.
- SUGAHARA, H., ARIYOSHI, S. The nutritional value of the individual non essential amino acid as the nitrogen source in the chick nutrition. **Agric. Biol. Chem.**, v.31, p.1270-1276, 1967.
- VAIANO, S.A, AZUOLAS, J.K., PARKINSON, G.B., SCOTT, P.C. Serum calcium, phosphorus, 1,25-dihydroxycholecalciferol, and endochondral ossification defects in commercial broiler chickens. **Poult. Sci.**, v.73, n.8, p.1296-1305, 1994.
- WHITEHEAD, C.C., FISHER, C. The utilization of various fats by turkeys of different ages. **Br. Poult. Sci.**, v.16, n.5, p.481-485, 1975.
- WIDEMAN JR., R.F. Renal regulation of avian calcium and phosphorus metabolism. **J. Nutr.**, v.117, n.4, p.808-815, 1987.
- YANG, S., MURAMATSU, T., TASAKI, I., OKUMURA, J. Studies on pancreatic digestive enzyme secretion in response to wing vein injection of cholecystokinin and nutrients in chicks. In: WORLD'S POULTRY CONGRESS, 18, 1988, Nagoya. **Proceedings**... Nagoya: 1988. p.871-872.