

**ANA CLAUDIA PERES RODRIGUES**

**NÍVEIS DE ÁCIDO L-GLUTÂMICO E DE VITAMINA K NO  
DESEMPENHO E DEFORMIDADES ÓSSEAS E PERFIL DE ENZIMAS  
DIGESTIVAS DE PINTOS DE CORTE ALIMENTADOS  
COM DIETAS PURIFICADAS**

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

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2001**

ANA CLAUDIA PERES RODRIGUES

NÍVEIS DE ÁCIDO L-GLUTÂMICO E DE VITAMINA K NO  
DESEMPENHO E DEFORMIDADES ÓSSEAS E PERFIL DE ENZIMAS  
DIGESTIVAS DE PINTOS DE CORTE ALIMENTADOS  
COM DIETAS PURIFICADAS

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

APROVADA, 29 DE JANEIRO DE 2001

-----  
Prof. Luiz Fernando Teixeira Albino  
(Conselheiro)

-----  
Prof. Horácio Santiago Rostagno  
(Conselheiro)

-----  
Prof. Maria Goreti de Almeida Oliveira

-----  
Prof. Cláudio César Fonseca

-----  
Prof. George Henrique Kling de Moraes  
(Orientador)

Ao Marcos, companheiro e cúmplice de todos os sonhos  
À Letícia, fonte de inúmeras surpresas e infinitas alegrias.

## **AGRADECIMENTO**

À Universidade Federal de Juiz de Fora pela oportunidade para a realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa, 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.

À ROCHE, pela doação das misturas vitamínicas utilizadas nas dietas.

Aos professores do Departamento de Bioquímica da UFJF, Elita, Walkiria, Eveline, Nobouiki, José Celso, Noemidis, Cláudio, Amauri e Everton, pela amizade e por terem assumido o trabalho adicional durante a minha ausência.

Ao professor do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, George Henrique Kling de Moraes, meu orientador, pelo apoio, amizade, orientação e ensinamentos transmitidos.

Aos professores de Departamento de Zootecnia, Luiz Fernando Teixeira Albino e Horácio Santiago Rostagno, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Maria Goreti de Almeida Oliveira, e do Departamento de Veterinária, Cláudio César Fonseca, pela contribuição para a realização deste projeto de pesquisa.

Aos funcionários do Aviário, Adriano, Elísio e Tiãozinho, pela colaboração na montagem do experimento.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Eduardo, Sr Geraldo e Solange pelo atendimento sempre gentil.

Ao funcionário do Laboratório de Bioquímica Animal Jefferson, pela amizade e colaboração nas análises de laboratório.

Aos colegas da pós-graduação Fernanda, Carlos Godim, Flávia, Cristina, Cibele, Heloísa e Flavio, pela amizade.

Aos meus pais Jeremias e Dirce; sogros Leo e Lecy; irmãs Júnia e Fernanda; cunhados Márcio, Marinho, Pedro, Marcinho, Nonô e Artur; cunhadas Rita, Adriana, Lucy, Carla e Regina e sobrinhos Pedro Vitor, Ana Luiza, Isabela, Priscila, Xande, Leo, Jéssica , Igor, Vinícius, Adolfo e Cleuberson pelo carinho e incentivo.

Ao Marquinhos, pelo amor, companheirismo e compreensão, e à Letícia, pela alegria, paciência e eterno aprendizado.

## **BIOGRAFIA**

ANA CLAUDIA PERES RODRIGUES, filha de Jeremias Rodrigues Homem e Dirce Peres Rodrigues, nasceu em 20 de agosto 1963, em Coronel Fabriciano, Minas Gerais.

Em janeiro de 1981, ingressou no Curso de Farmácia e Bioquímica, na Universidade Federal de Juiz de Fora, concluindo-o em março de 1985.

Em agosto 1991, concluiu o Curso de Mestrado em Agroquímica na Universidade Federal de Viçosa, UFV, em Viçosa, MG.

Em fevereiro de 1994, ingressou na Universidade Federal de Juiz de Fora como professora assistente, do Departamento de Bioquímica

Em agosto de 1996 iniciou o Curso de Doutorado em Zootecnia na UFV, defendendo tese em janeiro de 2001.

## ÍNDICE

	Página
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
INTRODUÇÃO GERAL	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
2.1. Dieta purificada	6
2.2. Tecido ósseo	9
2.3. Problemas de pernas	14
2.4. Vitamina K	17
2.5. Proteínas não colagenosas	19
2.6. Secreções digestivas	21
2.7. Processo digestivo	22
2.8. Enzimas digestivas ( $\alpha$ -amilase, lipase e tripsina)	24
2.9. Alterações do aparelho digestório durante o desenvolvimento	25
CAPÍTULO 1 – EFEITOS DOS NÍVEIS DE ÁCIDO L-GLUTÂMICO E DE VITAMINA K NO DESEMPENHO E PROBLEMAS DE PERNAS PINTOS DE CORTE	28
1. INTRODUÇÃO	28
2. MATERIAL E MÉTODOS	31
2.1. Procedimentos gerais	31
2.2. Avaliação da incidência de problemas de pernas	32

2.3. Análise estatística	32
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
3.1. Desempenho	35
3.2. Problemas de pernas	37
4. RESUMO E CONCLUSÕES	39
CAPÍTULO-2 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E TEORES DE CINZAS, Ca, P E Mg DE TIBIOTARSOS E FÊMURES DE PINTOS DE CORTE	41
1,INTRODUÇÃO	41
2. MATERIAIS E MÉTODOS	44
2.1. Procedimentos gerais	44
2.2. Determinação das características físicas dos ossos	47
2.3. Determinação de cinzas e minerais nas cinzas	47
2.4. Análise estatística	47
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
3.1. Características físicas de tibiotarsos e fêmures: comprimento e resistência à quebra	48
3.2. Porcentagem de cinzas de tibiotarsos	51
3.3. Teores de cálcio, fósforo, magnésio e relação Ca:P nas cinzas de tibiotarso e fêmur	52
4. RESUMO E CONCLUSÕES	55
CAPÍTULO 3 –TEORES DE PROTEÍNAS COLAGENOSAS, NÃO COLAGENOSAS E TOTAIS DE TIBIOTARSOS E FÊMURES DE PINTOS DE CORTE	57
1. INTRODUÇÃO	57
2. MATERIAIS E MÉTODOS	59
2.1. Procedimentos gerais	59
2.2. Análise bioquímica nos ossos	62
2.3. Análise estatística	62
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
3.1. Proteínas não colagenosas, colagenosas e totais de tibiotarsos e fêmures	63
4. RESUMO E CONCLUSÕES	69

CAPÍTULO 4 – ANÁLISE HISTOLÓGICA DE TIBIOTARSO DE PINTOS DE CORTE AOS 14 DIAS DE IDADE	71
1. INTRODUÇÃO.	71
2. MATERIAIS E MÉTODOS	74
2.1. Procedimentos gerais	74
2.2. Preparo da lâminas	77
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
3.1. Comprimento do canal medular e espessura do osso compacto da diáfise	78
3.2 Comprimento e organização do disco epifisário de tibiotarso	82
4. RESUMO E CONCLUSÕES	87
CAPÍTULO 5 – PERFIL ENZIMÁTICO DE $\alpha$ -AMILASE, LIPASE E TRIPSINA E CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DO INTESTINO DELGADO DE PINTOS DE CORTE	88
1.INTRODUÇÃO	88
2. MATERIAIS E MÉTODOS	90
2.1. Procedimentos gerais	90
2.2. Características físicas e histológicas	93
2.3 Coleta e preparo de pâncreas e quimo	93
2.4. Determinação da atividade de enzimas digestivas	94
2.5. Análise estatística	95
3.RESULTADOS E DISCUSSÃO	96
3.1. Características físicas e histológicas	96
3.2. Atividade de $\alpha$ -amilase, lipase e tripsina no quimo	100
3.3. Atividade de $\alpha$ -amilase, lipase e tripsina no pâncreas	101
4. RESUMO E CONCLUSÕES	105
RESUMO E CONCLUSÕES GERAIS	107
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111
APÊNDICE	123

## RESUMO

RODRIGUES, Ana Claudia Peres, D.S., Universidade Federal de Viçosa, janeiro de 2001. **Níveis de ácido L-glutâmico e de vitamina K no desempenho e deformidades ósseas e perfil de enzimas digestivas de pintos de corte alimentados com dietas purificadas.** Orientador: George Henrique Kling de Moraes. Conselheiros: Luiz Fernando Teixeira Albino e Horácio Santiago Rostagno.

Foram utilizados 256 pintos de corte, de um dia, machos, Avian Farm, por um período de 14 dias, com peso médio inicial de 48,0 g, criados em baterias aquecidas com piso de tela elevado. O delineamento experimental foi um esquema fatorial inteiramente casualizado 2 x 4 ( 2 níveis de L-glutâmico x 4 níveis de vitamina K), consistindo de 8 tratamentos, 4 repetições de 8 aves cada. Os tratamentos consistiram de uma dieta básica purificada contendo todos os L-aminoácidos indispensáveis, minerais e vitaminas (exceto a Vit. K) suplementada com a combinação de 2 níveis (6,25 e 12,5 %) de L-glutâmico (L-Glu), com 4 níveis (0,02; 0,2 2,0 e 20,0 mg/kg de dieta) de vitamina K (Vit. K). Os animais receberam as dietas e água à vontade durante todo o período experimental de 14 dias. Para o estudo enzimático o período experimental foi estendido por mais uma semana totalizando 21 dias. Não foram observados efeitos significativos da interação L-Glu X Vit. K no desempenho dos animais e na composição química e bioquímica de tibiotarsos e fêmures. Os níveis de Vit. K não afetaram os parâmetros de desempenho, composição química e características físicas

(comprimento e resistência) não afetando também os teores de Proteínas Totais (PT) dos tibiotarsos e fêmures. Os níveis de L-Glu não afetaram o consumo das aves, a resistência, a composição química e os teores de PT dos ossos. As aves alimentadas com dietas experimentais contendo 12,5% de L-Glu apresentaram maior ganho de peso (172 g), melhor conversão alimentar (1,51), menor incidência de problemas de pernas (26,8%), ossos maiores (fêmures, 36,8 mm e tibiotarsos, 51,5 mm), menores teores de proteínas não colagenosas (PNC) (3,16mg% tibiotarsos, e 3,23mg%, fêmures) e maiores teores de proteínas colagenosas (PC) (27,47mg%, tibiotarsos e 27,44 mg%, fêmures) do que aquelas alimentadas com dietas suplementadas com 6,25 % de L-Glu que apresentaram ganho de peso médio de 158g, conversão alimentar de 1,60, 100 % de incidência de problemas de pernas, tibiotarsos medindo 47,4 mm e fêmures 32,1 mm, teores de PNC de 4,03 mg% (tibiotarso) e 4,02 mg% (fêmur) e teores de PC de 26,60 mg% (tibiotarso) e 26,58 mg%, (fêmur). Observou-se efeito quadrático dos níveis de Vit. K nos teores de PNC e PC, sendo que para PNC o efeito foi decrescente e para PC crescente. Os animais alimentados com dietas suplementadas com 12,5% de L-Glu apresentaram maior espessura do osso compacto e maior diâmetro do canal medular, do que aqueles alimentados com 6,25% de L-Glu. As diferenças observadas entre os tratamentos em relação aos níveis de Vit. K não foram significativas. O menor comprimento médio do disco epifisário e alto nível de organização foi obtido com 12,5% de L-Glu, independente dos níveis de Vit. K. Em relação ao peso dos órgãos e características histológicas do intestino delgado observou-se que o máximo de peso relativo para os órgãos (fígado, pâncreas e intestino) foi encontrado no 14<sup>o</sup> dias de idade. O peso absoluto aumentou continuamente durante o período experimental e os parâmetros morfométricos (altura de vilo, profundidade de cripta e espessura de membrana) aumentaram com a idade. O perfil de enzimas digestivas apresentou-se da seguinte forma: as atividades de  $\alpha$ -amilase e lipase tanto no quimo como no pâncreas, quando expressa por 100 g de peso corporal aumentaram com a idade. A atividade de tripsina no quimo não se alterou com a idade, e no pâncreas a maior atividade foi observada no 21<sup>o</sup> dia de idade

## ABSTRACT

RODRIGUES, Ana Claudia Peres, D.S., Federal University of Viçosa, Janeiro, 2001. **Dietary Levels of L-Glutamic Acid and Vitamin K on Broiler Chick Performance.** Adviser: George Henrique Kling de Moraes. Committee Members: Luiz Fernando Teixeira Albino and Horácio Santiago Rostagno.

In order to study the effects of L-glutamic (L-Glu) acid and vitamin K (Vit. K) on growth, leg abnormalities, bone biochemical and chemical composition, development of the digestive tract and activities of digestive enzymes, one experiment was conducted with 246 day old chicks, male, Avian Farm, fed purified L-aminoacid diets with two levels (6.25 and 12.5 %) of (L-Glu) combined with four levels (0.02; 0.2; 2.0 and 20.0 mg/kg of diet) of menadione sodium bisulfite (Vit. K). The trial was a 2 x 4 factorial in a completely randomized design using 4 replicates of 8 chicks each. Chicks were fed the experimental diets and water *ad libitum* from one to 14 days of age. For the study development of chick digestive tract and activities of digestive enzymes, the experimental period was from 1 to 21 days of age. No significant L-Glu X Vit. K interaction was observed on growth and biochemical and chemical composition and bone strenght of tibiotarsus and femur. No significant L-Glu X Vit. K interaction and no Vit. K effects were observed in the chick performance. Chicks fed 12.5 % showed higher weigth gains, better feed/gain rations and lower incidence of leg problems than those fed 6.25% L-Glu. Feed consumption was not affected by the levels of L-Glu. Chicks fed with 12.5 % de L-Glu and 2.0 mg of Vit. K/kg of diet showed the lowest leg abnormalities incidence (14.3 %). L-Glu, at 12.5 % level, improved performance and

reduced the incidence of leg problems. The data obtained confirmed that the dietary level of nonspecific nitrogen is important for the normal chick development. The ash, Ca, P and Mg contents, Ca:P ratio of the femur and tibiotarsus ash and bone strength were not affected by the levels of L-Glu and Vit K studied. Chicks fed 12.5 % L-Glu had longer femur than those fed 6.25 % L-Glu. Based upon the data observed in this experiment, it appears that leg abnormalities of young chicks fed purified diets is not associated with the mineral contents of femur but, probably, could be related with the organic matrix of the bone. Chicks fed 6.25 % de L-Glu showed higher levels of non collagen proteins (NCP) and lower contents of collagenous proteins (CP) in femur and tibiotarsus than those fed 12.5 % de L-Glu. It was observed quadratic effects of levels of vitamin K in the contents of NCP and CP of femur and tibiotarsus. Chicks fed 12.5 % L-Glu had longer length of compact bone and longer diameter of medullary canal than those fed 6.25 % de L-Glu. No Vit. K effects were observed on parameters studied. The lower length of epiphyseal growth plate and better plate organization level were observed with chicks fed 12.5 % of L-Glu independently of the Vit. K levels. Chicks fed 6.25 % of L-Glu and 0.2 mg of Vit. K/kg of diet showed presence of cartilage in the bone diaphysis. Examination of the morphology of the small intestine showed that morphometric values increased with age. The maximal relative weights of pancreas, liver and intestine were at 14 days of age. Absolute weights increased linearly during the experimental period. The results observed showed that specific activities of amylase and lipase of chyme were not changed among 14 and 21 day of age. But activities expressed per kg body weight increased with age. Specific activities of trypsin did not change during the experimental period. But specific activities of trypsin per kg body weight showed a maximum value at 21<sup>st</sup> day and the activities on day 7 and 14 did not change. Specific activities of amylase of pancreas were higher at 14<sup>th</sup> day than the other ages. Specific activities of lipase of pancreas were higher at hatching. Amylase and lipase activities per kg body weight increased with age. Specific activities of trypsin of pancreas did not change during the experimental period. But when expressed per kg of body weight, the maximal values were obtained at 14<sup>th</sup> day. The activities on day 7 and 21 were similar.

## INTRODUÇÃO

As anormalidades do tecido ósseo têm sido problema desde o início da produção confinada das aves. A incidência destes problemas, principalmente frangos de corte, não tem decrescido nos últimos 40 anos, apesar dos avanços científicos e tecnológicos no melhoramento genético, nutrição e controle sanitário que têm possibilitado à indústria avícola, obter resultados técnicos e econômicos melhorados.

A evolução da produtividade em frangos de corte permite a produção de aves com peso médio de 2421g em 47,7 dias. Neste ritmo de desenvolvimento genético há condições de se obter um frango de 2100g em 38 dias. Todavia aspectos importantes têm sido levantados pelos pesquisadores, as limitações fisiológicas, problemas cardio-pulmonares e ósseos, dentre outros, que dificultam o aumento excessivo do peso de frangos (ALBUQUERQUE e RODRIGUES, 1995).

Os primeiros sinais dos problemas de pernas ou síndrome das pernas tortas surgiram na década de sessenta, nos aviários de perus para produção de carne. Na década de setenta o problema aumentou e passou a ser estudado visando a sua eliminação. Apesar dos intensos esforços de pesquisa e da adoção de modernas práticas de sanidade, nutrição, manejo e ambiente, a incidência desses problemas não tem se alterado. (TARDIM, 1995).

Os problemas locomotores causam perdas econômicas significativas para a avicultura de corte. No Brasil, poucos levantamentos detalhados são encontrados na literatura quantificando esses prejuízos. As perdas nas explorações comerciais devido a fragilidade do tecido ósseo podem ocorrer desde o período inicial de criação, por um manejo inadequado ou por uma deficiência nutricional. Do sexto ao oitavo dia de vida podem começar a aparecer os primeiros sintomas das pernas tortas, sendo que na segunda semana de vida ocorre um agravamento acentuado das lesões. Também durante o período de engorda, antes do abate, certo percentual de aves poderá ser eliminado devido a um enfraquecimento geral na estrutura óssea que não atinge o peso ideal. Carcaças podem ser eliminadas na fase de processamento, no abatedouro, por não resistirem ao processamento, também devido ao enfraquecimento do tecido ósseo. Foi estimado que a avicultura brasileira chega a perder aproximadamente 12 mil toneladas de carne de frango por ano a nível de abatedouro devido à problemas ósseos não solucionados, representando uma perda de 1% dos frangos de corte produzidos pela indústria avícola (SILVA, 1979).

Problemas ósseos são apontados como um dos fatores que limitam a performance de aves tipo carne. Frangos e perus de rápido crescimento, que ganham peso marcadamente com idade mais jovem, são os que têm mais problemas de pernas e maiores perdas comparados com aves de crescimento mais tardio (DAY, 1990).

A seleção para características como ganho de peso acelerado, principalmente massa muscular com pouca gordura, tem colocado demandas crescentes sobre o sistema ósseo (ALBERS, 1994).

O crescimento dos ossos, cartilagens, tendões é normalmente uma seqüência ordenada de eventos, incluindo a proliferação e diferenciação de células e a formação da matriz óssea. As anormalidades do crescimento ósseo do frango de corte moderno parecem resultar da perda de controle metabólico desses eventos (THORP, 1994).

Atualmente, problemas de pernas resultantes de deficiências de vitaminas e minerais são relativamente raros e, geralmente, resultantes de erros na formulação e/ou preparo das rações. Tem sido sugerido que o frango moderno cresce tão rapidamente que o sistema esquelético não se desenvolve com a rapidez necessária para suportar o peso das aves (LILBURN, 1994).

Aves submetidas a dietas purificadas com baixo teor de aminoácidos não essenciais (5% L-Glu), por um período de duas semanas, apresentam alta incidência de problemas de pernas. Com a elevação do teor de ácido L-glutâmico de 5 para 12,5%, como fonte de nitrogênio, ocorre uma redução na incidência desses problemas (MORAES et al., 1984).

Foi observado uma relação entre as anomalias do tecido ósseo das pernas de aves e os teores de proteínas não colagenosas. Os animais com alta incidência de problemas de pernas apresentavam altos teores de proteínas não colagenosas (GUIMARÃES, 1988; RIBEIRO, 1990; RODRIGUES, 1992 e PERINI, 1993) . Dentre essas proteínas, três têm sido identificadas como Gla-proteínas, osteocalcina, Gla-proteína da matriz e proteína S, sendo que somente a osteocalcina é exclusivamente sintetizada pelos osteoblastos (HAUSCHKA et al., 1989). In vitro, a osteocalcina liga-se fortemente a cristais de hidroxapatita e é um potente inibidor da sua formação. No osso, a osteocalcina ocorre em clara associação com a matriz mineralizada, via a  $\alpha$  hélice da região que contém Gla (PRICE et al, 1976 e HAUSCHKA et al., 1989). A porção carboxi-terminal da osteocalcina, por outro lado, possui atividade quimioatrativa pelas células progenitoras de osteoclastos envolvidas na reabsorção óssea (LIAN et al., 1986). Essas, dentre outras propriedades, indicam que a osteocalcina possui uma função reguladora na mineralização e remodelagem do tecido ósseo, apesar de ainda não ser conhecida a sua função no desenvolvimento do tecido ósseo.

A vitamina K é conhecida como um cofator para a  $\gamma$ -carboxilase, enzima que catalisa uma transformação pós-síntese, a conversão de resíduos específicos de ácido glutâmico a  $\gamma$ -carboxi-glutâmico (Gla). Algumas proteínas encontradas no tecido ósseo, como osteocalcina e Gla-proteína da matriz, possuem resíduos Gla. Apesar da função biológica dessas proteínas não ser totalmente

conhecida, acredita-se que elas desempenham função na deposição de cálcio no osso devido à afinidade dessas proteínas pelos íons cálcio.(PRICE e WILLIAMSON, 1985 e HAUSCHKA, 1986).

A importância da vitamina K no metabolismo ósseo tem sido relatada em diversos trabalhos de pesquisa. Mulheres grávidas em tratamento com anticoagulantes como o Warfarin, um antagonista da vitamina K, durante o período inicial da gestação, exibem alta incidência de fetos com defeitos ósseos tais como displasia nasal (HALL et al., 1980). Ratos tratados com Warfarin têm mostrado defeitos ósseos (FEITEIH et al., 1990). Além disso, nível sérico de vitamina K em pacientes com fraturas nos quadris são menores do que em pacientes controle sadios (BITENSKY, et al., 1988). AKEDO et al., (1992) mostraram que vitamina K<sub>2</sub> administrada oralmente aumenta a densidade mineral do osso de mulheres com osteoporose pós menopausa.

Considerando que os níveis de ácido L-glutâmico têm efeito no desenvolvimento normal do tecido ósseo e que a vitamina K parece ter grande influência no tecido ósseo, apesar de não se conhecer o mecanismo pelo qual essa vitamina afeta o metabolismo ósseo, torna-se necessário verificar quais os efeitos desses dois nutrientes na redução e/ou eliminação dos problemas e ainda esclarecer suas origens.

Durante os últimos 40 anos, a idade de mercado para frangos de corte tem sido reduzida com sucesso devido aos avanços na genética, nutrição, manejo e sanidade das aves. Esta tendência enfatiza a importância do crescimento durante a primeira semana de idade que chega a representar 16% do período de produção das aves.

Com o uso de dietas purificadas é possível estudar a indução nutricional de diversas enzimas de aves ( RIBEIRO et al., 1995c, GUIMARÃES et al., 1996, MORAES et al., 1998).

O aparelho digestório é um local importante de crescimento durante o período embrionário. Os segmentos do trato gastrointestinal aumentam em tamanho muito mais rapidamente do que o corpo inteiro durante as primeiras semanas de vida. Muitos estudos indicam que os processos digestivos não

estão plenamente desenvolvidos em pintos recentemente eclodidos. Deste modo o aparelho digestório tem sido considerado como o fator limitante na ingestão de alimentos e no crescimento de frangos de corte. É necessário um período de maturação antes que o tamanho relativo do intestino e a produção do pâncreas atinjam níveis que não restrinjam as taxas de crescimento (PENZ, A M. e VIEIRA S.L. 1998).

O processo da digestão sofre profundas alterações durante a primeira semana de vida. As atividade das enzimas aumentam com a idade dos pintos, sendo que a máxima atividade é alcançada ao redor do décimo dia de idade . (NIR, I., 1998).

Portanto permanece a ser determinado se o período inicial precisa ser monitorado por procedimentos alimentares, como o emprego de alimentos altamente digestivos e/ou suplementação com aditivos que favoreçam a digestibilidade dos nutrientes, com o objetivo de maximizar a produção.

Dessa maneira o objetivo do presente estudo foi estabelecer os efeitos da combinação de 2 níveis (6,25 e 12,5%) de ácido L-glutâmico com 4 níveis (0,02; 0,20; 2,0 e 20,0 mg/kg de dieta) de vitamina K no desempenho, na incidência de anormalidades do tecido ósseo e na composição química e bioquímica de tíbiotarsos e fêmures de frangos de corte. Como objetivos adicionais, procedemos o estudo do desenvolvimento dos órgãos do aparelho digestório e das atividades das atividades de enzimas digestivas de pintos de corte do nascimento aos 21 dias de idade, alimentados com dieta purificada.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:**

### **2.1. Dieta Purificada**

A importância do uso de dietas purificadas reside no fato de que, sendo isentas de ingredientes naturais, permitem o estudo de vitaminas, minerais, aminoácidos e outras fontes de nitrogênio, isoladamente.

BAKER (1977) relatou a dificuldade de se manter a taxa de crescimento por longo período em frangos alimentados com dietas purificadas, sendo o ganho de peso diminuído nesses animais.

Dietas purificadas, contendo níveis adequados de aminoácidos indispensáveis, vitaminas e minerais, não são suficientes para promover desenvolvimento corporal máximo em frangos, havendo necessidade de uma suplementação com uma fonte de nitrogênio não específico para, conjuntamente com o esqueleto carbônico proveniente do metabolismo de carboidratos, formar os aminoácidos dispensáveis e outros compostos nitrogenados (BAKER e MOLITORIS, 1974; FEATHERSTON, 1976; FEATHERSTON e ROGLER, 1978).

Os aminoácidos dispensáveis e alguns indispensáveis, assim como diversas fontes de nitrogênio não amínico, como citrato de amônio, carbonato de amônio, uréia, xantina, uracila e outros, podem servir como fontes de nitrogênio não específico, quando incluídos nas dietas.

O estudo de SUGAHARA e ARIYOSHI (1967) do valor nutricional

de cada aminoácido dispensável, como fonte de nitrogênio, para o crescimento de frangos, alimentados com dietas de aminoácidos cristalino, demonstrou, que tanto o ácido L-glutâmico como o ácido L-aspartico eram muito úteis, L-alanina útil, L-glicina e L-prolina inadequados e o L-serina prejudicial.

BLAIR et al.(1972) trabalhando com dietas purificadas para pintinhos de um a sete dias de idade, relataram que aumento do nível de glicina de 1 para 1,6% não resultou em melhora na resposta de crescimento. Os autores sugeriram o nível de 1% de glicina para dietas, nas quais o nível de nitrogênio não esteja em excesso, e salientaram que é difícil diferenciar entre os efeitos de glicina per se e como fonte de nitrogênio não específico e que é necessário conhecer o conteúdo de serina da dieta para derivar o requerimento de glicina, uma vez que glicina e serina são interconvertíveis. Outros autores tem mostrado que com alto nível de nitrogênio o requerimento de glicina pode ser maior que 1%, o que pode estar relacionado com o envolvimento de glicina na destoxificação do excesso de nitrogênio dietético como ácido úrico.

BAKER e MOLITORIS (1974) em estudos com frangos de corte alimentados com dietas de aminoácidos purificados, limitadas em nitrogênio não específico, observaram que a suplementação com 3% de ácido L-glutâmico resultou no dobro do ganho de peso em relação à dietas não suplementadas.

SASSE e BAKER (1973) basearam-se em estudos envolvendo avaliação de requerimentos de aminoácidos para pintinhos para modificar o Padrão de Referência ILLINOIS (RS) para mistura de aminoácidos. Os níveis dietéticos de arginina (de 1,21 para 1,15), lisina (de 1,19 para 1,14), leucina (de 1,20 para 1,00), valina (de 0,82 para 0,69) e glicina (1,20 par 0,60) foram diminuídos e prolina (de 0,20 para 0,40) e glutâmico (de 10,0 para 12,0) aumentados. A performance dos pintinhos alimentados com a mistura de aminoácidos modificada (MRS) foi tão boa ou melhor que a mistura anterior e aproximou do nível de performance dos pintinhos alimentados com dieta prática milho/soja com 24% de proteína. Ganho de peso RS 64g, MRS 69,9 e Milho/soja 73,3g.

MORAES et al. (1984) verificaram que pintos alimentados com

uma dieta purificada, suplementada com 10% de L-glutâmico (dieta 1) ou com 5 % de L-glutâmico + 2,4% de Glicina (dieta 2) ou 5% de L-glutâmico + 1,68% de L-Serina (dieta 3), ou ainda 12,5 % de L-glutâmico (dieta 4), apresentaram melhores resultados de ganho de peso do que aqueles alimentados com dietas suplementadas com apenas 5% de L-glutâmico (dieta 5).

GUIMARÃES (1988), trabalhando com dietas purificadas, suplementadas com aminoácidos dispensáveis, para frango de corte de 1 aos 14 dias de idade, mostrou que o ganho de peso dos pintinhos alimentados com as dietas 2 (5% de L-Glu + 4,5 % de Asp), 3 (5% de L-Glu + 3% de L-Ala) e 4 (10 % de L-Glu) não foram significativamente diferente. Entretanto, o ganho de peso desses pintinhos foi maior do que daqueles alimentados com a dieta 1 (5% de L-Glu.). A suplementação da dieta básica com 10% de L-Glu (dieta 4) ou com misturas isonitrógenas de L-Glu + L-Asp (dieta 2) e L-Glu + L-Ala (dieta 3) resultou na menor incidência de problemas de pernas, em relação à dieta com suplementação de 5% de L-Glu.

RIBEIRO (1990) estudou o efeito da suplementação de aminoácidos dispensáveis (L-Glu, e L-Ala) e de aminoácido indispensável (L-Pro) em diferentes níveis, em dietas purificadas, no crescimento e incidência de problemas de pernas em frango de corte de um a 14 dias de idade. Os resultados de ganho de peso dos pintos alimentados com dietas 3 e 5 não diferiram entre si, as quais foram suplementadas com 6,25% de L-Glu + 3,79 L-Ala e 12,5% de L-Glu respectivamente, entretanto o ganho de peso dos pintinhos alimentados com estas dietas foram superiores aos obtidos com aqueles alimentados com as dietas 1 (6,25% de L-Glu), 2 (6,25% de L-Glu + 4,89% de L-Pro), 4 (6,25% de L-Glu + 1,89% de L-Ala + 2,45% L-Pro) e 6 (12,5% de L-Glu + 1,00% de L-Pro).

Estes resultados sugerem, que tanto L-Glu como L-Ala, são eficientes fontes de nitrogênio não específico para promover ganho de peso de pintinhos de um aos 14 dias de idade. Esta habilidade pode ser explicada pelo fato de os tecidos animais, principalmente fígado e rins, possuírem elevada atividade das transaminases envolvendo L-Glu, que catalisa a transferência do seu amino grupo a vários  $\alpha$ -cetoácidos, para produção dos correspondentes aminoácidos. O

aminoácido L-Ala também é considerado uma fonte de nitrogênio importante no metabolismo protéico, possivelmente por estar relacionado com L-Glu pela enzima glutamato-piruvato-desidrogenase.

Elevada incidência de problemas de pernas também foi observada nos pintinhos alimentados com a dieta básica suplementada com apenas 6,25% de L-Glu (Dieta 1), enquanto acentuada redução do problema foi obtida quando se elevou o nível de nitrogênio não específico da dieta independente da fonte utilizada, inclusive L-Pro que apesar de não ter promovido melhora no ganho de peso, reduziu a incidência de problemas de pernas.

Em estudos conduzidos por BAKER e HAN (1994) para comparar perfis de aminoácidos, preconizados pelo NRC (1984, 1994) e proteína ideal de Illinois para frangos, em rações para frangos de corte de 2 a 3 semanas de idade, ficou demonstrado que a razão ideal de aminoácidos (com base em aminoácidos digestíveis) para a fase inicial de crescimento para frangos de corte é: lisina, 100%; metionina + cistina, 72%; treonina, 67%; valina, 77%; isoleucina, 67%; arginina, 105%; histidina, 32% triptofano, 16%; leucina 109%, fenilalanina + tirosina 105%; glicina 65% e prolina 44%.

## **2.2. Tecido ósseo**

O osso é um tecido heterogêneo e complexo que, além de suportar a musculatura e todo o peso do animal, está intimamente relacionado com o crescimento em geral. Em razão da multiplicidade de funções, sua formação e absorção é altamente organizada e precisamente controlada. É formado por uma estrutura orgânica composta de fibrilas, principalmente colágeno, na qual se deposita a fase mineral, composta principalmente de hidroxiapatita. A estrutura óssea é altamente disponível, pois funciona como reserva de cálcio e fósforo, que são prontamente mobilizados para a manutenção do balanço metabólico (TARDIN, 1995).

O tecido ósseo é composto por uma matriz orgânica rígida que é fortalecida pelo depósito de sais de cálcio. A matriz orgânica do osso desidratado e

desengordurado representa 30% do tecido ósseo e os sais de Ca, P, Mg, K, e Na representam 70% (GUYTON, 1992)

A matriz orgânica contém diversas proteínas, sendo o colágeno a principal delas. As glicoproteínas são também descritas como sendo constituintes do tecido ósseo. Algumas proteínas contendo resíduos do aminoácido  $\gamma$ -carboxi-glutâmico foram, também, isoladas de tecido ósseo de aves e bovinos e apresentam propriedades de quelar cálcio (HAUSCHKA et al., 1975).

O osso é um tecido metabolicamente ativo, multifuncional, compreendendo populações de células como condrócitos, osteoblastos, células endoteliais. Esse complexo meio de células produz uma grande variedade de reguladores biológicos que controlam o metabolismo ósseo. O crescimento ósseo ocorre com a formação da matriz óssea (colágeno e mucopolissacárideos), em seguida a mineralização dessa matriz pela deposição de sais de cálcio, o mecanismo pelo qual esses cristais são depositados não é totalmente elucidado; e por fim, a reabsorção de cristais de hidroxiapatita que é função dos osteoclastos (LEESON e SUMMERD, 1988).

O osso é composto por uma mistura de fibras de colágeno e mucopolissacárideos que é mineralizada por sais de cálcio na presença de células ósseas. A importante interação entre a matriz inorgânica em desenvolvimento e a fase ativa é via lacuna fina, ou canais que são bem irrigados. Distúrbios nessas lacunas e/ou suas invaginações capilares parecem ser um fator comum em muitas anormalidades de pernas (LEESON e SUMMERS, 1988).

Sob condições normais, o osso compacto é depositado pelos osteoblastos no interior da borda subperiosteal e, com o objetivo de prevenir excessiva mineralização, osteoclastos reabsorvem material dessa borda através da cavidade medular. Portanto, no desenvolvimento normal existe uma contínua deposição e reabsorção do osso e, é interessante notar que a maior parte das anormalidades do esqueleto está mais relacionada com a deposição do que com a reabsorção (LEESON e SUMMERS, 1988).

Em frangos jovens a cavidade medular é composta exclusivamente por tecido mielóide, enquanto que em aves adultas por tecido adiposo. Em aves

adultas, os osso longos representam o maior estoque de tecido adiposo.

Em frangos, epífises com centro secundário de ossificação só estão presentes nas extremidades proximal e distal de tíbias e proximal de metatarsos. Ao eclodir, o pintinho tem um esqueleto imaturo. Cones de cartilagem representando sobras do modelo de cartilagem persistem em metáfises de ossos longos até 11-14 dias após eclosão. A presença de zona de ossificação reconhecível em placas de crescimento não ocorre antes desse tempo. A placa de crescimento de aves pode ser dividida em quatro zonas. A zona de proliferação (cartilagem articular) situa-se imediatamente contígua à epífise e é reconhecida por sua maciez e aparência translúcida, devido a falta de calcificação, e microscopicamente por sua coluna de células planas. A zona pré-hipertrófica (não hipertrófica) é uma fina zona de transição reconhecida microscopicamente pela grande quantidade de condrócitos e um aumento da matriz. A zona hipertrófica é reconhecida pela sua dureza e opacidade. Essa zona é caracterizada microscopicamente pela hipertrofia dos condrócitos, calcificação da matriz e extensa canalização de veias a partir da diáfase. A formação óssea na zona de ossificação (osso subcondrial) gradualmente substitui a cartilagem hipertrófica (RIDDELL,1981).

O crescimento longitudinal dos ossos é iniciado pelo desenvolvimento de cartilagens antes do tecido ósseo. A cartilagem formada é posteriormente degradada e sofre calcificação, células que formam cartilagem (condrócitos) degeneram e ocorre invasão de células produtoras de matriz óssea (osteoblastos). As mudanças de geração e degeneração ocorrem na placa de crescimento, em região denominada de cartilagem epifisária. Após a maturidade, o crescimento longitudinal cessa devido ao desaparecimento de elementos cartilagosos da placa de crescimento.

Ganhos em espessura dos ossos são consequência da formação interna de lamelas concêntricas pela camada subperiosteal (crescimento periosteal).

Formação e reabsorção óssea continuam por toda a vida, resultando em renovação e remodelação dos elementos ósseos (PINES e HURWITZ , 1991).

O crescimento longitudinal do osso depende de uma série de etapas no metabolismo e diferenciação dos condrócitos da placa de crescimento epífiseal.. Essas etapas envolvem proliferação celular seguida pela síntese de produtos que são característicos das etapas de diferenciação subsequentes. Ao final de um período de 48 horas, os condrócitos são removidos pelos capilares metafiseais e substituídos por osso trabecular. Isto aparentemente induz à produção inicial dos fatores de crescimento IGF-I (fator de crescimento I semelhante à insulina) , bFGF (fator de crescimento fibroblático básico) e TGF- $\beta$  (fator de crescimento  $\beta$  transformado) que possuem funções autócrinas e parácrinas, neste processo. Todos os três fatores são ativos em culturas de condrócitos e todos eles estão presentes em sítios específicos na placa de crescimento (LEACH e TWAL, 1994).

IGF-I e bFGF estão presente nas zonas de repouso e proliferativa. É provável que IGF-I se origine do soro, entretanto bFGF parece ser sintetizado pelos condrócitos. Este dois fatores atuam em conjunto para estimular a proliferação celular. TGF- $\beta$ , que está presente na zona pré-hipertrófica, pode funcionar aumentando a síntese de matriz extra celular. Na zona hipertrófica, bFGF e IGF-I estão presentes com os condrócitos e são, talvez, produtos biossintéticos dessas células. Os dois fatores podem ser liberados pelos capilares metafiseal, onde podem exercer suas funções complementares na proliferação de células endoteliais (LEACH e TWAL, 1994).

A remodelação óssea é responsável pela manutenção da massa tecidual e arquitetura no esqueleto adulto, representando atividades coordenadas de um grupo de células que funcionam como unidades de remoção e substituição de mineral ósseo em sítios do esqueleto. Esse grupo organizado de células tem sido denominado de “unidade básica multicelular”, sendo osteoclastos e osteoblastos os membros principais (BAIN e WATKINS, 1993).

Morfologicamente, as interações associadas com o ciclo de remodelação pode ser dividido em quatro principais eventos: ativação, reabsorção, reversão

e formação (PARFITT, 1990). O ciclo de remodelação inicia quando uma superfície óssea não remodelada é inicialmente ativada. Embora, não se conheça a origem do(s) sinal(is) de ativação sabe-se que a retração das células de revestimento do osso, que normalmente, revestem a superfície inativa é um elemento chave. Durante a fase de reabsorção, osteoclastos ligam-se à superfície do osso e reabsorve o osso em discretas unidades ou pedaços de minerais. A ligação de osteoclastos à superfície do osso é mediada pela zona clara, uma estrutura da membrana que isola a área de reabsorção do ambiente circundante. Este fato permite ao osteoclasto criar uma membrana demarcando um microambiente que pode otimizar as ações de enzimas e ativadores celulares associados com a dissolução da matriz mineralizada. Com o abrandamento da atividade dos osteoclastos, células mononucleares aparecem no local de reabsorção, com a finalidade de aplainar as lacunas desgastadas, antes da chegada dos osteoblastos. Esta é a fase reversa. É durante a fase reversa que os osteoblastos são mobilizados para o início da fase de formação. Estes osteoblastos irão sintetizar e depositar nova matriz óssea dentro da cavidade escavada. A matriz orgânica ou osteóides servem como suporte para a mineralização. Após, o ciclo de remodelação está completo e a superfície óssea retorna ao estado normal. A relação temporal que liga a atividade de reabsorção dos osteoclastos com a atividade de formação dos osteoblastos é denominada “acoplamento”.

A mais importante diferença que pode ser feita quando compara-se modelagem óssea com remodelação óssea é a falta do local de acoplamento na superfície óssea no modelagem óssea. Portanto, na remodelação óssea as atividades de osteoclastos e osteoblastos são acoplada no mesmo local, já na modelagem estas atividades ocorrem em superfícies separadas. A fase de ativação na modelagem óssea pode ser seguida por reabsorção ou formação. Além disso, como esses dois processos não são acoplados, formação não segue, necessariamente a reabsorção.

### **2.3. Problemas de pernas**

Problemas de pernas são reconhecidos como um dos quatro maiores fatores limitantes no desempenho de aves tipo carne (DAY, 1990).

Tradicionalmente, os problemas locomotores dos frangos são descritos em termos como fraqueza ou perda de pernas, ou mais especificadamente, perose, tibia retorcida, lote arqueado, sem fazer menção do tipo de lesão causadora do problema. A falta de uma terminologia padronizada contribui negativamente para uma correta quantificação dos prejuízos (TARDIN, 1995).

A princípio, a maioria dos problemas de pernas foi resultado de deficiência de vitaminas e minerais. Historicamente, vários destes problemas só puderam ser corrigidos com a descoberta das vitaminas. Atualmente, problemas de pernas resultantes de deficiências de vitaminas e minerais são relativamente raros e são, geralmente, resultado de erros no preparo de rações. Um ponto de vista comum na indústria é que o frango de corte moderno cresce tão rapidamente que o sistema esquelético não se desenvolve com a rapidez necessária para suportar o peso das aves (LEACH, 1992).

O desenvolvimento do esqueleto ósseo das aves utilizadas para a produção de carne é fundamental para a sustentação corporal e desenvolvimento adequado dos animais. O melhoramento genético das aves de corte tem, ao longo dos anos, reduzido a idade de abate e melhorado consideravelmente a relação ganho/consumo. Todavia, deformações nas pernas de aves tem sido observadas nos aviários comerciais e diversos trabalhos científicos tem estudado as causas e tentado propor soluções enfocando aspectos nutricionais e de manejo (PIERSON e HESTER, 1982),

LILBURN (1994) propôs programas alternativos de criação para minimizar desordens do esqueleto. Se o crescimento rápido e subseqüentes mudanças na biomecânica e fisiologia do esqueleto são fatores primários que contribuem para aumentar a prevalência de desordens nas pernas, então o crescimento pode ser manipulado sem aumentar significativamente a idade para atingir o peso de mercado.

KESTIN et al. (1992) desenvolveram um método para medir

a prevalência de fraqueza de pernas, desde aves normais até imóveis. Dos frangos comerciais criados intensivamente, 90% apresentou alguma anormalidade detectável no modo de andar e 26% sofriam de anormalidades de severidade suficiente para considerá-los comprometidos. Determinou-se ainda a prevalência de fraqueza de pernas em 3 linhagens comerciais de frangos de corte. Os resultados indicaram que fatores genéticos foram uma causa importante de fraqueza de pernas e também identificou-se uma possível relação entre peso vivo e fraqueza de pernas.

Tem sido observado que as aves, mesmo recebendo rações com nutrientes em níveis adequados e balanceados podem apresentar pernas deformadas, porém sem uma caracterização definida, mas uma grande variedade de anormalidades, tais como pernas retorcidas, arqueadas, espalhadas, etc. Por serem anomalias, aparentemente, não relacionadas com deficiências clássicas de nutrientes envolvidos com o tecido ósseo, elas têm sido denominadas genericamente, problemas de pernas (PIERSON e HESTER, 1982).

MORRIS (1993) listou as cinco causas primárias de problemas de pernas em frangos que incluem, desordens nutricionais, doenças infecciosas, condições metabólicas, problemas conformacionais e toxinas. Neste mesmo trabalho ficou evidenciado que os fatores genéticos são considerados muito importantes como causador de problemas de pernas, devido ao seu impacto em parâmetros conformacionais e principalmente na taxa de crescimento. O fator mais correlacionado aos problemas de pernas foi o peso corporal, sendo os machos mais susceptíveis do que as fêmeas.

“Twisted leg” é uma anomalia caracterizada por torção e arqueamento de pernas, não verificando encurtamento dos ossos longos. Este tipo de lesão é um dos casos mais comuns de problemas de pernas em frangos. Muitos fatores podem influenciar a incidência dessa deformidade, genótipo, nutrição, rápido crescimento.

Existem evidências que sugerem que megadoses de piridoxina (vitamina B<sub>6</sub>) podem reduzir a incidência de “twisted leg” em frangos alimentados com dietas

semi-purificadas. O fato do piridoxal fosfato ser coenzima de enzimas envolvidas no metabolismo de aminoácidos e a ocorrência de alta incidência de anomalias de pernas em frangos alimentados com dietas purificadas, com níveis adequados de aminoácidos essenciais, mas deficientes em nitrogênio não específico, sugerem que algum aspecto do metabolismo de aminoácido pode estar intimamente relacionado com o aparecimento de “twisted leg” (BOREN, 1993).

MORAES et al. (1984) usando dieta purificada para pintinhos demonstraram que 5% de ácido glutâmico (L-Glu), como fonte de nitrogênio não específico, resultou em um grande número de problemas de pernas. A adição de 10% de L-Glu foi necessária para otimizar o crescimento e 12,5% foi necessário para reduzir ao mínimo a incidência de problemas de pernas. Esses autores observaram que os problemas de pernas poderiam ter sido causados pela deficiência de nitrogênio não específico e, que, como os teores de cinzas dos ossos não foram afetados pelo tipo de dieta, esses efeitos estariam relacionados com a matriz orgânica do osso.

Em trabalhos conduzidos por GUIMARÃES et al., 1993; RIBEIRO et al., 1995b; RODRIGUES e MORAES, 1995 e RODRIGUES et al., 1996 pôde ser verificado que existe uma correlação entre os níveis de nitrogênio não específico da dieta e a incidência de problemas de pernas. Assim, níveis baixos (5,0 ou 6,25% ) de L-Glu ou quantidades isonitrôgenas de L-Asp ou L-Ala provocaram alta incidência de anomalias de pernas. Níveis mais altos (12,5%) reduziram significativamente a incidência de problemas de pernas. Essas anomalias surgem entre o sexto e o oitavo dia de idade agravando-se com o tempo, resultando em elevada taxa de mortalidade, principalmente, devido à dificuldade de locomoção.

Em todos estes trabalhos foi verificado um maior teor de proteínas não colagenosas em ossos (tíbiotarso e fêmur) de aves que apresentaram problemas de pernas. Pouca ou nenhuma alteração na composição mineral dos ossos foi observada, reforçando a idéia de que estes problemas estão relacionados com a matriz orgânica dos ossos.

Estes resultados indicam que baixos níveis de nitrogênio não específico na dieta dão origem a aves com pior desempenho biológico e alta incidência

de problemas de pernas, provavelmente em função da má formação do tecido ósseo, corroborando a hipótese de PRICE (1985) de que as Gla-proteínas, principais constituintes das proteínas não colagenosas, inibem a mineralização óssea e, conseqüentemente, o desenvolvimento normal do tecido ósseo.

#### **2.4- Vitamina K**

Vitamina K, descoberta por Henrick Dam em 1935, é essencial para a coagulação sangüínea. É conhecido que a vitamina K atua como cofator da enzima carboxilase que ativa sete fatores da cascata de coagulação sangüínea. Todos possuem o aminoácido  $\gamma$ -carboxi-glutâmico (SUTTIE, 1981).

Antes da carboxilação do aminoácido L-glutâmico, a vitamina K é reduzida à sua forma ativa, vitamina  $KH_2$ , por uma redutase. Sob a ação da carboxilase e da vitamina  $KH_2$  o glutâmico pertencente a uma proteína é carboxilado a  $\gamma$ -carboxi-glutâmico (Gla) e a vitamina  $KH_2$  é transformada em seu epóxido.  $O_2$  é essencial nesta etapa da reação. Uma epóxido redutase retorna a vitamina K epóxido a vitamina K completando o ciclo (WOOD et al., 1988).

O resíduo Gla atua na ativação de alguns fatores da coagulação sangüínea, possibilitando a criação de sítios para a ligação de íons cálcio, o que permite maior adsorção dessas proteínas nas membranas fosfolipídicas em algumas etapas da coagulação sangüínea (GALLOP et al., 1980).

Ligação com o cálcio também é a razão para a carboxilação dos resíduos de glutâmico nas proteínas ósseas, osteocalcina e Gla proteína da matriz, entretanto a função precisa destas proteínas no osso não é totalmente conhecida. O desenvolvimento ósseo em fetos humanos exibem, ocasionalmente, morfologia hipoplástica e pontos anormais de calcificação, os quais tem sido correlacionados com a ingestão materna de anticoagulantes durante o primeiro trimestre de gravidez (GIJSBERS et al., 1990).

O transporte de  $Ca^{2+}$  pela membrana cório-alantóide da gema do ovo para o embrião foi demonstrado ser dependente de vitamina K. A

capacidade deste transporte desenvolve-se em paralelo com a mineralização óssea, sugerindo implicações adicionais da vitamina K no processo de mineralização (LIAN et al., 1979).

Devido a homeostase ser o primeiro sistema fisiológico no qual a deficiência de vitamina K atua, a investigação da ação de vitamina K em outros sistemas é dificultada. O estudo da função de Gla proteínas ósseas dependentes de vitamina K foi grandemente facilitada por PRICE e KANEDA (1987) que desenvolveram protocolo baseado em altas doses de Warfarin, antagonista da vitamina K, combinadas com uma certa quantidade de vitamina K, o qual propicia a homeostase normal e em paralelo uma completa inibição da carboxilação das Gla-proteínas ósseas.

A administração de Warfarin em ratos inibiu a carboxilação do resíduo L-glutâmico, resultando na produção de uma proteína não carboxilada com reduzida afinidade para a hidroxiapatita (PRICE e WILLIAMSON, 1981).

Estudando a ação do Warfarin na expressão das proteínas, osteocalcina e Gla proteína da matriz, BARONE et al. (1994) verificaram que os níveis e a síntese de mRNA diminuíram cerca de 50%, nas culturas de osteoblastos de rato, sob tratamento crônico (1 e 5 µgrama/ml Warfarin sódico) depois de 22 dias, enquanto os níveis de Gla proteína da matriz não foram afetados.

Em cordeiros os efeitos do Warfarin no osso foi bem proeminente e incluiu osteopenia com redução de 30% da massa óssea em 3 meses em relação aos animais controle, diminuição pela metade da reabsorção óssea, diminuição da formação óssea, deposição irregular de cálcio e anormalidades no processo de remodelagem (PASTOUREAU et al., 1993).

O requerimento dietético de vitamina K de muitas espécies não está bem definido e depende de vários fatores, sensibilidade do método de ensaio utilizado, da forma da vitamina e da via de administração. Entretanto, o requerimento para frangos é usualmente indicando como 5 a 10 vezes o requerimento para ratos (SUTTIE, 1991).

Ao contrário de muitas espécies, aves possuem um limitada capacidade para a síntese intestinal, e suplementação dietética adequada (0,5mg/kg NRC

1984) de vitamina K é de grande importância. Em aves ocorre pequena síntese intestinal devido ao tamanho reduzido do tubo digestivo. Em aves jovens o intestino grosso, a parte mais importante para a síntese bacteriana, compreende menos que 6% do tamanho total do trato digestivo. Também, as aves não podem utilizar a vitamina K sintetizada pela flora intestinal porque a síntese ocorre na porção mais distal do tubo digestivo para permitir uma absorção significativa (McDOWELL, 1989).

## **2.5. Proteínas não colagenosas**

Em estudos realizados por VETTER et al. (1991), observou-se que as mudanças nas concentrações de proteínas não colagenosas podem contribuir para a fragilidade do osso por interferência com a completa mineralização e/ou arquitetura normal.

Tecidos mineralizados apresentam uma variedade de proteínas que contêm resíduos do aminoácido  $\gamma$ -carboxiglutâmico, que se ligam à superfície do cristal de hidroxiapatita. Algumas das proteínas afetam a mineralização “In vitro”. O resíduo  $\gamma$ -carboxiglutâmico é formado por modificação pós-translacional dependente de vitamina K (FUJISAWA et al., 1996).

Gla-proteínas têm sido identificadas no tecido ósseo, entre elas osteocalcina e Gla-proteína da matriz (HAUSCHKA et al., 1975; MAILLARD et al., 1992 e PRICE et al., 1976). Essas proteínas são sintetizadas pelos osteoblastos, mas somente osteocalcina é sintetizada, exclusivamente pelo osteoblasto e odontoblastos (HAUSCHKA et al., 1989), entretanto Gla proteína da matriz é produzida por muitos tecidos moles (rins, fígado, pulmão, baço e parede de vaso sanguíneo) (FRASER e PRICE, 1988).

Apesar dessas Gla proteínas encontradas no osso representar aproximadamente 80% de todo o estoque de Gla do corpo, sua função no

tecido ósseo permanece desconhecida.

A despeito da Gla-proteína da matriz apresentar um alto conteúdo de aminoácidos hidrofílicos e de seu tamanho reduzido (9,6 KD) ela é virtualmente insolúvel em soluções aquosas (PRICE, 1985). Sua afinidade pela matriz óssea desmineralizada e cartilagem não mineralizada sugere interações com outros constituintes orgânicos do osso, tais como, colágeno, proteoglicanas e glicosaminas. No osso, os níveis de mRNA que codificam para Gla proteína da matriz são muito menores que nos rins, fígado, parede vascular, baço e pulmão, apesar disso, somente quantidades traços de Gla proteína da matriz entra na circulação (HALE, 1988). Por outro lado, Gla proteína da matriz é abundante nos ossos e cartilagens, mas sua função permanece matéria de especulação. Tem sido postulado que nos tecidos moles Gla proteína da matriz pode ajudar a liberação de cálcio extracelular e proteger contra a calcificação do tecido. E, a alta concentração de Gla proteína da matriz encontrada nos ossos e cartilagens pode criar condições que predispõe o tecido à calcificação (LOESER e WALLIN, 1992).

A osteocalcina é uma proteína de baixo peso molecular que contém resíduos de  $\gamma$ -carboxiglutâmico que conferem à proteína suas propriedades de ligação ao mineral. Representa 15 a 20% da proteína não colagenosa no osso e é uma das proteínas mais abundantes do corpo. A osteocalcina é produzida pelos osteoblastos durante a formação da matriz óssea e aparece com o início da deposição de hidroxiapatita. Sua síntese parece ser regulada pela forma ativa da vitamina D, e sua concentração no osso parece ser diretamente proporcional à quantidade de cálcio presente no osso (BINKLEY e SUTTIE, 1995).

“In vitro”, osteocalcina liga-se fortemente à cristais de hidroxiapatita e é um potente inibidor da formação desse cristais. No osso, a osteocalcina ocorre em associação com a matriz mineralizada a qual se liga via  $\alpha$  hélice Gla.

A osteocalcina de aves apresenta 2 sítios distintos para  $\text{Ca}^{2+}$ , exibindo uma alta especificidade de ligação não cooperativa, com  $K_d = 0,8 \mu\text{M}$  (PRICE

et al., 1976). A parte carboxi terminal da osteocalcina, por outro lado, possui atividade quimioatrativa para células de osteoclastos progenitores, envolvidos na reabsorção óssea (LIAN et al., 1986).

A partir da concentração de osteocalcina no sangue e no osso, e a partir de estimativas de sua meia vida em ambos os tecidos, pode-se calcular que aproximadamente 20% da osteocalcina sintetizada novamente não se liga à matriz de hidroxiapatita no osso, mas se encontra livre na circulação sanguínea.

Os níveis de osteocalcina na circulação tem sido correlacionado com a formação óssea, como avaliação do crescimento ósseo e do alto turnover ósseo. Como osteocalcina é produzida unicamente pelos osteoblastos no osso, seus níveis séricos têm sido freqüentemente usados como marcador específico da atividade do osteoblasto na formação óssea. O valor de diagnóstico da osteocalcina sérica permanece a ser determinado (DELMAS et al., 1983 e PARTHEMORE et al., 1993).

## **2.6. Secreções digestivas**

As aves produzem saliva do tipo “mucosa”, a qual tem como principal função a lubrificação da ração para facilitar a deglutição. A ausência de células “serosas” mostra que as aves não possuem a enzima  $\alpha$ -amilase na saliva, o que possibilitaria o início da digestão do amido (MORAN Jr, 1982 a).

A secreção gástrica é oriunda de glândulas exócrinas situadas em vilosidades do estômago. As células principais são responsáveis pela secreção de pepsinogênio e ácido clorídrico. O muco é secretado pelas células da mucosa. A secreção gástrica é influenciada por hormônios, como a gastrina, cujas células secretoras, juntamente com as secretoras de outros hormônios, se encontram ao longo do proventrículo e intestino delgado.

A função da gastrina em aves não está completamente elucidada. Sabe-se, entretanto, que a forma sintética análoga da gastrina, a pentagastrina,

estimula a secreção de HCl e, principalmente, de pepsinogênio em aves. O hormônio polipeptídeo pancreático, sintetizado no pâncreas influencia a secreção de gastrina. Os hormônios pancreozimina e secretina, oriundos da mucosa intestinal influenciam a secreção gástrica. A pancreozimina estimula a secreção de HCl, mas não de pepsinogênio. A secretina estimula a secreção de ambas (RUTZ, 1994).

As aves possuem somente um tipo de glândula no duodeno, as de Lieberkuhn. Ao contrário do estômago e pâncreas, pouca informação existe a respeito da atividade secretória do duodeno em aves, devido à dificuldade da coleta de secreções livres de contaminação, presença de secreções pancreáticas e biliares e enzimas bacterianas (DUKE, 1986).

O pâncreas é um órgão com características de glândula endócrina e exócrina. Diretamente envolvido com a digestão está a porção exócrina, cuja secreção varia em torno de 15 a 20ml por dia, com pH de 6,4 a 6,8 em galináceos. O suco pancreático é formado por uma fase aquosa, constituída por água e bicarbonato, e por uma fase enzimática. (VANDER et al., 1990).

## **2.7. Processo digestivo**

Quando a secreção pancreática chega ao duodeno e entra em contato com a digesta, inicia-se realmente a digestão de carboidratos nas aves. O suco pancreático é uma mistura de zimogênios dissolvidos em um fluido alcalino rico em bicarbonato, sendo que a  $\alpha$ -amilase representa entre 5,5 a 30% do zimogênio produzido pelo pâncreas (MORAN Jr, 1982b).

A mucosa do intestino delgado produz enzimas que atuam na digestão dos carboidratos. Estas enzimas estão localizadas nas vilosidades das células da mucosa, o que permite melhor contato com a digesta presente no lúmen intestinal. A dextrinase hidrolisa as ligações  $\alpha$ -1,6 da dextrina, sendo que os resíduos produzidos (com ligação  $\alpha$ -1,4), dependendo do tamanho, podem ser

atacados pela  $\alpha$ -amilase ou pelas maltases, com produção de glicose. Existe uma complementação das enzimas na digestão do amido, sendo que a  $\alpha$ -amilase atua preferencialmente nas cadeias longas e médias, e a dextrinase e a maltase atuam nas cadeias médias e pequenas, com liberação de glicose, que será rapidamente absorvida pela mucosa (ROSTAGNO, 1994).

As enzimas da mucosa intestinal apresentam atividade para vários carboidratos, sendo que a velocidade de hidrólise varia bastante. A atividade das enzimas também não é constante ao longo do intestino delgado.

O aparelho digestório das aves é relativamente curto, quando comparado aos mamíferos, e a velocidade de passagem do bolo alimentar é relativamente rápida. Assim, os processos de digestão e absorção devem ser muito eficientes, pois, caso contrário, a utilização dos nutrientes torna-se deficitária (PENZ Jr, 1994).

Nada ocorre no processo de digestão das proteínas e na absorção dos aminoácidos na boca, no esôfago e no papo das aves. É no proventrículo, também chamado de estômago glandular, que tem início a digestão das proteínas. Nesse órgão há secreção de HCl e pepsinogênio. A ativação do pepsinogênio se faz pela ação de HCl e de pepsina. As proteínas, já em processo de digestão, promovido pela ação do suco gástrico e pela ação mecânica ocorrida na moela, passam para o intestino delgado (PENZ Jr, 1994).

Ao chegar no intestino delgado, as proteínas e polipeptídeos são submetidos às secreções pancreática e intestinal. A secreção pancreática tem significativa importância na digestão das proteínas. O volume de enzimas proteolíticas secretado pode ser muito elevado, dependendo do tipo de alimento que chega ao lúmen do intestino delgado. Além disso, a secreção pancreática pode ser bastante aquosa, rica em íons de bicarbonato, permitindo que o pH do lúmen fique próximo do neutro, condição indispensável para a ativação das proteases, que também são secretadas na forma de zimogênios (BIRD, 1971).

As enzimas do proventrículo e do pâncreas têm fundamental ação

sobre a digestão protéica, conduzindo esse processo até a obtenção do olipeptídeos. Posteriormente, são as enzimas intestinais, que se encontram na borda em escova, que farão o trabalho final de digestão, quando os olipeptídeos serão desdobrados em peptídeos menores ou aminoácidos; e assim serão absorvidos (PENZ Jr, 1994).

A digestão de lipídeos, em sentido absoluto, ocorre quase exclusivamente na interface óleo-água e envolve vários substratos. Os triglicerídeos e lecitina são de importância primária, sendo os ésteres de colesterol secundários. Todas as enzimas necessárias para a hidrólise seletiva de cada lipídeo se originam do pâncreas. O lipídeo emulsificado fica com as faces polares da bile conjugada e da lecitina cobrindo sua superfície, enquanto o triclicerídeo ocupa o núcleo. A colipase é um cofator protéico, liberado pelo pâncreas, que permite à lipase se fixar na superfície óleo-água e ter acesso aos triglicerídeos de camadas menos expostas. A lipase cliva ácidos graxos nas posições 1 e 3, resultando em um 2-monoglicerídeo. Os ácidos graxos de cadeia curta e média nas posições 1 e 3 são digeridos eficientemente, entretanto, ácidos graxos de cadeia longa também são removidos de modo efetivo, desde que as duplas ligações não estejam localizadas entre os carbonos 2 e 8 (CHAPUS et al., 1988).

As alterações na quantidade de gordura alimentar induzem a um ajuste na produção e liberação proporcional de lipase e colipase. O efeito líquido da ação da lipase-colipase é criar três anfófilos (2 ácidos graxos e um 2-monoglicerídeo), a partir de um hidrófobo completo (SIMOES-NUNES, 1986).

## **2.8. Enzimas digestivas ( $\alpha$ -amilase, lipase e tripsina)**

A  $\alpha$ -amilase ( $\alpha$ -1,4 glucan 4-glucano hidrolase, EC 3.2.1.1.) da classe hidrolases é uma endoenzima que hidrolisa ligações glicosídicas  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 4 internas de polissacarídeos. A  $\alpha$ -amilase é produzida no pâncreas e secretada para o intestino delgado, principal local de digestão de polissacarídeos. É formada por uma cadeia de aminoácidos com peso molecular de 53000 e máxima atividade

em pH 7,5. A atividade da enzima depende da presença de  $\text{Ca}^{++}$  e de  $\text{Cl}^-$ .

A enzima hidrolisa as ligações  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 4 entre as moléculas de glicose do amido. A hidrólise da amilopectina é mais difícil, pois a  $\alpha$ -amilase hidrolisa somente as ligações  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 4, e a medida que se aproxima das ramificações com ligações  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 6 a atividade diminui, resultando na produção de maltose, maltotriose e dextrinas. A menor dextrina produzida é o tetrassacarídeo 6- $\alpha$ -D-glucosilmaltotriose (MORAN JR, 1982b).

A lipase (Glicerol-ester hidrolase, EC 3.1.1.3) é também uma enzima da classe das hidrolases. Nos animais é secretada pelo pâncreas para o intestino delgado, local mais importante da digestão lipídica.

A lipase efetua uma reação hidrolítica muito rápida entre duas fases não miscíveis. O substrato encontra-se na fase lipídica, enquanto as moléculas de água necessárias para hidrólise estão presentes na fase aquosa (JANDACEK et al., 1987).

A tripsina (E.C3.4.21.4) é uma enzima proteolítica pertencente à classe das serino-proteases, que se caracterizam pela participação de um resíduo de serina no centro ativo. As células exócrinas do pâncreas produzem o zimogênio tripsinogênio, que é secretado para o lúmen intestinal, onde, por ação enzimática, é transformado em sua forma ativa (MIKES et al., 1966).

Segundo ROBINSON et al. (1973) o zimogênio de tripsina não é um precursor totalmente inativo; ele possui uma atividade catalítica latente que fica mais pronunciada depois de sua ativação.

A tripsina apresenta sítios específicos para a ligação do íon cálcio. O cálcio se liga à enzima e produz uma mudança conformacional na enzima que em temperaturas mais baixas impede que ocorra a autólise, devido a conformação mais rígida assumida pela formação do complexo enzima – cálcio (VAJDA e GARAI, 1981).

Os substratos de tripsina são proteínas, peptídeos, ésteres e amidas

sintéticos que contêm em sua estrutura ligações éster ou amida formadas com grupamentos carboxílicos dos resíduos básicos arginil e lisil (NEURATH e SCHWERT, 1950).

## **2.9. Alterações do aparelho digestório durante o desenvolvimento**

As alterações anatômicas do aparelho digestório dos frangos de corte nos primeiros dias de vida são marcantes. Após a eclosão, os pesos do próventrículo, da moela e do intestino delgado aumentam mais rapidamente que o peso corporal das aves e os pesos de outros tecidos. NITSAN et al.(1991) mostraram que fígado aumentou de aproximadamente 1g no dia da eclosão para 15g com 23 dias de idade. O pâncreas com peso de 0,06g na eclosão aumentou 10 vezes no oitavo dia e 30 vezes no vigésimo terceiro dia. O peso do intestino delgado foi de 0,84 no dia da eclosão e, semelhante ao pâncreas, seu peso aumentou 10 vezes no oitavo dia e 20 no vigésimo terceiro dia. O crescimento alométrico do pâncreas e intestino delgado mostrou um aumento gradual similar até o oitavo dia de idade, quando atingiu um máximo de 4 vezes o crescimento corporal. O crescimento alométrico do fígado foi consideravelmente menor que o do pâncreas e intestino delgado, com o valor máximo ao redor do dia 11 e 12.

Os enterócitos desenvolvidos durante a fase embrionária têm como função prioritária a absorção de imunoglobulinas. São elas que estimulam o desenvolvimento das vilosidades e do aparecimento de mais enterócitos nas criptas. Os enterócitos nas criptas é que possibilitam a síntese de diferentes enzimas, como as carboidratases, capazes de digerir glicídeos complexos. A passagem de alimento pelo trato digestivo de pintos recém eclodidos também favorece o desenvolvimento dos enterócitos das criptas e que, gradualmente, substituem os enterócitos formados durante a fase embrionária. Quando toda esta substituição ocorre, os frangos de corte atingem sua maturidade de digestão e absorção de glicídios e dos demais nutrientes (PENZ, A M. e VIEIRA S.L. 1998).

A secreção pancreática de proteases e de  $\alpha$ -amilase é substrato

dependente, sendo influenciada pela quantidade de proteína e de amido da dieta. A secreção de lipase também depende do lipídeo da dieta, mas seu aumento não é proporcional à quantidade de seu substrato (LHOSTE et al., 1993).

MAHAGNA e NIR (1996) determinaram a atividade de maltase e sacarase, no período entre o primeiro dia após eclosão até o 21º de idade, de frangos tipo carne e tipo ovos. E observaram que a interação entre idade e linhagem foi fortemente significativa para ambas as enzimas no duodeno, jejuno e íleo. Em ambas as linhagens a atividade da sacarase foi cerca de um quinto da maltase. A atividade de ambas as enzimas foi menor no duodeno e maior no jejuno. Pintos tipo carne eclodiram com uma reserva de dissacaridases muito maior do que os tipo ovos. A atividade de ambas as enzimas declinaram até cerca de uma semana de idade, muito mais perceptivelmente em pintos tipo carne do que em tipo ovos. De uma semana de idade em diante, a atividade no pintos tipo ovos excede acentuadamente às observadas nos tipo carne. A mesma conclusão pode ser tomada comparando atividade específica ou atividade por unidade de peso vivo.

A digestão e a absorção dos lipídeos dependem da presença de sais biliares, da lipase pancreática, da colipase e da proteína ligadora de ácidos graxos. A atividade da lipase aumenta linearmente nos perus até 16 dias de idade (MORAN JR, 1994).

Os embriões são capazes de absorver aminoácidos pelo intestino mesmo antes de eclodirem. Os pintos eclodem com alguma reserva enzimática no pâncreas. Esta reserva tende a decrescer nos primeiros dias após a eclosão, pois a síntese enzimática nesta fase é mais lenta que a necessidade dos animais pelas enzimas, para que tenham uma plena digestão protéica (NITSAN et al., 1995).

NITSAN et al.(1991b) determinara a atividade de algumas enzimas digestivas no período entre o primeiro dia de eclosão até 21 de idade de pintos. Os autores observaram que a atividade específica de tripsina, amilase e lipase no pâncreas diminuiu durante os primeiros três dias até sexto dia após a eclosão e aumentaram após esse período entre 10 a 20% do valor da eclosão nos dias 14,

11 e 21 para tripsina, amilase e lipase respectivamente. Quando as atividade

foram expressas por unidade de atividade por kg de peso corporal todas as enzimas aumentaram com a idade, obtendo atividade máxima no oitava dia (amilase e lipase) e décimo primeiro dia (tripsina e quimiotripsina).

## **CAPÍTULO 1**

### **EFEITOS DOS NÍVEIS DE ÁCIDO L-GLUTÂMICO E DE VITAMINA K DA DIETA NO DESEMPENHO E PROBLEMAS DE PERNAS DE FRANGOS DE CORTE**

#### **1. INTRODUÇÃO**

Dietas purificadas têm sido utilizadas em estudos nutricionais em diversas espécies de aves. Vários pesquisadores têm demonstrado que dietas purificadas, contendo níveis adequados de aminoácidos indispensáveis, vitaminas e minerais não são suficientes para promover desenvolvimento corporal máximo em frangos, havendo necessidade de suplementação com uma fonte de nitrogênio não específico para conjuntamente com o esqueleto carbônico proveniente do metabolismo de carboidratos, formar os aminoácidos dispensáveis e outros compostos nitrogenados.

SASSE e BAKER (1973) basearam-se em estudos envolvendo avaliação de requerimentos de aminoácidos para pintinhos para modificar o Padrão de Referência ILLINOIS (RS) para mistura de aminoácidos. Os níveis dietéticos de

arginina (1,21 para 1,15) lisina (1,19 para 1,14), leucina (1,20 para 1,00), valina (0,82 para 0,69) e glicina (1,20 para 0,60) foram diminuídos e prolina (0,20 para 0,40) e glutâmico (10,0 para 12,0) aumentados. A performance dos pintinhos alimentados com a mistura de aminoácidos modificada (MRS) foi tão boa ou melhor que a mistura anterior e aproximou do nível de performance de pintinhos alimentados com dieta prática milho/soja com 24% de proteína.. Ganho de peso RS 64g, MRS 69,9 e Milho/soja 73,3g.

BAKER (1977) relatou a dificuldade de se manter a taxa de crescimento por longo período em frangos alimentados com dietas purificadas, sendo o ganho de peso diminuído nesses animais.

MORAES et al. (1987) verificaram que pintos alimentados com uma dieta purificada, suplementada com 10% de L-glutâmico ou com 5 % de L-glutâmico + 2,4% de Glicina ou 1,68% de L-Serina, ou ainda 12,5 % de L-glutâmico, apresentaram melhores resultados de ganho de peso do que aqueles alimentados com dietas suplementadas com apenas 5% de L-glutâmico.

Em estudos conduzidos por BAKER e HAN (1994) para comparar perfis de aminoácidos, preconizados pelo NRC (1984, 1994) e proteína ideal de Illinois, para frangos, em rações para frangos de corte de 2 a 3 semanas de idade, ficou demonstrado que a razão ideal de aminoácidos (com base em aminoácidos digestíveis) para a fase inicial de crescimento para frangos de corte é: lisina, 100%; metionina + cistina, 72%; treonina, 67%; valina, 77%; isoleucina, 67%; arginina, 105%; histidina, 32% triptofano, 16%; leucina 109%, fenilalanina + tirosina 105%; glicina 65% e prolina 44%.

Anormalidades do tecido ósseo continuam sendo uma das maiores razões de mortalidade e/ou condenação de carcaça em frangos de corte. Existem numerosos estudos sobre desordens do esqueleto e parece claro que a etiologia é complexa e não relacionada a um simples fator. Problemas de pernas são mais prevalentes em frangos de corte e perus do que em aves tipo ovo sugerindo que taxa de crescimento e/ou peso corporal possa ser um dos fatores envolvidos no aparecimento de tais desordens (JOSHI, 1995).

O ácido L-glutâmico tem sido considerado uma eficiente fonte de nitrogênio não específico para reduzir a incidência de problemas de pernas quando fornecido em teores elevados ( 12,5%) (MORAES et al., 1984).

A vitamina K é conhecida como um cofator para a  $\gamma$ -carboxilase, enzima que catalisa uma transformação pós-síntese, a conversão de resíduos específicos de ácido glutâmico a  $\gamma$ -carboxi-glutâmico (Gla). Algumas proteínas encontradas no tecido ósseo, como osteocalcina e Gla-proteína da matriz, possuem resíduos Gla. Apesar da função biológica dessas proteínas não ser totalmente conhecida, acredita-se que elas desempenham função no metabolismo ósseo (HAUSCHKA, 1986 e PRICE e WILLIAMSON, 1985).

Apesar de vários trabalhos sugerirem que vitamina K tem grande influência no tecido ósseo, pouco se conhece a respeito do mecanismo pelo qual a vitamina K afeta o metabolismo ósseo.

O objetivo desse estudo foi testar os efeitos da combinação de dois níveis (6,25 e 12,5%) de ácido L-glutâmico com quatro níveis (0,02; 0,20; 2,0 e 20,0mg/kg de dieta) de vitamina K no desempenho e na incidência de anormalidades do tecido ósseo.

## **2. MATERAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Procedimentos gerais:**

O experimento foi realizado no Setor de Avicultura do Departamento de Zootecnia, utilizando-se 256 pintos de corte, machos, Avian Farm, com peso médio de 48 gramas, distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado, segundo um esquema fatorial 2x4 (2 níveis de ácido L-glutâmico e 4 níveis de vitamina K), com 4 repetições de 8 aves por unidade experimental.

Os tratamentos consistiram de uma dieta básica purificada (TABELA 1) contendo todos os aminoácidos essenciais (TABELA 2) minerais (TABELA 3) e vitaminas (TABELA 4), exceto a vitamina K e suplementada com 2 níveis de ácido L-glutâmico (6,25 e 12,5%) combinados com 4 níveis de vitamina K (0,02; 0,20; 2,0 e 20,0 mg/kg de dieta). Cada tratamento consistiu de 4 repetições de 8 animais cada. As aves foram alojadas em baterias aquecidas com piso de telas elevados e receberam água e dieta a vontade, durante todo o período experimental de 14 dias. As aves e a ração foram pesadas no início do experimento e a cada semana após a sua montagem para registro dos parâmetros ganho de peso, consumo de ração e cálculo da conversão alimentar.

## **2.2. Avaliação da incidência de problemas de pernas:**

Aos 14 dias de idade as aves foram avaliadas visualmente quanto aos problemas de pernas e esses classificados conforme o grau de deformidade.

Na avaliação da incidência de anormalidades de pernas foi utilizado o sistema de escore, dividido em categorias, adaptado de KESTIN et al., (1992) conforme o grau de deformidade, constatado por exame visual:

Escore 0 - sem deformidade

Escore 1 - ligeiramente deformada

Escore 2 - deformidade, com dificuldade na movimentação

Escore 3 - completamente deformada

Com a divisão entre as categorias, um sistema de escore fornece uma identificação útil do estado geral das aves, quantificando a incidência de problemas de pernas e a distribuição dos escores obtidos.

## **2.3. Análise estatística:**

A análise estatística dos dados foi feita por análise de variância utilizando-se o sistema SAEG (Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas). Os efeitos dos níveis de ácido L-glutâmico foram testados pelo teste “f”. E os efeitos dos níveis de vitamina K, quando necessário, por regressão. A escolha do melhor modelo baseou-se no coeficiente de determinação ( $R^2$ ), na significância dos coeficientes de regressão pelo teste “t” e na coerência com o fenômeno biológico.

TABELA 1 – Dieta básica

Ingredientes	%
Aminoácidos essenciais 1/	9,77
Mistura vitamínica 2/	3,45
Mistura mineral 3/	9,98
Óleo de soja	15,00
Bicarbonato de sódio	1,00
Amido qsp	100
<b>Valores calculados</b>	
Energia metabolizável	2811 kcal
Proteínas: dietas com 6,25% L-Glu	14,5%
dietas com 12,5% L-Glu	20,1%
Relação Ca:P	1,94

1/ veja Quadro 2, 2/ veja Quadro 3, 3/ veja Quadro 4.

TABELA 2 - Aminoácidos essenciais <sup>1/</sup>

Aminoácidos	%
L-Arginina	1,20
L-Histidina. HCl. H <sub>2</sub> O	0,42
L-Lisina. HCl	1,14
L-Tirosina	0,57
L-Fenilalanina	0,63
L-Triptofano	0,18
DL-Metionina	0,41
L-Cistina	0,41
L-Treonina	0,76
L-Leucina	1,26
L-Isoleucina	0,76
L-Valina	0,88
L-Prolina	0,50
Glicina	0,74

1/ BAKER e HAN (1994)

TABELA 3 - Mistura vitamínica <sup>1/</sup>

Ingredientes	Quantidade /kg dieta
Colina 60%	3,3g
Retinil palmitato	5.000 UI
Colecalciferol	2.250 UI
D- $\alpha$ -tocoferil acetato	22 UI
Menadiona sódio bissulfito	Variável
Inositol	1,0 g
Riboflavina	9,0 mg
Tiamin.HCl	6,0 mg
Pantotenato de cálcio	20,0 mg
Niacina	50,0 mg
Piridoxina	8,0 mg
Ácido fólico	2,0 mg
Biotina	0,3 mg
B12 (0,1%)	20,0 mg
BHT	0,125 mg
Excipiente	30,0 g

1/ FEATHERSTON e ROGLER (1978)

2/ 0,02, 0,2 2,0 e 20,0 mg/kg de dieta.

TABELA 4 – Mistura mineral <sup>1/</sup>

Ingredientes	Quantidade/ kg dieta
CaCO <sub>3</sub>	18,6526 g
CaHPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	30,5300 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	11,2000 g
NaCl	6,0000 g
FeSO <sub>4</sub>	0,2000 g
ZnO	0,1225 g
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,0150 g
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,5100 g
KI	0,0400 g
MgCO <sub>3</sub>	2,5000 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	1,0000 g
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	0,2200 mg
Excipiente (casca de arroz)	30,000 g

1/ FEATHERSTON e ROGLER (1978)

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1. Desempenho:**

Os dados sobre ganho de peso, consumo e conversão alimentar observados nos frangos de corte aos 14 dias de idade, são apresentados na Tabela 5.

Não foi observada interação significativa ( $P>0,05$ ) entre os níveis de L-Glutâmico (L-Glu) e de Vitamina K (Vit. K); e os níveis de Vit. K estudados não afetaram significativamente ( $P>0,05$ ) o desempenho dos pintos.

RODRIGUES (1992) estudando níveis de Vit. K no desempenho de pintos no período de um aos 14 dias de idade, não observou efeito dos níveis estudados nos parâmetros ganho de peso, consumo e conversão alimentar.

As aves alimentadas com dieta básica suplementada com 6,25% de L-Glu (dietas 1, 2, 3 e 4) obtiveram significativamente ( $P<0,05$ ) menor ganho de peso (158g) do que aquelas alimentadas com dietas suplementadas com 12,5% (dietas 5, 6, 7 e 8), que tiveram ganho de peso médio de 172g.

Os resultados obtidos confirmam a eficiência do L-Glu como fonte de nitrogênio não específico para promover ganho de peso em aves alimentadas com dietas purificadas.

TABELA 5 – Valores médios de ganho de peso, consumo e conversão alimentar de pintos de corte aos 14 dias de idade

Característica	Vitamina K (mg/kg dieta)	Ácido L-Glutâmico (%)		Média
		6,25	12,5	
Ganho de peso (g)	0,02	155	172	164
	0,2	157	172	165
	2,0	158	172	165
	20,0	161	170	166
Média <sup>1</sup>		158 <sup>b</sup>	172 <sup>a</sup>	
Consumo de ração (g)	0,02	248	255	252
	0,2	252	257	255
	2,0	256	259	258
	20,0	261	258	260
Média <sup>1</sup>		254 <sup>a</sup>	257 <sup>a</sup>	
Conversão alimentar (g)	0,02	1,59	1,50	1,55
	0,2	1,59	1,50	1,55
	2,0	1,61	1,51	1,56
	20,0	1,62	1,51	1,57
Média <sup>1</sup>		1,60 <sup>a</sup>	1,51 <sup>b</sup>	

1/ Média seguida por letras diferentes diferem entre si pelo teste “F”

GUIMARÃES et al. (1993) obtiveram melhor desempenho de pintos de corte criados no chão, alimentados com dietas purificadas suplementadas com 10% de L-Glu. Quando os pintos foram criados em baterias aquecidas, o nível de L-Glu necessário foi de 12,5% (RIBEIRO et al., 1995a; RODRIGUES e MORAES, 1995). Entretanto, MORAES et al. (1984) e SILVA e MORAES (1995) verificaram níveis mais baixo, respectivamente 10,0 e 7,5% de L-Glu para máximo desempenho de pintos alimentados com dietas purificadas. Em todos os trabalhos citados, dietas com nível igual ou inferior a 5,0% de L-Glu resultaram em redução de crescimento e alta taxa de mortalidade.

Os níveis estudados de L-Glu não afetaram significativamente o consumo das aves.

Para o parâmetro conversão alimentar as aves alimentadas com dietas com nível superior de L-Glu (12,5%) tiveram significativamente ( $P < 0,05$ ) menor conversão (1,51) do que aquelas alimentadas com dietas suplementada com 6,25% de L-Glu com conversão alimentar média de 1,60.

Os resultados obtidos estão de acordo com MORAES et al. (1984), GUIMARÃES (1988) e PERINI (1993) que observaram haver necessidade de suplementação das dietas com aminoácidos não essenciais até nível de 12,5% para melhorar a conversão alimentar.

### **3.2. Problemas de Pernas**

Os percentuais médios de incidência de problemas de pernas obtidos neste experimento estão relacionados na Tabela 6.

O melhor tratamento em relação à incidência de problemas de pernas foi o tratamento contendo 12,5% de L-Glu e 2,0 mg/kg de dieta de vitamina K, com percentual de problemas de pernas de 14,3%. Deste total, todas as aves foram classificadas com escore 1, o qual indica ligeira deformação. RODRIGUES (1992) não observou efeitos dos níveis de VitK na incidência de problemas de pernas, em aves alimentadas com dietas purificadas, no período de um a 14 dias de idade.

Os animais alimentados com dietas suplementadas com 6,25% de L-Glu apresentaram 100% de problemas de pernas sendo que 22,8% foi classificado com escore 4, o qual indica maior grau deformidade. Enquanto que as aves alimentadas com dietas experimentais com 12,5% de L-Glu apresentaram percentual de 26,8% de deformações e nenhuma ave, com problemas de pernas, foi classificada com escore 4.

TABELA 6 – Percentual médio de incidência de problemas de pernas em frangos de corte aos 14 dias de idade

Ácido Glutâmico (%)	Vitamina K (UI)	Pernas:			
		Sem deformidade	Ligeiramente deformada	Deformada	Completamente deformada
6,25	0,02	0	43,0	22,4	34,6
	0,2	0	31,2	42,5	26,3
	2,0	0	36,4	53,6	10,0
	20,0	0	40,5	39,3	20,2
Média		0	37,8	39,5	22,8
12,5	0,02	53,5	42,9	3,6	0
	0,2	67,9	32,1	0	0
	2,0	85,7	14,3	0	0
	20,0	82,1	17,9	0	0
Média		72,3	26,8	0,9	0

A necessidade de nitrogênio não específico para a redução de problemas de pernas tem sido verificada. Assim como o encontrado neste estudo, GUIMARÃES et al. (1993), RIBEIRO et al. (1995b), SILVA e MORAES (1995), observaram que é necessário um mínimo de 12,5% de L-Glu para reduzir ao máximo a incidência de problemas de pernas, entretanto, não foi observado a eliminação dos problemas.

CORNÉLIO (1995) verificou ausência de anomalias em pintos alimentados com dieta de 12,5% de L-Glu e relação Ca e P igual a 3:1, entretanto o desempenho dos animais foi inferior ao daqueles alimentados com dieta com o mesmo nível de L-Glu e relação 2:1 de Ca e P.

#### **4. RESUMO E CONCLUSÕES**

Duzentos e cinquenta e seis pintos de um dia, machos, Avian Farm, de peso médio de 48 gramas foram criados em baterias aquecidas com piso de tela elevado. O desenho experimental foi um esquema fatorial 2X4 (2 níveis de ácido L-glutâmico; 6,25 e 12,5%, combinados com 4 níveis de vitamina K; 0,02; 0,20; 2,0 e 20,0 mg/kg de dieta). Consistindo de 8 tratamentos, 4 repetições e 8 animais por repetição. As aves receberam água e dieta a vontade, durante todo o período experimental de 14 dias.

Não houve interação significativa entre os níveis de L-Glu e VitK e os níveis de VitK estudados não afetaram os parâmetros ganho de peso, consumo e conversão alimentar. Os níveis de L-glu não afetaram o consumo das aves durante o período experimental.

Os resultados mostraram que as aves alimentadas com dietas experimentais contendo 12,5% de L-Glu apresentaram maior ganho de peso (172g), melhor conversão alimentar (1,51) e menor incidência de problemas de pernas (26,8%) quando comparadas àquelas alimentadas com dietas contendo 6,25% de L-Glu, que apresentaram ganho de peso médio de 158g, conversão alimentar de 1,60 e 100% de incidência de problemas de pernas.

O melhor desempenho foi observado quando as aves receberam dietas experimentais suplementadas com 12,5% de L-Glu, independentemente dos níveis de VitK. Em relação à incidência de problemas de pernas, as aves alimentadas com a dieta contendo 12,5% de L-Glu e 2,0 mg/kg de dieta de vitamina K apresentaram um menor percentual de deformações 14,3%.

Conclui-se que os níveis de VitK estudados não afetaram os parâmetros estudados e que o nível de 12,5% de L-Glu foi eficaz para maximizar o desempenho e reduzir a incidência de problemas de pernas de pintos de corte.

## **CAPÍTULO 2**

### **CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E TEORES DE CINZAS, Ca, P E Mg DE TIBIOTARSOS E FÊMURES DE PINTOS DE CORTE**

#### **1. INTRODUÇÃO**

O osso é um tecido metabolicamente ativo, multifuncional, e que compreende populações de células como condrócitos, osteoblastos e células endoteliais. Esse complexo meio de células produz uma grande variedade de reguladores biológicos que controlam o metabolismo ósseo. (LEESON e SUMMERS, 1988).

O crescimento longitudinal dos ossos é iniciado pelo desenvolvimento de cartilagens antes do tecido ósseo. A cartilagem formada é posteriormente degradada como resultado da calcificação, células que formam cartilagem (condrôcitos) degeneram e ocorre invasão de células formadoras de tecido ósseo (osteoblastos). As mudanças de geração e degeneração ocorrem na placa de crescimento. Com relação à maturidade, o crescimento longitudinal cessa devido ao desaparecimento de elementos cartilagosos da placa de crescimento.

Ganhos em largura dos osso são consequência da formação interna de lamelas concêntricas pela camada superiosteal. Formação e reabsorção óssea continuam por toda a vida, resultando em renovação e remodelagem dos elementos ósseos (PINES e HURMITZ, 1991).

O crescimento e a remodelagem dos ossos longos das aves são regulados por complexas interações entre o potencial genético, influências ambientais e pela nutrição. Muitos problemas ou lesões do esqueleto locomotor da aves são consequência de anormalidades nos processos de modelagem e remodelagem (WATKINS, 1993).

É necessário um núcleo, prévio, de cristalização para que o processo de calcificação possa ocorrer, resultando em crescimento do cristal de hidroxiapatita. A taxa de crescimento neste processo é regulada pelas concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{HPO}_4^{2-}$  e pode ser influenciada por várias proteínas da matriz óssea, tais como proteoglicanas, osteocalcina, fosfoproteínas e osteonectina (PINES e HURMITZ, 1991).

Vários estudos (FEATHERTON, 1976; MORAES et al., 1984; GUIMARÃES et al., 1993; RODRIGUES e MORAES, 1995) com dieta purificada têm demonstrado que problemas de pernas são observados em aves alimentadas com dietas deficientes em nitrogênio não específico. E a análise dos teores de cinzas e minerais nas cinzas dessas aves demonstra não haver influência da dieta sobre os teores desses minerais, levando estes autores a sugerirem uma alteração na matriz orgânica dos ossos o que poderia explicar o aparecimento de deformações dos ossos.

A vitamina K está, reconhecidamente, envolvida na modificação pós síntese de resíduos de ácido glutâmico a  $\gamma$ -carboxi-glutâmico. Esta conversão confere propriedades de ligar cálcio a essas proteínas (LOESER et al. (1992).

Osteoclastina é uma Gla-proteína óssea sintetizada, exclusivamente, pelos osteoblastos, que apresenta propriedade de ligação com o íon cálcio e tem sido sugerido sua participação no metabolismo e crescimento ósseo (HAUSCHKA et al., 1989).

O requerimento de aves para vitamina K é baseado nas respostas de coagulação sanguínea e não existe informação sobre a quantidade necessária de vitamina K para crescimento ósseo (FLEMING et al., 1998).

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos de ácido L-Glutâmico e de Vitamina K nos parâmetros físicos (resistência à quebra e comprimento) e na composição química parcial de tibiotasos e fêmures de frangos de corte de 1 a 14 dias de idade.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. Procedimentos gerais:**

O experimento foi montado segundo um esquema fatorial, em um delineamento inteiramente casualizado 2x4 (2 níveis de ácido L-glutâmico e 4 níveis de vitamina K), no Setor de Avicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa.

Duzentos e cinquenta e seis pintinhos de um dia, machos, Avian Farm, de peso médio de 48 gramas foram distribuídos aleatoriamente nos tratamentos. Os tratamentos consistiram de uma dieta básica purificada (TABELA 1) contendo todos os aminoácidos essenciais (TABELA 2), minerais (TABELA 3) e vitaminas (TABELA 4), exceto a vitamina K e suplementada com 2 níveis de ácido L-glutâmico (6,25 e 12,5%) combinados com 4 níveis de vitamina K (0,02; 0,20; 2,0 e 20,0 mg/kg de dieta). Cada tratamento consistiu de 4 repetições de 8 animais cada. As aves foram alojadas em baterias aquecidas com piso de telas elevados e receberam água e dieta a vontade, durante todo o período experimental de 14 dias.

TABELA 1 – Dieta básica

Ingredientes	%
Aminoácidos essenciais 1/	9,77
Mistura vitamínica 2/	3,45
Mistura mineral 3/	9,98
Óleo de soja	15,00
Bicarbonato de sódio	1,00
Amido qsp	100,00
<b>Valores calculados</b>	
Energia metabolizável	2811 kcal
Proteínas: dietas com 6,25% L-Glu	14,5%
dietas com 12,5% L-Glu	20,1%
Relação Ca:P	1,94

1/ veja Quadro 2.

2/ veja Quadro 3.

3/ veja Quadro 4.

TABELA 2 - Aminoácidos essenciais <sup>1/</sup>

Aminoácidos	%
L-Arginina	1,20
L-Histidina. HCl. H <sub>2</sub> O	0,42
L-Lisina. HCl	1,14
L-Tirosina	0,57
L-Fenilalanina	0,63
L-Triptofano	0,18
DL-Metionina	0,41
L-Cistina	0,41
L-Treonina	0,76
L-Leucina	1,26
L-Isoleucina	0,76
L-Valina	0,88
L-Prolina	0,50
Glicina	0,74

1/ BAKER e HAN (1994)

TABELA 3 - Mistura vitamínica <sup>1/</sup>

Ingredientes	Quantidade /kg dieta
Colina 60%	3,3g
Retinil palmitato	5.000 UI
Colecalciferol	2.250 UI
D- $\alpha$ -tocoferil acetato	22 UI
Menadiona sódio bissulfito	Variável
Inositol	1,0 g
Riboflavina	9,0 mg
Tiamin.HCl	6,0 mg
Pantotenato de cálcio	20,0 mg
Niacina	50,0 mg
Piridoxina	8,0 mg
Ácido fólico	2,0 mg
Biotina	0,3 mg
B12 (0,1%)	20,0 mg
BHT	0,125 mg
Excipiente	30,0 g

1/ FEATHERSTON e ROGLER (1978)  
2/ 0,02, 0,2 2,0 E 20,0 mg/kg de dieta.

TABELA 4 – Mistura mineral <sup>1/</sup>

Ingredientes	Quantidade/ kg dieta
CaCO <sub>3</sub>	18,6526 g
CaHPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	30,5300 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	11,2000 g
NaCl	6,0000 g
FeSO <sub>4</sub>	0,2000 g
ZnO	0,1225 g
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,0150 g
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,5100 g
KI	0,0400 g
MgCO <sub>3</sub>	2,5000 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	1,0000 g
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	0,2200 mg
Excipiente (casca de arroz)	30,000 g

1/ FEATHERSTON e ROGLER (1978)

## **2.2. Determinação das características físicas dos ossos**

Ao término do período experimental, cinco aves de cada tratamento foram sacrificadas por deslocamento cervical e os ossos (tibiotalos e fêmures) de ambas as pernas removidos, limpos de todo tecido, medidos seus comprimentos com o uso de paquímetro e pesados.

A resistência à quebra ou flexão dos ossos foi determinada utilizando-se o Aparelho Instron Corporation IX Automated Materials Testing System 1,09.

## **2.3. Determinação de cinzas e minerais nas cinzas**

Os ossos utilizados para determinação de resistência foram cortados longitudinalmente e a medula óssea retirada por jatos de água destilada e deionizada. A seguir, os ossos foram desengordurados com éter de petróleo por 12 horas, e secos em estufa e pesados.

Após, os teores de cinzas foram determinados em forno tipo Mufla a 600°C (GARDINER et al. (1961). A seguir, as cinzas foram usadas para preparo de solução mineral pela dissolução das cinzas em solução de ácido clorídrico (1:1). O ácido foi evaporado em banho de areia por 30 minutos. O aquecimento em meio ácido tem a função de descomplexar os minerais.

Os teores de cálcio e magnésio nas cinzas dos ossos foram determinados por espectrometria de absorção atômica. Os teores de fósforo foram determinados por colorimetria. Estas determinações foram conduzidas conforme metodologia descrita por SILVA (1990).

## **2.4. Análise estatística:**

A análise estatística dos dados foi feita por análise de variância utilizando-se o sistema SAEG (Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas). Os efeitos dos níveis de ácido L-glutâmico foram testados pelo teste “f”. E os efeitos dos níveis de vitamina K, quando necessário, por regressão. A escolha do melhor modelo baseou-se no coeficiente de determinação ( $R^2$ ), na significância dos coeficientes de regressão pelo teste “t” e na coerência com o fenômeno biológico.

### **3.1. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1 Característica físicas de tibiotarsos e fêmures: comprimento e resistência à quebra**

Os valores médios das características físicas (comprimento e resistência à quebra) dos ossos tibiotarso e fêmur dos frangos de corte são apresentados na Tabela 5.

Os níveis de Vit. K não influenciaram no comprimento dos ossos. e também não houve interação significativa entre os níveis de L-Glu e Vit. K.

As aves alimentadas com dietas suplementadas com 12,5% de L-Glu apresentaram, significativamente ( $P < 0,05$ ), ossos maiores do que aquelas alimentadas com dietas com 6,25% de L-Glu. Como este nível de L-Glu também, foi melhor para ganho de peso, pode-se supor que o comprimento dos ossos seja reflexo do ganho de peso, ou seja aves que cresceram mais apresentaram ossos mais longo.

TAFURI et al., (1993) observaram que aves alimentadas com dietas com 15% de proteína suplementada com metionina e lisina ou dietas com 22% de proteína apresentaram tibiotarso maiores do que aquelas alimentadas com dietas com nível subótimo de proteína.

Entretanto, quando se tomou o peso das aves como co-variável, os resultados não diferiram entre si, estatisticamente. Assim, os tratamentos refletiram-se nos ossos por meio do ganho de peso. As rações que promoveram melhores taxas de crescimento, portanto aves mais pesadas, clinicamente normais ou não, apresentaram ossos mais longos.

TABELA 5 – Valores médios de comprimento e resistência de tibiotarso e fêmur de frangos de corte aos 14 dias de idade

Característica	Vitamina K (mg/kg dieta)	Ácido L-Glutâmico (%)		Média
		6,25	12,5	
Comprimento fêmur (mm)	0,02	31,8	36,8	34,3
	0,2	32,0	36,8	34,4
	2,0	32,6	37,0	34,8
	20,0	31,8	36,6	34,2
Média <sup>1</sup>		32,1 <sup>b</sup>	36,8 <sup>a</sup>	
Comprimento tibiotarso (mm)	0,02	47,2	51,2	49,2
	0,2	47,4	51,6	49,5
	2,0	47,6	51,4	49,5
	20,0	47,4	51,4	49,4
Média <sup>1</sup>		47,4 <sup>b</sup>	51,4 <sup>a</sup>	
Resistência fêmur (kgf/cm <sup>2</sup> )	0,02	53,93	55,05	54,49
	0,2	52,80	55,34	54,07
	2,0	54,32	57,22	55,77
	20,0	54,37	55,61	54,99
Média <sup>1</sup>		53,86 <sup>a</sup>	55,81 <sup>a</sup>	
Resistência tibiotarso (kgf/cm <sup>2</sup> )	0,02	54,73	56,37	55,55
	0,2	53,58	56,55	55,07
	2,0	54,59	56,70	55,65
	20,0	55,45	56,90	56,18
Média <sup>1</sup>		54,59 <sup>a</sup>	56,63 <sup>a</sup>	

1/ Média seguida por letras diferentes diferem entre pelo teste “F”

Em estudos de deformações de pernas, o encurtamento de ossos nem sempre tem sido constatado. BEIRNE e JENSEN (1981) descreveram sobre uma anomalia denominada “twisted legs”, caracterizada por torção e arqueamento de pernas, não se verificando encurtamento dos ossos longos. Do mesmo modo LEWIS (1981) também não observou redução no comprimento de ossos, nos casos de “twisted legs”.

SILVA (1995) estudando efeitos de níveis de L-Glu na incidência de anormalidades no tecido ósseo, observou redução dos comprimentos de tíbiotasos e fêmures das aves alimentadas com dietas suplementadas com 5% de L-Glu.

Os níveis de L-Glu e VitK estudados não afetaram significativamente ( $P>0,05$ ) os valores de resistência à quebra dos ossos tíbiotarsos e fêmures. Entretanto os valores numéricos, médios, de resistência à quebra foram maiores para as aves alimentadas com dietas suplementadas com 12,5% de L-Glu, tanto para fêmures ( $55,81 \text{ kgf/cm}^2$ ) como para tíbiotarsos ( $56,63 \text{ kgf/cm}^2$ ), quando comparados com os obtidos para aves alimentadas com 6,25% de L-Glu,  $53,86 \text{ kgf/cm}^2$  para fêmur e de  $55,81 \text{ kgf/cm}^2$  para tíbiotarso.

FLEMING et al., (1998) estudando características estruturais e resistência óssea em galinhas de 15, 25, 50 e 70 semanas de idade, alimentadas com dietas suplementadas com vitamina K, acima do recomendado (12 mg/kg de dieta) não observaram alteração na resistência à quebra com o aumento do nível de vitamina K, entretanto o aumento de vitamina K da dieta aumentou o volume do osso caneloso no tíbiotaso.

YALÇIN et al. (1998) observaram que a resistência à quebra de tíbiotaso está relacionada com o comprimento e peso dos ossos, apesar desta correlação ser baixa (0,220).

A resistência óssea está relacionada com as propriedades de seus constituintes. O colágeno que constitui aproximadamente 90% da matriz orgânica do osso contribui por sua força tensil e propriedades plásticas, enquanto que os minerais contribuem com a rigidez do osso e propriedades de compressão.

É bem conhecido que a suplementação com minerais e vitaminas pode melhorar a mineralização óssea, o teor de cinzas tem correlação positiva com a resistência óssea, entretanto pouco se conhece acerca das mudanças na matriz extracelular e sua regulação e a influência que pode exercer na resistência óssea (RATH et al., 2000).

### 3.2 Porcentagem de cinzas de tibiotarsos e fêmures

Os valores médios da porcentagem de cinzas de tibiotarsos e fêmures de frangos de corte aos 14 dias de idade são apresentados na Tabela 6.

Os valores de L-Glu e Vit. K estudados não afetaram significativamente a porcentagem de cinzas dos ossos. Também não houve interação significativa entre L-Glu e VitK.

O valor médio da porcentagem de cinzas de tibiotarso foi de 40,27% e para fêmur de 40,24%.

TABELA 6 – Teores médios de cinzas de tibiotarso e fêmur de frangos de corte aos 14 dias de idade

Característica	Vitamina K (mg/kg dieta)	Ácido L-glutâmico (%)		Média
		6,25	12,5	
Cinzas tibiotarsos (%)	0,02	40,14	40,26	40,20
	0,2	40,34	40,14	40,24
	2,0	40,24	40,16	40,20
	20,0	40,38	40,44	40,41
Média <sup>1</sup>		40,28 <sup>a</sup>	40,25 <sup>a</sup>	
Cinzas fêmur (%)	0,02	40,34	40,38	40,36
	0,2	40,18	40,10	40,14
	2,0	40,28	40,18	40,23
	20,0	40,24	40,20	40,22
Média <sup>1</sup>		40,26 <sup>a</sup>	40,22 <sup>a</sup>	

1/ Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo test “f”

NELSON et al., (1992) estudando os efeitos de cálcio, fósforo e conteúdo energético da dieta no crescimento e incidência de problemas de pernas em frangos de corte, observaram que nem os tratamentos nem as condições das pernas afetaram a porcentagem de cinzas que teve valor médio de 40,82% .

GUIMARÃES et al., (1996) não observaram diferenças significativas na porcentagem de cinzas de fêmures de pintos de corte alimentados com dietas purificadas, suplementadas com diferentes aminoácidos não essenciais.

TAFURI et al., (1993) não observaram diferenças significativas entre aves clinicamente normais ou não, independente do tratamento, nos teores de cinzas dos ossos secos e desengordurados, sendo obtido um valor médio de 46%.

MORAES et al., (1984) trabalhando com pintos Hubbard de 1 a 14 dias de idades, alimentados com dietas purificadas com diferentes níveis de nitrogênio não específico, verificaram ocorrência de anormalias de pernas. Tais anomalias não se refletiram nos teores de cinzas, que expressos em porcentagem sobre os pesos dos ossos secos e desengordurados, situaram-se entre 43 e 45%.

### **3.3. Teores médios de cálcio, fósforo, magnésio e relação Ca:P nas cinzas de tibiotarso e fêmures:**

A Tabela 7 apresenta os teores médios obtidos para cálcio, fósforo, relação Ca:P e magnésio nas cinzas de tibiotarsos e fêmures.

Não houve interação significativa ( $P > 0,05$ ) entre os níveis de L-Glu e Vit. K estudados. Os níveis de L-Glu e Vit. K estudados não influenciaram os teores dos minerais.

LAVELLE et al., 1994 estudando os efeitos da deficiência de Vit. K no metabolismo ósseo de galinhas por um período de 28 semanas, observaram que o status de vitamina K não influenciou o conteúdo mineral dos ossos.

RODRIGUES, et al., 1996 não observaram efeitos dos níveis de L-Glu (5 e 12,5%) e Vit. K (0,2; 2,0 e 20,0 mg/ kg dieta) nos teores de Ca, P e Mg nos ossos de pintos alimentados com dietas purificadas.

TABELA 7 – Teores médios de cálcio, fósforo, relação cálcio:fósforo e magnésio no fêmur e tibiotarso de frangos de corte aos 14 dias de idade

Característica	Vitamina K (mg/kg dieta)		Ácido L-glutâmico (%)		Média
	0,02	0,2	2,0	20,0	
Cálcio fêmur (%)			6,25	12,5	
	0,02		37,82	38,58	38,20
	0,2		39,00	37,84	38,42
	2,0		38,58	38,44	38,51
	20,0		38,38	38,52	38,45
Média <sup>1</sup>		38,45 <sup>a</sup>	38,35 <sup>a</sup>		
Cálcio tibiotarso (%)	0,02		37,94	38,60	38,27
	0,2		38,70	37,84	38,27
	2,0		39,09	38,40	38,75
	20,0		38,36	39,12	38,74
	Média <sup>1</sup>		38,52 <sup>a</sup>	38,49 <sup>a</sup>	
Fósforo fêmur (%)	0,02		17,40	18,40	17,90
	0,2		18,56	17,50	18,03
	2,0		19,46	18,46	18,96
	20,0		18,50	19,44	18,97
	Média <sup>1</sup>		18,48 <sup>a</sup>	18,45 <sup>a</sup>	
Fósforo tibiotarso (%)	0,02		17,82	17,42	17,62
	0,2		18,56	18,46	18,51
	2,0		19,36	19,48	19,42
	20,0		18,44	18,54	18,49
	Média <sup>1</sup>		18,55 <sup>a</sup>	18,48 <sup>a</sup>	
Relação Ca:P fêmur	0,02		2,09	2,10	2,10
	0,2		2,08	2,08	2,08
	2,0		2,09	2,09	2,09
	20,0		2,07	2,09	2,08
	Média <sup>1</sup>		2,08 <sup>a</sup>	2,09 <sup>a</sup>	
Relação Ca:P tibiotarso	0,02		2,11	2,10	2,11
	0,2		2,09	2,08	2,09
	2,0		2,08	2,08	2,08
	20,0		2,08	2,08	2,08
	Média <sup>1</sup>		2,09 <sup>a</sup>	2,09 <sup>a</sup>	
Magnésio fêmur (%)	0,02		0,77	0,78	0,78
	0,2		0,78	0,77	0,78
	2,0		0,79	0,79	0,79
	20,0		0,78	0,78	0,78
	Média <sup>1</sup>		0,78 <sup>a</sup>	0,78 <sup>a</sup>	
Magnésio tibiotarso (%)	0,02		0,78	0,77	0,78
	0,2		0,77	0,78	0,78
	2,0		0,79	0,78	0,79
	20,0		0,78	0,79	0,79
	Média <sup>1</sup>		0,78 <sup>a</sup>	0,78 <sup>a</sup>	

1/ Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste “F”

GUIMARÃES et al., 1996 estudando a influência de fontes de nitrogênio não específico, na forma de aminoácidos não essenciais, em problemas de pernas de pintos de corte, observaram que as diferentes dietas não afetaram os teores de cálcio e magnésio de tibiotarso dos animais. Para o teor de fósforo foi observado que aves alimentadas com dieta suplementada com 5% de L-Glu apresentaram menor teor. Embora tenha ocorrido diferenças significativas nos teores de minerais dos fêmures, os valores encontrados estavam dentro de padrões fisiológicos.

RIBEIRO et al., 1995a estudando os efeitos de diferentes níveis de aminoácidos não essenciais (L-Glu, L-Asp e L-Ala) nos teores de Ca, P, relação Ca:P e magnésio nas cinzas de ossos de pintos de corte aos 14 dias de idade, observaram que não houve diferenças nos teores de Ca e P nas cinzas de fêmures das aves. Nos demais minerais as diferenças, quando ocorreram foram classificadas como pequenas variações que aparentemente se encontravam dentro de variações fisiológicas.

HAUSCHKA (1977), após tratamento de aves com antagonista de vitamina K, observou severas anomalias no tecido ósseo, entretanto tanto a histologia como a composição mineral dos ossos, não estavam afetadas.

LEASE (1982) estudando deformações de pernas causadas por deficiência de zinco, encontrou alterações irreversíveis no desenvolvimento de tíbias. O autor não encontrou diferenças significativas nos teores de cinzas e minerais dos ossos nos tratamentos estudados e propôs que poderiam ter-se formado matrizes orgânicas em diferentes quantidades ou diferentes composições, mas com a mesma capacidade de acomodar os constituintes minerais.

Os resultados obtidos indicam não ter havido nenhuma relação entre os teores de cinzas e de Ca, P, Ca:P e Mg nas cinzas e a incidência de problemas de pernas das aves submetidas às dietas experimentais, suplementadas com diferentes níveis de L-Glu e VitK. Pode-se inferir que a incidências de anormalidades ósseas estão relacionadas com a porção orgânica do osso e não com a porção mineral.

#### 4. RESUMO E CONCLUSÕES

O objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos do ácido L-glutâmico e vitamina K da dieta nas características físicas e na composição química de ossos de frangos de corte, Avian Farm, aos 14 dias de idade.

Os tratamentos consistiram de dieta básica contendo todos os L-aminoácidos indispensáveis, minerais e vitaminas (exceto a vitamina K), suplementada com 2 níveis de L-Glu (6,25 e 12,5%) e 4 níveis de Vit K (0,02; 0,2; 2,0 e 20,0 mg/kg de dieta).

As aves foram distribuídas nos tratamentos com 4 repetições de 8 animais cada, criadas em baterias aquecidas de piso de tela elevado, recebendo água e dieta à vontade durante todo o período experimental.

Ao término do experimento, 5 aves de cada tratamento foram sacrificadas por deslocamento cervical e os tibiotarso e os fêmures foram retirados, limpos de todo o tecido aderente, medidos seus comprimentos, desengordurados e pesados. Posteriormente foi determinado os teores de cinzas e minerais (Ca, P e Mg) nas cinzas.

As aves alimentadas com dietas suplementadas com 12,5% de L-Glu apresentaram, significativamente ( $P < 0,05$ ), ossos maiores do que aquelas alimentadas com dietas com 6,25% de L-Glu. Como este nível de L-Glu também, foi melhor para ganho de peso, pode-se supor que o comprimento dos ossos seja um reflexo do ganho de peso, ou seja aves que cresceram mais apresentaram ossos mais longo.

Não foi observado nenhuma interação significativa entre os níveis de L-Glu e Vit K. e os níveis de L-Glu e VitK não afetaram os parâmetros estudados. Portanto não foi observada nenhuma relação entre resistência óssea, os teores de cinzas, os teores de Ca, P e Mg e da relação Ca:P nas cinzas com a incidências de problemas de pernas dos pintos alimentados com as diferentes dietas experimentais, o que sugere que o aparecimento de problemas de pernas esteja relacionada com a porção orgânica do osso e não com a porção mineral.

## **CAPÍTULO 3**

### **TEORES DE PROTEÍNAS COLAGENOSAS, NÃO COLAGENOSAS E TOTAIS DE TIBIOTARSOS E FÊMURES DE PINTOS DE CORTE**

#### **1. INTRODUÇÃO**

Problemas ósseos são apontados como uns dos quatro maiores fatores que limitam a performance de aves tipo carne. Frangos e perus de rápido crescimento, que ganham peso marcadamente com idade mais jovem, são os que têm mais problemas de pernas e maiores perdas comparados com aves de crescimento mais tardio (DAY, 1990).

Alguns trabalhos têm registrado os efeitos de diferentes aminoácidos dispensáveis e usados como fontes de nitrogênio não específico em dietas purificadas, no desenvolvimento e incidência de problemas de pernas de pintos de corte.

RIBEIRO et al., 1995; GUIMARÃES et al., 1993; RODRIGUES e MORAES, 1995 e GUIMARÃES et al., 1996 observaram que baixos níveis de nitrogênio não específico (menor que 6,25%) resultaram em pintos com menores ganho de peso e maior incidência de problemas de pernas do que aqueles alimentados com um nível superior (10 ou 12,5% de L-Glu).

Em todos estes trabalhos verificou-se que os animais com alta incidência de problemas de pernas apresentaram significativamente, maiores teores de proteínas não colagenosas ou extraíveis com EDTA.

Dentre as proteínas não colagenosas, estão proteínas que contêm resíduos do aminoácido  $\gamma$ -carboxi-glutâmico (Gla), as quais têm sido denominadas Gla-proteínas (osteocalcina e Gla-proteína da matriz). Essas proteínas são sintetizadas pelos osteoblastos, mas somente osteocalcina é sintetizada exclusivamente pelo osteoblasto. (HAUSCHKA et al., 1989, FRASER e PRICE, 1988).

Muitas linhas de evidência implicam osteocalcina na modulação ou turnover ósseo. A expressão de osteocalcina é restrita ao osso, especificadamente à regiões destinadas à mineralização. Ratos tratados com exposição crônica a warfarim produz 2% do nível normal, de osteocalcina modificada e mostra excessiva mineralização na placa de crescimento. Osteocalcina possui habilidade de ligação com hidroxiapatita e é expressa em níveis altos em tecidos esquelético em crescimento (YOUNG et al., 1992).

VETTER et al.(1991) observaram que as mudanças nas concentrações de proteínas não colagenosas podem contribuir para a fragilidade do osso por interferir com a completa mineralização e/ou arquitetura normal.

A função metabólica da vitamina K é como cofator para a carboxilase dependente de vitamina K, uma enzima microsomal responsável pela conversão pós-síntese, de resíduos específicos de glutamyl a  $\gamma$ -carboxi-glutamyl (Gla) (SUTTIE, 1991).

O requerimento de vitamina K para aves é baseado nas respostas de coagulação sangüinea e não existe informação sobre a quantidade necessária de vitamina K para crescimento ósseo (FLEMING et al., 1998).

O objetivo desse trabalho foi verificar os efeitos dos níveis de L-Glu e Vit. K da dieta nos teores de proteínas não colagenosas (PNC), proteínas colagenosas (PC) e proteínas totais (PT) de tibiotarsos e fêmures de pintos de corte aos 14 dias de idade.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. Procedimentos gerais**

O experimento foi montado segundo um esquema fatorial, em um delineamento inteiramente casualizado 2x4 (2 níveis de ácido L-glutâmico e 4 níveis de vitamina K), no Setor de Avicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa.

Duzentos e cinquenta e seis pintinhos de um dia, machos, Avian Farm, de peso médio de 48 gramas foram distribuídos aleatoriamente nos tratamentos. Os tratamentos consistiram de uma dieta básica purificada (TABELA 1) contendo todos os aminoácidos essenciais (TABELA 2), minerais (TABELA 3) e vitaminas (TABELA 4), exceto a vitamina K e suplementada com 2 níveis de ácido L-glutâmico (6,25 e 12,5%) combinados com 4 níveis de vitamina K (0,02; 0,20; 2,0 e 20,0 mg/kg de dieta). Cada tratamento consistiu de 4 repetições de 8 animais cada. As aves foram alojadas em baterias aquecidas com piso de telas elevados e receberam água e dieta a vontade, durante todo o período experimental de 14 dias.

Ao término do período experimental, 5 aves de cada tratamento foram sacrificadas por deslocamento cervical e os ossos (tibiotalo e fêmur) de ambas as pernas removidos limpos de todo tecido aderente, medidos seus comprimentos e pesados.

TABELA 1 – Dieta básica

Ingredientes	%
Aminoácidos essenciais 1/	9,77
Mistura vitamínica 2/	3,45
Mistura mineral 3/	9,98
Óleo de soja	15,00
Bicarbonato de sódio	1,00
Amido qsp	100,00
<b>Valores calculados</b>	
Energia metabolizável	2811 kcal
Proteínas: Dietas com 6,25% L-Glu	14,5%
Dietas com 12,5% L-Glu	20,1%
Relação Ca:P	1,94

1/ veja Quadro 2.

2/ veja Quadro 3.

3/ veja Quadro 4.

TABELA 2 - Aminoácidos essenciais <sup>1/</sup>

Aminoácidos	%
L-Arginina	1,20
L-Histidina. HCl. H <sub>2</sub> O	0,42
L-Lisina. HCl	1,14
L-Tirosina	0,57
L-Fenilalanina	0,63
L-Triptofano	0,18
DL-Metionina	0,41
L-Cistina	0,41
L-Treonina	0,76
L-Leucina	1,26
L-Isoleucina	0,76
L-Valina	0,88
L-Prolina	0,50
Glicina	0,74

1/ BAKER e HAN (1994)

TABELA 3 - Mistura vitamínica <sup>1/</sup>

Ingredientes	Quantidade /kg dieta
Colina 60%	3,3g
Retinil palmitato	5.000 UI
Colecalciferol	2.250 UI
D- $\alpha$ -tocoferil acetato	22 UI
Menadiona sódio bissulfito	Variável
Inositol	1,0 g
Riboflavina	9,0 mg
Tiamin.HCl	6,0 mg
Pantotenato de cálcio	20,0 mg
Niacina	50,0 mg
Piridoxina	8,0 mg
Ácido fólico	2,0 mg
Biotina	0,3 mg
B12 (0,1%)	20,0 mg
BHT	0,125 mg
Excipiente	30,0 g

1/ FEATHERSTON e ROGLER (1978)  
2/ 0,02, 0,2 2,0 E 20,0 mg/kg de dieta.

TABELA 4 – Mistura mineral <sup>1/</sup>

Ingredientes	Quantidade/ kg dieta
CaCO <sub>3</sub>	18,6526 g
CaHPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	30,5300 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	11,2000 g
NaCl	6,0000 g
FeSO <sub>4</sub>	0,2000 g
ZnO	0,1225 g
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,0150 g
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,5100 g
KI	0,0400 g
MgCO <sub>3</sub>	2,5000 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	1,0000 g
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	0,2200 mg
Excipiente (casca de arroz)	30,000 g

1/ FEATHERSTON e ROGLER (1978)

## **1.2 Análise bioquímica dos ossos:**

Os ossos foram desengordurados com éter de petróleo por 10 horas, secos e pesados. Após, 5 ossos de cada tratamento foram submetidos à extração das proteínas não colagenosas (PNC) com EDTA (ácido etilenodiamina tetracético) (HAUSCHKA e GALLOP, 1977), o fim da extração foi determinado com o ácido oxálico que permite identificar a desmineralização completa. Os teores de PNC foram determinados de acordo com BRADFORD (1976), utilizando albumina sérica bovina como padrão.

Os ossos, após desmineralização foram lavados exaustivamente com água destilada e deionizada para eliminar o EDTA e usados para estimar o teor de proteínas colagenosas (PC), para isso foi utilizado o método de BERTHELOT para estimar nitrogênio, modificado por PEZEMEK e NIELSEN. O teor de PC foi obtido multiplicando-se o teor de nitrogênio pelo fator 6,25. Os teores de proteínas totais foram obtidos pela soma dos teores de PNC e PC.

## **2.3. Análise estatística:**

Os dados foram submetidos à análise de variância utilizando-se o sistema SAEG (Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas). Os efeitos dos níveis de ácido L-glutâmico foram testados pelo teste “f”. E os efeitos dos níveis de vitamina K, quando necessário, por regressão. A escolha do melhor modelo baseou-se no coeficiente de determinação ( $R^2$ ), na significância dos coeficientes de regressão pelo teste “t” e na coerência com o fenômeno biológico.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Proteínas não colagenosas, proteínas colagenosas e proteínas totais de tibiotalarsos e fêmures.

A Tabela 5 apresenta os valores médios de proteínas colagenosas (PC), proteínas não colagenosas (PNC), e proteínas totais (PT) de fêmures e tibiotalarsos de frangos de corte aos 14 dias de idade.

Não houve interação significativa L-Glu X Vit. K para os teores de PNC, PC e PT, tanto para fêmur como para tibiotalarso.

Os níveis de L-Glu e Vit K afetaram significativamente ( $P < 0,01$ ) os teores de PNC e PC tanto do fêmur como do tibiotalarsos. Os teores de PT não foram influenciados ( $P > 0,01$ ) pelos tratamentos.

O efeito dos níveis de Vit K sobre teores de PNC e PC de fêmures e tibiotalarsos foi um efeito quadrático, sendo crescente para PC e decrescente para PNC.

Na figura 1 e 2 observa-se o efeito dos níveis de Vit K nos teores de PNC e PC, respectivamente.

A vitamina K é, reconhecidamente, essencial para a  $\gamma$ -carboxilação de resíduos glutâmil (GLU) a  $\gamma$ -carboxiglutâmico (GLA) de proteínas óssea. (SUTTIE,1991).

TABELA 5 – Teores médios de proteína colagenosa, proteína não colagenosa e proteína total no fêmur e tibiotaso de frangos de corte aos 14 dia de idade.

Característica	Vitamina K (mg/kg dieta)	Ácido L-glutâmico (%)		Média**
		6,25	12,5	
Proteína colagenosa no fêmur (mg%)	0,02	25,21	26,20	25,71 <sup>1</sup>
	0,2	26,33	27,13	26,73
	2,0	27,27	28,05	27,66
	20,0	27,49	28,26	27,88
Média*		26,58 <sup>b</sup>	27,41 <sup>a</sup>	
Proteína colagenosa no tibiotarso (mg%)	0,02	25,35	26,27	25,81 <sup>1</sup>
	0,2	26,24	27,21	26,72
	2,0	27,22	28,13	27,68
	20,0	27,57	28,28	27,93
Média*		26,60 <sup>b</sup>	27,47 <sup>a</sup>	
Proteína não colagenosa Fêmur (mg%)	0,02	5,29	4,47	4,88 <sup>1</sup>
	0,2	4,32	3,48	3,90
	2,0	3,34	2,59	2,97
	20,0	3,13	2,38	2,76
Média*		4,02 <sup>a</sup>	3,23 <sup>b</sup>	
Proteína não colagenosa tibiotarso (mg%)	0,02	5,31	4,42	4,87 <sup>1</sup>
	0,2	4,27	3,45	3,86
	2,0	3,39	2,50	2,95
	20,0	3,15	2,25	2,70
Média*		4,03 <sup>a</sup>	3,16 <sup>b</sup>	
Proteína total fêmur (mg%)	0,02	30,50	30,67	30,59
	0,2	30,65	30,61	30,63
	2,0	30,61	30,64	30,63
	20,0	30,62	30,63	30,63
Média*		30,60 <sup>a</sup>	30,65 <sup>a</sup>	
Proteína total tibiotarso (mg%)	0,02	30,66	30,69	30,68
	0,2	30,51	30,67	30,59
	2,0	30,58	30,63	30,61
	20,0	30,71	30,54	30,63
Média*		30,62 <sup>a</sup>	30,63 <sup>a</sup>	

\* Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste “F”.

\*\* 1 efeito exponencial (P<0,01)

A ausência ou, mesmo, a deficiência de Vit. K reduz a  $\gamma$ -carboxilação e, conseqüentemente, as proteínas sem os resíduos GLA teriam sua função alterado, podendo comprometer a integridade do tecido ósseo (VERMEER et al., 1995).

Muitos estudos sugerem que a Vit. K pode estar envolvida na manutenção da saúde do tecido esquelético, possivelmente envolvida no controle da remodelagem óssea. Entretanto, existe o paradoxo do desenvolvimento do tecido ósseo, aparentemente normal na deficiência de vitamina K (BINKLEY e SUTTIE, 1995).

RODRIGUES et al. (1996) estudando anomalias ósseas em pintos de corte, alimentados com dietas purificadas e suplementadas com L-Glu e Vit K, não observaram efeito dos níveis de Vit K nos teores de PNC e PC.

Os teores de PNC dos ossos foram maiores para as aves alimentadas com dietas suplementadas com 6,25% de L-Glu (Fêmur, 4,02 mg% e tibiotarso, 4,03mg%) do que para aquelas alimentadas com dietas com 12,5% de L-Glu que apresentaram teor de PNC de 3,23 mg% (fêmur) e 3,16 mg% (tibiotarso).

Os valores mais baixos de PNC foram observados em aves que apresentaram melhor desempenho e menor incidência de problemas de pernas. O que coincide com os resultados de RIBEIRO et al. 1995 b., GUIMARÃES et al. 1996 e SILVA et al. 2000 , confirmando que as anormalidades do tecido ósseo podem estar associadas aos altos teores de PNC dos ossos das pernas de frangos de corte.

Para os teores de PC verificou-se uma inversão, os maiores teores foram observados em aves alimentadas com 12,5% de L-Glu.

RIBEIRO et al. 1995b verificaram que aves alimentadas com dieta contendo 12,5% de L-Glu apresentaram maior teor de PC (29,63 mg%) do que aquelas alimentadas com 6,25% de L-Glu que apresentaram teor de PC de 26,39 mg%.

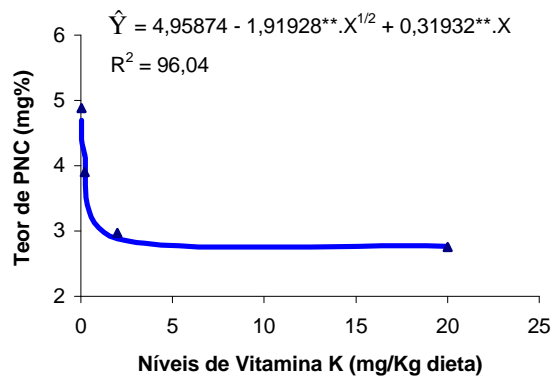


Figura 1- Estimativa do teor de proteína não colagenosa no fêmur em função de níveis de vitamina K

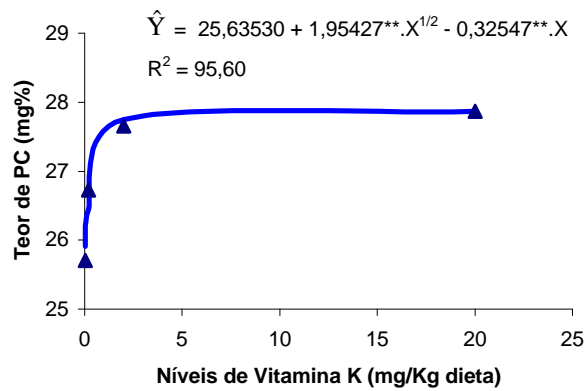


Figura 2 – Estimativa do teor de proteínas colagenosa no fêmur em função de níveis de vitamina K

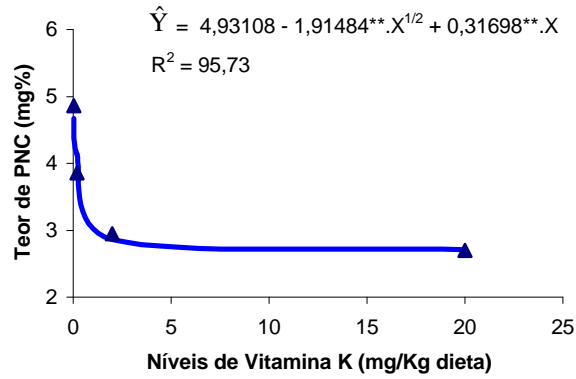


Figura 3 – Estimativa do teor de proteína não colagenosa de tibiotarso em função de níveis de vitamina K

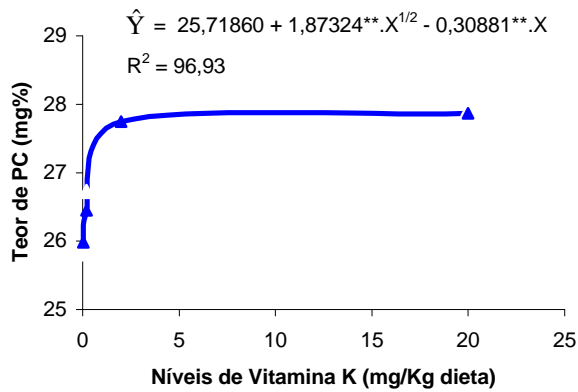


Figura 4 – Estimativa do teor de proteína colagenosa no tibiotarso em função dos níveis de vitamina K

RODRIGUES et al. (1996) observaram uma elevação nos teores de PC de pintos alimentados com dietas suplementadas com 12,5% de L-Glu em relação àqueles alimentados com 5% de L-Glu

Entretanto, SILVA et al. (2000) trabalhando com dieta purificada suplementada com L-Glu (5, 10 e 15%) e Vitamina D<sub>3</sub> (0, 5.000, 10.000 e 15.000) para pintos de corte, não observaram efeito de tratamento nos teores de PC.

A elevação do nível de 6,25% de L-Glu para 12,5% aumentou a fração colagenosa e diminuiu a fração não colagenosa. Isto pode explicar a redução da incidência de anormalidades do tecido ósseo, em pintos de corte alimentados com 12,5% de L-Glu. Esta relação entre os teores de PNC e a incidência de problemas de pernas é explicável, considerando que o aumento de Gla-proteínas (componentes das PNC) não somente inibe a mineralização óssea, como também, pode estimular a liberação de cálcio do osso (PRICE, 1985; VERMEER et al., 1995).

#### **4. RESUMO E CONCLUSÕES**

Com o objetivo de estudar os efeitos de 6,25 e 12,5% de ácido L-glutâmico combinados, cada um, com 0,02; 0,2; 2,0 e 20,0 mg de vitamina K por kg de dieta na composição bioquímica do osso (proteína colagenosa, não colagenosa e totais), foi conduzido um experimento fatorial 2x4, inteiramente casualizada, com 4 repetições de 8 animais cada.

O experimento teve duração de 14 dias e foram utilizados pintos de um dia, Avian Farm. Os pintos foram criados em baterias aquecidas e alimentados à vontade com dieta básica contendo os L-aminoácidos essenciais, minerais e vitaminas (exceto a Vit K), suplementado com L-Glu e VitK. Ao término do experimento, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, tibiotarsos e fêmures foram removidos, medidos, desengordurados e pesados, e após os teores de PC, PNC e PT foram determinados.

Não foram observados efeitos significativos ( $P > 0,01$ ) da interação L-Glu e Vit K) sobre os parâmetros estudados. Os teores de PNC foram maiores e o de PC menores nos ossos (tibiotarsos e fêmures) de pintos alimentados com 6,25% de L-Glu e os teores de PT não foram afetados pelos níveis de L-Glu e de Vit K.

Observou-se efeito quadrático dos níveis de VitK nos teores de PNC e PC dos ossos, tibiotarso e fêmur, sendo que para PNC o efeito foi decrescente e para PC crescente.

Em conclusão, a vitamina K pode estar envolvida na manutenção da saúde do tecido esquelético, possivelmente por estar envolvida no controle da remodelagem óssea. Entretanto, o desenvolvimento aparentemente normal do tecido ósseo, na deficiência de vitamina K pode ocorrer. A elevação do nível de 6,25% de L-Glu para 12,5% aumentou a fração colagenosa e diminuiu a fração não colagenosa. Isto pode explicar a redução da incidência de anormalidades do tecido ósseo, em pintos de corte alimentados com 12,5% de L-Glu.

## **CAPÍTULO 4**

### **ANÁLISE HISTOLÓGICA DE TIBIOTARSO DE PINTOS DE CORTE AOS 14 DIAS DE IDADE**

#### **1. INTRODUÇÃO**

Muito tem sido feito para caracterizar as deformidades do esqueleto em frangos e para identificar as causas dessas deformidades. Entretanto, tais deformidades continuam a dar prejuízos aos produtores. É essencial, para contornar este problema, o conhecimento sobre o crescimento e desenvolvimento do tecido ósseo. (COOK, 2000).

Comumente são classificados 12 tipos de anormalidades esqueléticas em frangos. Esses problemas podem ter uma única, ou múltiplas causas. Normalmente a etiologia e a patogênese são complexas e parecem não estar ligada a causas definidas (THORP e WADDINGTON, 1997; COOK, 2000).

Nutrição, genética, patógenos, micotoxinas e manejo têm sido relacionados com muitos problemas de pernas, por afetar diretamente o desenvolvimento e crescimento normal do esqueleto (COOK, 2000).

Alguns trabalhos têm registrado os efeitos de diferentes aminoácidos dispensáveis e usados como fontes de nitrogênio não específico em dietas purificadas, no desenvolvimento e incidência de problemas de pernas de pintos de corte. RIBEIRO et al. (1995); GUIMARÃES et al. (1993); RODRIGUES e MORAES, (1995) e GUIMARÃES et al. (1996) observaram que baixos níveis de nitrogênio não específico (menor que 6,25%) resultaram em pintos com menores ganho de peso e maior incidência de problemas de pernas do que aqueles alimentados com um nível superior (10 ou 12,5% de L-Glu).

Em todos estes trabalhos verificou-se que os animais com alta incidência de problemas de pernas apresentaram significativamente, maiores teores de proteínas não colagenosas ou extraíveis com EDTA.

A vitamina K participa na carboxilação de um resíduo específico (L-Glu) de proteínas que através desse processo adquirem habilidade para ligação com íons cálcio. As células ósseas produzem algumas dessas proteínas, incluindo osteocalcina, matriz-Gla-proteína e proteína S (VERMEER et al., 1995).

A função precisa dessas proteínas não está bem definida. Entretanto, tem sido sugerido que a osteocalcina pode estar envolvida no controle da remodelagem óssea, baseando-se nas observações que a osteocalcina é produzida pelo osteoblasto durante a formação da matriz óssea e que possui atividade quimioatrativa por monócitos, precursores de osteoclastos. Todas estas funções requerem a forma carboxilada da proteína e a carboxilação não acontece na ausência de vitamina K. O osso cortical contém mais vitamina K do que o fígado e muitas vezes mais a concentração do sangue. Entretanto a quantidade de vitamina K que as células ósseas necessitam para suprir a carboxilação não é conhecida. (KOHLMEIER et al., 1996).

O crescimento ósseo ocorre em uma região de cartilagem especializada, a placa de crescimento, situada nas epífises dos ossos longos. A placa de crescimento consiste de condrócitos e matriz extra celular composta de proteoglicanas e colágeno tipo II, principalmente.

A característica do crescimento ósseo endocondral é a precisa organização espacial e temporal de condrócitos que exibem uma série de estágios de maturação bem definida. Os condrócitos são distinguidos por mudanças na sua taxa de proliferação e morfologia, e pela síntese de proteínas que formam a matriz extra celular (FARQUHARSON e JEFFERIES, 2000).

Os ossos longos crescem por ossificação endocondral. No interior das placas de crescimento, os condrócitos proliferam, e depois hipertrofiam-se. A matriz de cartilagem dos condrócitos hipertrofiados é então mineralizada, reabsorvida e substituída por osso. A largura de um osso aumenta por aposição de crescimento ósseo. Existe uma variação acentuada na histologia dos tecidos esqueléticos das aves, dependendo da linhagem, idade, sexo e nutrição. A placa de crescimento normal possui cerca de 0,5 a 1 mm de espessura e reflete a taxa de crescimento (THORP, 1999).

Comparado com as espécies de mamíferos, o disco de crescimento das aves contém mais células, é menos organizado e parece mais susceptível à má formação (PINES e HURWITZ, 1991).

O objetivo do presente trabalho foi estudar as características histológicas de tibiotarsos de frangos de corte, alimentados com dietas purificada, suplementadas com uma combinação de 2 níveis de L-glutâmico e 4 níveis de vitamina K.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS.**

### **2.1. Procedimentos gerais**

O experimento foi montado segundo um esquema fatorial, em um delineamento inteiramente casualizado 2x4 (2 níveis de ácido L-glutâmico e 4 níveis de vitamina K), no Setor de Avicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa.

Duzentos e cinquenta e seis pintinhos de um dia, machos, Avian Farm, de peso médio de 48 gramas foram distribuídos aleatoriamente nos tratamentos. Os tratamentos consistiram de uma dieta básica purificada (TABELA 1) contendo todos os aminoácidos essenciais (TABELA 2), minerais (TABELA 3) e vitaminas (TABELA 4), exceto a vitamina K e suplementada com 2 níveis de ácido L-glutâmico (6,25 e 12,5%) combinados com 4 níveis de vitamina K (0,02; 0,20; 2,0 e 20,0 mg/kg de dieta). Cada tratamento consistiu de 4 repetições de 8 animais cada. As aves foram alojadas em baterias aquecidas com piso de telas elevados e receberam água e dieta a vontade, durante todo o período experimental de 14 dias.

Ao término do período experimental, as aves foram sacrificadas por deslocamento cervical e os tibiotasos de ambas as pernas removidos limpos de todo tecido aderente, medidos seus <sup>75</sup>comprimentos e pesados.

TABELA 1 – Dieta básica

Ingredientes	%
Aminoácidos essenciais 1/	9,77
Mistura vitamínica 2/	3,45
Mistura mineral 3/	9,98
Óleo de soja	15,00
Bicarbonato de sódio	1,00
Amido qsp	100,00
<b>Valores calculados</b>	
Energia metabolizável	2811 kcal
Proteínas: Dietas com 6,25% L-Glu	14,5%
Dietas com 12,5% L-Glu	20,1%
Relação Ca:P	1,94

1/ veja Quadro 2.

2/ veja Quadro 3.

3/ veja Quadro 4.

TABELA 2 - Aminoácidos essenciais <sup>1/</sup>

Aminoácidos	%
L-Arginina	1,20
L-Histidina. HCl. H <sub>2</sub> O	0,42
L-Lisina. HCl	1,14
L-Tirosina	0,57
L-Fenilalanina	0,63
L-Triptofano	0,18
DL-Metionina	0,41
L-Cistina	0,41
L-Treonina	0,76
L-Leucina	1,26
L-Isoleucina	0,76
L-Valina	0,88
L-Prolina	0,50
Glicina	0,74

1/ BAKER e HAN (1994)

TABELA 3 - Mistura vitamínica <sup>1/</sup>

Ingredientes	Quantidade /kg dieta
Colina 60%	3,3g
Retinil palmitato	5.000 UI
Colecalciferol	2.250 UI
D- $\alpha$ -tocoferil acetato	22 UI
Menadiona sódio bissulfito	Variável
Inositol	1,0 g
Riboflavina	9,0 mg
Tiamin.HCl	6,0 mg
Pantotenato de cálcio	20,0 mg
Niacina	50,0 mg
Piridoxina	8,0 mg
Ácido fólico	2,0 mg
Biotina	0,3 mg
B12 (0,1%)	20,0 mg
BHT	0,125 mg
Excipiente	30,0 g

1/ FEATHERSTON e ROGLER (1978)  
2/ 0,02, 0,2 2,0 E 20,0 mg/kg de dieta.

TABELA 4 – Mistura mineral <sup>1/</sup>

Ingredientes	Quantidade/ kg dieta
CaCO <sub>3</sub>	18,6526 g
CaHPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	30,5300 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	11,2000 g
NaCl	6,0000 g
FeSO <sub>4</sub>	0,2000 g
ZnO	0,1225 g
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,0150 g
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,5100 g
KI	0,0400 g
MgCO <sub>3</sub>	2,5000 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	1,0000 g
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	0,2200 mg
Excipiente (casca de arroz)	30,000 g

1/ FEATHERSTON e ROGLER (1978)

## 2.2 Preparo das lâminas

Um tibiotarso de cada tratamento foi destinado à análise histológica. Esses ossos foram devidamente limpos de todo tecido aderente, fixados em líquido de Boiun por 48 horas,. Após o que, foram descalcificados em mistura descalcificadora contendo ácido clorídrico, por 10 dias.

Os fragmentos ósseos sofreram processamento histológico de rotina, desde a desidratação em série decrescente de alcoóis (100, 95, 80 e 70%), diafanização em xilol, até a inclusão em parafina. Três cortes semi-seriados de 5 $\mu$ m de espessura, foram obtidos de cada fragmento ósseo e corados segundo a técnica de Hematoxilina-Eosina.

Os parâmetros, espessura do osso compacto da diáfise e diâmetro do canal medular, foram avaliados a partir de cortes longitudinal e transversal. E os parâmetros, espessura e organização do disco epifisário, foram avaliados por meio de cortes longitudinais. Todas as medidas foram determinadas usando o programa de computador Image Pro Plus for Windows, versão 1.3.2 acoplado ao microscópio. Sendo que, para espessura do osso compacto da diáfise e diâmetro do canal medular, tanto para cortes longitudinais como para transversais, as medidas foram feitas com aumento de 40 X, e para a espessura do disco epifisário o aumento utilizado foi de 100 X.

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1. Comprimento do canal medular e espessura do osso compacto da diáfise:**

Os valores médios dos parâmetros histológicos de cortes longitudinais e transversais de tibiotarsos são apresentados nas Tabelas 5 e 6, respectivamente.

Na figura 1 encontra-se os cortes transversais mostrando a espessura da diáfise dos tibiotarsos de diferentes tratamentos.

Os animais alimentados com dietas com 12,5% de L-Glu apresentaram maior espessura do osso compacto e maior diâmetro do canal medular, tanto no corte longitudinal como no transversal, do que aqueles alimentados com 6,25% de L-Glu. As diferenças observadas entre os tratamentos em relação aos níveis de vitamina K não foram significativas.

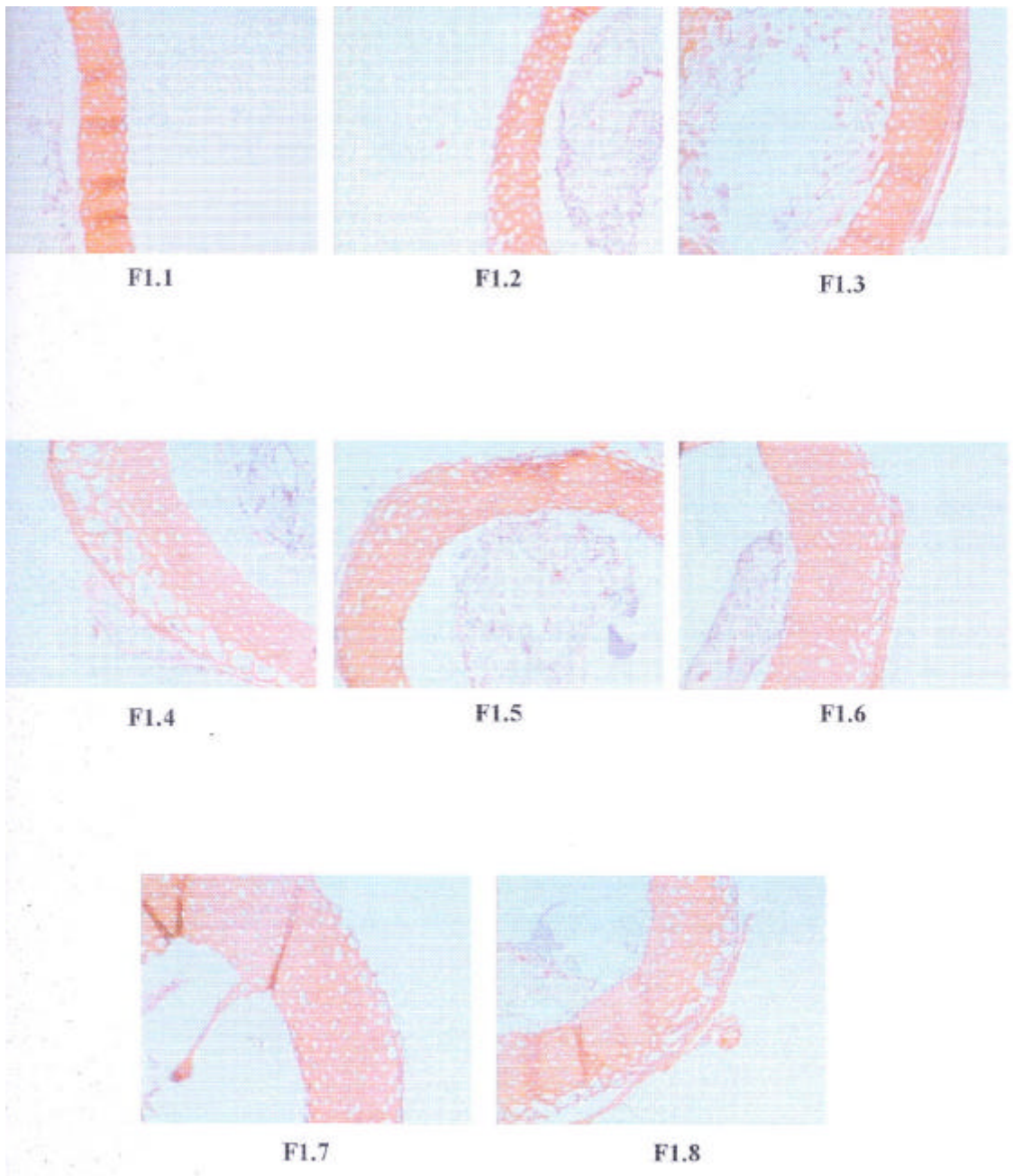
SILVA (2000) estudando alterações histológicas em tibiotarso de frangos de corte aos 14 dias de idade, alimentados com dietas purificadas suplementadas com ácido L-Glutâmico e vitamina D<sub>3</sub>, observou efeito marcante dos níveis de L-Glu na espessura do osso compacto da diáfise de tibiotarso. A maior espessura foi observada com nível de 10% de L-Glu.

TABELA 5 – Comprimento do canal medular e espessura do osso compacto da diáfise de cortes longitudinais do tibiotarso de frangos de corte aos 14 dias de idade.

Característica	Vitamina K (mg/kg dieta)	Ácido L-glutâmico (%)		Média
		6,25	12,5	
Diâmetro do canal medular ( $\mu\text{m}$ )	0,02	1072,6 $\pm$ 38,7	981,5 $\pm$ 68,8	1027,0 $\pm$ 53,8
	0,2	1197,8 $\pm$ 47,7	1025,5 $\pm$ 46,4	1111,7 $\pm$ 47,1
	2,0	1139,2 $\pm$ 64,7	1308,2 $\pm$ 48,4	1223,7 $\pm$ 56,5
	20,0	1202,5 $\pm$ 42,8	1084,4 $\pm$ 51,1	1143,5 $\pm$ 47,0
Média		1153,0 $\pm$ 48,5	1099,9 $\pm$ 53,7	
Espessura da diáfise ( $\mu\text{m}$ )	0,02	247,9 $\pm$ 19,5	343,2 $\pm$ 12,2	295,5 $\pm$ 15,9
	0,2	257,8 $\pm$ 20,9	541,1 $\pm$ 19,3	399,4 $\pm$ 20,1
	2,0	342,7 $\pm$ 21,4	625,9 $\pm$ 25,2	484,3 $\pm$ 23,3
	20,0	334,2 $\pm$ 21,0	562,5 $\pm$ 24,4	448,3 $\pm$ 22,7
Média		295,63 $\pm$ 20,7	518,2 $\pm$ 20,3	

TABELA 6 – Diâmetro do canal medular e espessura do osso compacto da diáfise de cortes transversais do tibiotarso de frangos de corte aos 14 dias de idade.

Característica	Vitamina K (mg/kg dieta)	Ácido L-glutâmico (%)		Média
		6,25	12,5	
Diâmetro do canal medular ( $\mu\text{m}$ )	0,02	1173,1 $\pm$ 64,4	1446,8 $\pm$ 54,8	1309,9 $\pm$ 59,6
	0,2	1168,8 $\pm$ 83,7	1425,4 $\pm$ 78,5	1297,2 $\pm$ 81,1
	2,0	1386,6 $\pm$ 56,6	1536,7 $\pm$ 64,7	1461,7 $\pm$ 60,6
	20,0	1367,8 $\pm$ 58,1	1464,7 $\pm$ 47,5	1416,2 $\pm$ 52,8
Média		1274,1 $\pm$ 65,7	1468,4 $\pm$ 61,4	
Espessura da diáfise ( $\mu\text{m}$ )	0,02	210,6 $\pm$ 10,8	362,1 $\pm$ 26,4	286,3 $\pm$ 18,6
	0,2	205,5 $\pm$ 7,1	468,5 $\pm$ 17,0	337,0 $\pm$ 12,1
	2,0	240,4 $\pm$ 6,7	492,2 $\pm$ 11,2	366,3 $\pm$ 9,0
	20,0	300,0 $\pm$ 8,6	451,9 $\pm$ 15,1	375,9 $\pm$ 11,8
Média		239,1 $\pm$ 8,3	443,7 $\pm$ 17,4	



**Figura 01: Espessura da Diáfise (Corte Transversal)**

**Figura 1. Cortes transversais de tibiotarsos de frangos de corte aos 14 dias de idade.**

**Figura 1.1.** Espessura do osso compacto da diafise (vermelho) com 6,25% de L-Glu e com 0,02 mg de Vitamina K por kg de dieta (40X) HE.

**Figura 1.2.** Espessura do osso compacto da diafise (vermelho) com 6,25% de L-Glu e com 0,2 mg de Vitamina K por kg de dieta (40X) HE.

**Figura 1.3.** Espessura do osso compacto da diafise (vermelho) com 6,25% de L-Glu e com 2,0 mg de Vitamina K por kg de dieta (40X) HE.

**Figura 1.4.** Espessura do osso compacto da diafise (vermelho) com 6,25% de L-Glu e com 20,0 mg de Vitamina K por kg de dieta (40X) HE.

**Figura 1.5.** Observar aumento da espessura do osso compacto da diafise (vermelho) com 12,5% de L-Glu e com 0,02 mg de Vitamina K por kg de dieta (40X) HE.

**Figura 1.6.** Observar aumento da espessura do osso compacto da diafise (vermelho) com 6,25% de L-Glu e com 0,2 mg de Vitamina K por kg de dieta (40X) HE.

**Figura 1.7.** Observar aumento da espessura do osso compacto da diafise (vermelho) com 6,25% de L-Glu e com 2,0 mg de Vitamina K por kg de dieta (40X) HE.

**Figura 1.8.** Observar aumento da espessura do osso compacto da diafise (vermelho) com 6,25% de L-Glu e com 20,0 mg de Vitamina K por kg de dieta (40X) HE.

### 3.2 Comprimento e organização do disco epifisário de tibiotarso:

Os valores médios da espessura da diáfise são apresentados na Tabela 7 e na Figura 2 observa-se a organização do disco epifisário.

A menor espessura média do disco epifisário e alto nível de organização foi obtido com 12,5% de L-Glu independente do nível de Vitamina K.

TABELA 7 – Espessura média do disco epifisário de cortes longitudinais do tibiotarso de frangos de corte aos 14 dias de idade.

Característica	Vitamina K (mg/kg dieta)	Ácido L-glutâmico (%)		Média
		6,25	12,5	
Espessura do disco epifisário (µm)	0,02	3181,4 ± 236,0	2768,2 ± 74,5	2974,8 ± 155,3
	0,2	4207,0 ± 148,0	2805,6 ± 40,7	3506,3 ± 74,5
	2,0	4141,7 ± 108,4	2774,9 ± 32,5	3458,3 ± 70,4
	20,0	3599,2 ± 88,4	2735,8 ± 63,4	3167,5 ± 75,9
Média		3782,3 ± 145,2	2771,1 ± 52,8	

Com 6,25% de L-Glu, independente dos níveis de vitamina K, o disco epifisário apresentou-se com a pior organização em relação às diversas zonas de células que compõem o disco, e os vários estágios até a calcificação da cartilagem. As figuras 2.1 e 2.5 mostram transição abrupta entre o disco epifisário e a metáfise. Notar a ausência de espículas ósseas no disco epifisário e a desorganização do disco, que apresenta células em diferentes estágios ao mesmo tempo ( figura 2.2). Foi observado uma camada desenvolvida de células na zona proliferativa pré-hipertrófica, a zona de cartilagem hipertrófica encontrou-se alongada e desorganizada (figuras 2.3 e 2.4).

Com o tratamento 2 (6,25% de L-Glu e 0,2 mg de vitamina K por kg de dieta) observou-se presença de cartilagem na diáfise do osso (Figura 3).

As aves alimentadas com 12,5% de L-Glu, independente dos níveis de vitamina K apresentaram disco epifisário maior e melhor organização. Com 12,5% de L-Glu e 0,02 mg de vitamina K por kg de dieta foi observado um disco epifisário melhor organizado e presença de espículas ósseas permeando a zona hipertrófica.

Acompanhando as espículas, estão as células da zona de calcificação e desenvolvida camada de células proliferativas (figuras 2.6, 2.8) Notar a presença de canal vascular (figura 2.9).

A figura 2.7 mostra diferentes zonas da placa de crescimento, zona de repouso, próxima à cartilagem auricular, pré-hipertrofica, onde as células são desordenadas no arranjo e orientação e a camada hipertrófica de tibiotarso de animais alimentados com 12,5% de L-Glu.

Com as aves recebendo o dieta 7 (12,5% de L-Glu e 2,0 mg de vitamina K por kg de dieta) observou-se presença de espículas ósseas na metáfise e melhor organização das várias camadas do disco epifisário. Notar a espessa camada de células hipertróficas (figuras 2.10 e 2.11).

A figura 2.12 mostra o corte histológico de tibiotarso de ave recebendo dieta com 12,5% de L-Glu e 20 mg/kg de dieta de vitamina K, observar que a organização do disco epifisário (zona de células hipertróficas) se mostra melhor do que o das aves alimentadas com 6,25% de L-Glu, porém, pior do que o das aves alimentadas com 12,5% de L-Glu e níveis menores de vitamina K.

Em nenhum corte foi observado centro secundário de ossificação. Segundo THORP (1999) os tibiotarsos proximal e distal de frangos de corte contém centros de ossificação secundários a partir de aproximadamente 3 semanas de idade.

LEACH e NESHEIM (1965) observaram alterações na placa de crescimento de frangos, alimentados com dietas purificadas, as alterações essas caracterizadas por pequena invasão de capilares sangüíneos e poucas espículas ósseas.

MacNAMEE et al. (1998) relataram que os problemas de pernas estão associados com alterações histológicas do disco epifisário da porção proximal de ossos longos.

**Figura-2: Cortes longitudinais do disco epifisário de tibiotarso de frangos de corte aos 14 dias de idade.**

**Figura 2.1.** Porção terminal do disco epifisário. Transição abrupta entre o disco epifisário (corado em azul) e a metáfise (corada em vermelho). 40X (HE).

**Figura 2.2.** O disco epifisário não apresenta boa organização. Células em diferentes estágios. 100X.(HE).

**Figura 2.3.** Desorganização do disco epifisário, presença de poucas espículas ósseas. 100X.(HE).

**Figura 2.4.** Presença de células em diferentes estágios de diferenciação. Ausência de espículas ósseas. 100X.(HE).

**Figura 2.5.** Porção terminal do disco epifisário. Transição abrupta entre o disco epifisário (corado em azul) e a metáfise (corada em vermelho). 40X (HE).

**Figura 2.6.** Presença de espículas óssea permeando a camada de células hipertróficas. Melhor organização do disco epifisário. 40X.(HE).

**Figura 2.7.** Camada de células pré-hipertrófica, seguida de camada de células hipertrófica. Boa organização do disco. 100X.(HE).

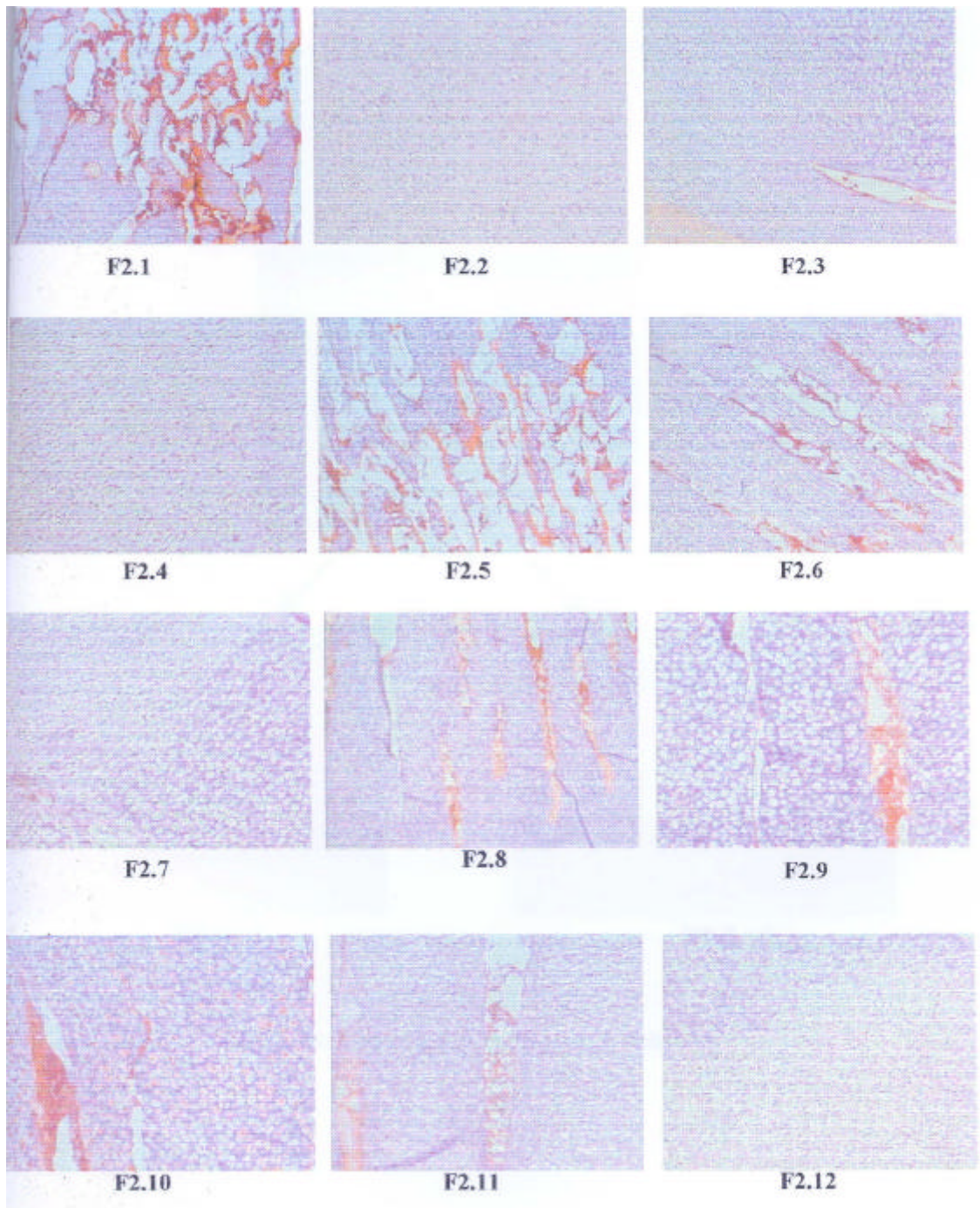
**Figura 2.8.** Presença de espículas ósseas. 40X. (HE).

**Figura 2.9.** Camada de células hipertrófica arredondadas e canal vascular metafiseal.(HE).

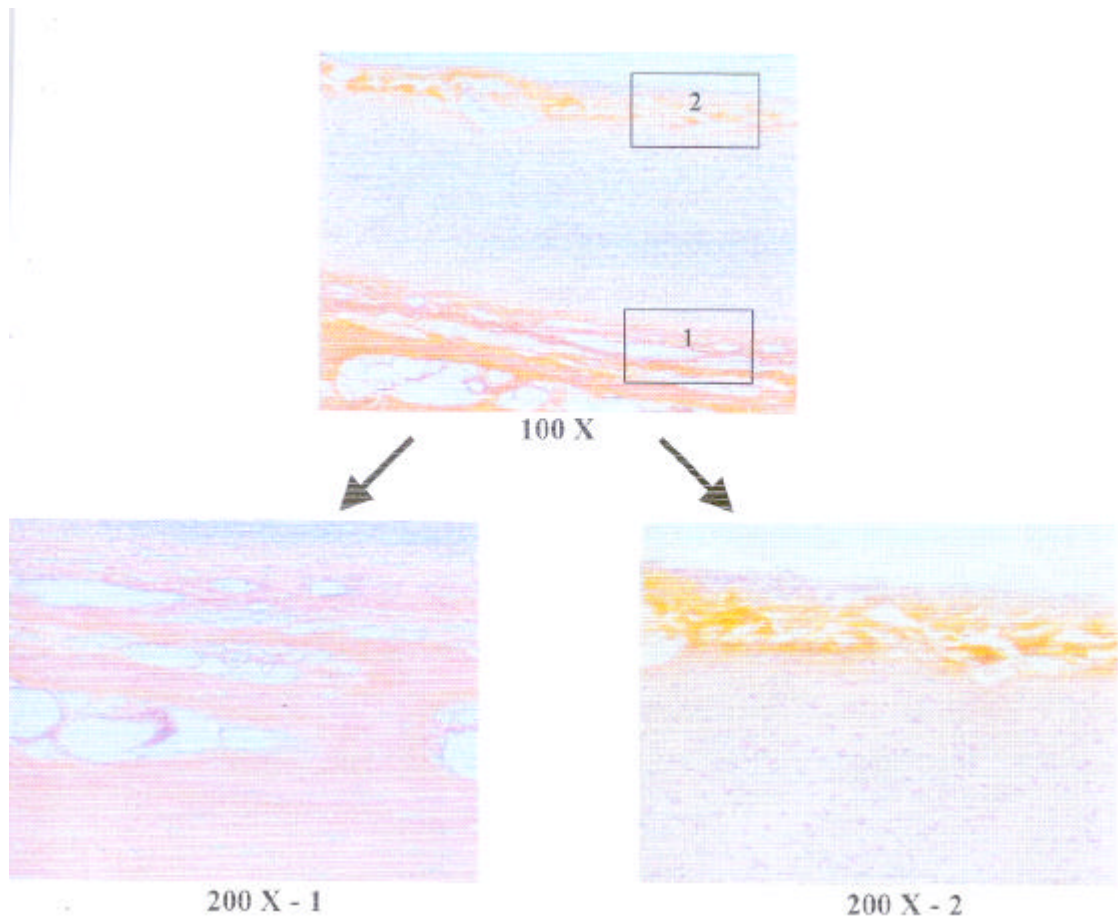
**Figura 2.10.** Espícula óssea permeando a camada de células hipertróficas. 100X (HE).

**Figura 2.11.** Camada desenvolvida de cartilagem em processo de ossificação. 100X. (HE).

**Figura 2.12.** Desorganização das diversas camadas de células do disco em relação à figura 2.7. 100X.(HE).



**Figura 02: Organização do Disco Epifisário**



**Figura 03: Presença de Cartilagem na Diáfise**

#### **4. RESUMO E CONCLUSÕES**

Foram utilizados duzentos e cinquenta e seis pintos de corte de um dia com peso médio de 48 gramas, de um dia, machos, Avian Farm, por um período de 14 dias. Os animais foram criados em baterias aquecidas com piso de tela elevado. Utilizou-se um esquema fatorial inteiramente casualizado 2X4 (2 níveis de L-Glu e 4 níveis de vitamina K). , consistindo de 8 tratamentos, quatro repetições e 8 aves por repetição. Os tratamentos consistiram de dietas purificadas contendo todos os aminoácidos essenciais, minerais e vitaminas, suplementadas com 6,25 e 12,5 % de L-Glu combinados com 0,02; 0,2; 2,0 e 20,0 mg de Vit. K por kg de dieta.

Os animais alimentados com dietas com 12,5% de L-Glu apresentaram maior espessura do osso compacto e maior diâmetro do canal medular, tanto no corte longitudinal como no transversal, do que aqueles alimentados com 6,25% de L-Glu. Poucas diferenças foram observadas entre os tratamentos com relação aos níveis de Vit.K . O menor comprimento médio do disco epifisário e alto nível de organização foi obtido com 12,5% de L-Glu independente do nível de Vit. K. Com 6,25% de L-Glu, o disco epifisário apresentou-se com a pior organização em relação às diversas zonas de células que compõem o disco, e os vários estágios até a calcificação da cartilagem.

Em geral, as alterações na placa de crescimento foram coincidentes com as aves que apresentaram pior desempenho, maior incidência de problemas de pernas e tibiotarsos com maiores teores de proteínas não colagenosas.

## **CAPÍTULO 5**

### **PERFIL ENZIMÁTICO DE $\alpha$ -AMILASE, LIPASE E TRIPSINA E CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DO INTESTINO DELGADO DE PINTOS DE CORTE**

#### **1. INTRODUÇÃO**

O índice de crescimento e a eficiência alimentar em frangos saudáveis dependem do fornecimento de nutrientes aos tecidos. O trato gastrointestinal é um local importante de crescimento durante o período inicial pós eclosão, porque não está funcional durante o período embrionário. Os segmentos do trato gastrointestinal aumentam em tamanho muito mais rapidamente do que o corpo inteiro durante as primeiras semanas de vida. Muitos estudos indicam que os processos digestivos não estão plenamente desenvolvidos em pintinhos recentemente eclodidos. Deste modo o trato gastrointestinal tem sido considerado como o fator limitante na ingestão de alimentos e no crescimento de frangos de corte. É necessário um período de maturação antes que o tamanho relativo do intestino e a produção do pâncreas atinjam níveis que não restrinjam as taxas de crescimento (NITSAN et al., 1991; SELL et al., 1991; PENZ, A M. e VIEIRAS.L,1998).

Após a eclosão, a atividade enzimática ( $\alpha$ -amilase, lipase e tripsina) no intestino delgado sofre mudanças a fim de adaptar-se à ingestão de alimentos. Muitos estudos têm sido realizados sobre a atividade de enzimas digestivas, durante a incubação e após a eclosão. Amilase e tripsina foram detectadas aos 18 dias de incubação, e lipase também esteve presente antes da eclosão. Concentrações de todas essas enzimas, no pâncreas, aumentaram após a eclosão. (NOY et al., 1997)

$\alpha$ -Amilase (E.C. 3.2.1.1) e lipase (E.C. 3.1.1.3.) são enzimas da classe das hidrolases, catalisam reações que implicam na ruptura hidrolítica de ligações químicas. A  $\alpha$ -amilase rompe ligações glicosídicas  $\alpha$  1 $\rightarrow$ 4, enquanto que a lipase catalisa a hidrólise de triacilgliceróis e ésteres carboxílicos em solução aquosa.

A tripsina (E.C. 3.4.1.4.) é uma enzima proteolítica, que catalisa a hidrólise de ligações peptídicas, pertencente ao grupo das serino-proteases, que se caracterizam pela participação de um resíduo de serina no centro ativo.

O objetivo deste trabalho foi estudar no desenvolvimento do aparelho digestório a atividade de enzimas digestivas ( $\alpha$ -amilase, lipase e tripsina) em frangos de corte, do nascimento aos 21 dias de idade, alimentados com dietas purificadas.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Procedimento geral:

O experimento foi desenvolvido no Setor de Avicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa.

Trinta e dois pintinhos de um dia, machos, Avian Farm, de peso médio de 48 gramas foram distribuídos aleatoriamente em 4 repetições. Receberam uma dieta purificada (TABELA 1) contendo todos os aminoácidos essenciais e o ácido L-glutâmico com fonte de nitrogênio não específico (TABELA 2), minerais (TABELA 3) e vitaminas (TABELA 4). As aves foram alojadas em baterias aquecidas com piso de telas elevados e receberam água e dieta a vontade, durante todo o período experimental, do nascimento aos 21 dias .

Quatro aves, separadas ao acaso e pesadas, no dia da eclosão, aos 7, 14 e 21 dias foram sacrificadas por deslocamento cervical e fígado, pâncreas, quimo; não foi possível a retirada de quimo dos pintos no dia da eclosão; e intestino retirados, pesados e em seguida congelados em nitrogênio líquido. Após armazenados a -20°C.

TABELA 1 – Dieta básica

Ingredientes	%
Aminoácidos essenciais 1/	9,77
Mistura vitamínica 2/	3,45
Mistura mineral 3/	9,98
Óleo de soja	15,00
Bicarbonato de sódio	1,00
Amido qsp	100,00
<b>Valores calculados</b>	
Energia metabolizável	2811 kcal
Proteínas:	20,1%
Relação Ca:P	1,94
1/ veja Quadro 2.	
2/ veja Quadro 3.	
3/ veja Quadro 4.	

TABELA 2 - Aminoácidos essenciais <sup>1/</sup>

Aminoácidos	%
L-Arginina	1,20
L-Histidina. HCl. H <sub>2</sub> O	0,42
L-Lisina. HCl	1,14
L-Tirosina	0,57
L-Fenilalanina	0,63
L-Triptofano	0,18
DL-Metionina	0,41
L-Cistina	0,41
L-Treonina	0,76
L-Leucina	1,26
L-Isoleucina	0,76
L-Valina	0,88
L-Prolina	0,50
Glicina	0,74
Ácido L-Glutâmico	12,50

1/ BAKER e HAN (1994)

TABELA 3 - Mistura vitamínica <sup>1/</sup>

Ingredientes	Quantidade /kg dieta
Colina 60%	3,3g
Retinil palmitato	5.000 UI
Colecalciferol	2.250 UI
D- $\alpha$ -tocoferil acetato	22 UI
Menadiona sódio bissulfito	2,0 mg
Inositol	1,0 g
Riboflavina	9,0 mg
Tiamin.HCl	6,0 mg
Pantotenato de cálcio	20,0 mg
Niacina	50,0 mg
Piridoxina	8,0 mg
Ácido fólico	2,0 mg
Biotina	0,3 mg
B12 (0,1%)	20,0 mg
BHT	0,125 mg
Excipiente	30,0 g

1/ FEATHERSTON e ROGLER (1978)

TABELA 4 – Mistura mineral <sup>1/</sup>

Ingredientes	Quantidade/ kg dieta
CaCO <sub>3</sub>	18,6526 g
CaHPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	30,5300 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	11,2000 g
NaCl	6,0000 g
FeSO <sub>4</sub>	0,2000 g
ZnO	0,1225 g
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,0150 g
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,5100 g
KI	0,0400 g
MgCO <sub>3</sub>	2,5000 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	1,0000 g
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	0,2200 mg
Excipiente (casca de arroz)	30,000 g

1/ FEATHERSTON e ROGLER (1978)

## **2.2 Características físicas e histológicas:**

O peso corporal, peso dos órgãos (fígado, pâncreas e intestino) foram coletados de 4 aves no dia da eclosão, e aos 7, 14 e 21 dias de idade para obtenção do peso relativo (g/100g de peso corporal).

Para as análises morfométricas, segmentos de 1cm da porção superior do intestino delgado (da junção com a moela até o divertículo) foram retirados de 4 aves, separadas ao acaso, recém eclodidas, e aos 7, 14 e 21 dias de idade. Em seguida, foram fixados em solução BOUIN e rotineiramente processado em secções de 5 µm e corados com hematoxilina–eosina. Os índices morfométricos foram determinados usando o programa de computador Image Pro Plus for Windows, versão 1.3.2 acoplado ao microscópio. As variáveis morfométricas analisadas foram: espessura de mucosa, altura de vilo (do topo do vilo à junção da cripta) e profundidade de cripta, definida como a profundidade da invaginação entre vilos adjacentes. Os valores são médias de medidas de 10 vilos adjacentes tomadas somente em vilos e cripta orientadas verticalmente.

## **2.3. Coleta e preparo de pâncreas e quimo:**

Três aves recém eclodidas, e com 7, 14 e 21 dias de idade foram separadas ao acaso e sacrificadas por deslocamento cervical.

Após o sacrifício, os aves foram eviscerados e pâncreas e quimo retirados e pesados. Não foi possível coletar quimo de aves recém eclodidas, portanto, somente quimo de aves com idade de 7, 14 e 21 dias foram usados. Para a coleta de quimo utilizou-se a porção do intestino entre a junção da moela e o divertículo. Após a remoção, os pâncreas foram limpos de toda a gordura periférica, depois pâncreas e quimo foram homogeneizados com água destilada na proporção 3:1 (p/v), congelados em nitrogênio líquido, liofilizados e armazenados a -20°C.

De cada amostra liofilizada, pâncreas ou quimo, foram retiradas 3 porções de 1 mg, solubilizadas com 1 ml de água destilada e deionizada, e centrifugadas a 7.000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado para as determinações das atividades de  $\alpha$ -amilase e lipase. Para a atividade de tripsina, no quimo e pâncreas, foi necessário concentrar o material, foi utilizado 3 porções de 15 mg de material liofilizado solubilizado em 1 ml de água destilada, o qual foi centrifugado por 15 minutos a 7.000 g.

#### **2.4 Determinações da atividade de enzimas digestivas:**

A atividade da  $\alpha$ -amilase foi determinada utilizando-se kit enzimático da IN VITRO DIAGNÓSTICA, LTDA, que consiste na adição de iodo à solução contendo amido resultando no desenvolvimento de cor azul. Dentro de certos limites, mantendo a concentração de iodo constante, a alteração produzida na cor pelo amido degradado é proporcional à concentração de amilase na amostra.

A atividade da lipase foi determinada utilizando-se kit enzimático da IN VITRO DIAGNÓSTICA, LTDA, que é um método colorimétrico que se fundamenta na reação de 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.

A atividade de tripsina no quimo foi determinada pelo método descrito por ERLANGER et al. (1961), utilizando-se N-benzoil-D,L-arginina p-nitroanilida (D,L-BApNA) como substrato. As velocidades iniciais foram determinadas pela formação do produto p-nitroanilida, medindo-se o aumento da absorbância a 410 nm em função do tempo e utilizando-se o coeficiente de extinção molar de  $8.800 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$

Para a determinação da atividade de tripsina no pâncreas, procedeu-se inicialmente à ativação do tripsinogênio. Em 1 ml do sobrenadante foi adicionados 1 ml de tampão Tris-HCl, 0,2 M, pH 8,2 contendo 20 mM de CaCl<sub>2</sub> e 1,0% de dimetilformamida e 50µl de tripsina bovina, 4,16 x10<sup>-5</sup> M em HCl, 1,0 mM. Essa solução final foi submetida à agitação branda por duas horas à temperatura ambiente e, imediatamente após, foi determinada a atividade de tripsina. Para cada determinação da atividade trípica no pâncreas foi feito controle sem enzima. Determinou-se a diferença de absorbância entre os testes e os respectivos controles, obtendo dessa forma a atividade trípica somente do tripsinogênio ativado.

## **2.5. Análise estatística:**

Os dados foram submetidos à análise de variância utilizando-se o sistema SAEG (Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas). Quando necessário as médias foram comparadas pelo teste de Neuman Kleus.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Características físicas e histológicas:

Os resultados dos parâmetros físicos e histológicos estão apresentados nas Tabelas 5 e 6, respectivamente. Na figura 1 observa-se os cortes histológicos da porção superior do intestino

O peso absoluto de fígado, intestino e pâncreas aumentou com a idade. O peso relativo também apresentou esta mesma tendência. O máximo de peso relativo dos órgãos (fígado, pâncreas e intestino) foi observado no 14º dia. Enquanto o peso absoluto aumentou continuamente durante o período experimental..

TABELA 5 – Valores médios\* de peso relativo e absoluto de pâncreas, fígado e intestino de frangos de corte aos 14 dias de idade.

Idade	Peso absoluto (g)			Peso Relativo (g/100g peso corporal)		
	Fígado	Pâncreas	Intestino	Fígado	Pâncreas	Intestino
Ao nascimento	1,24 <sup>d</sup>	0,08 <sup>d</sup>	1,06 <sup>d</sup>	2,48 <sup>d</sup>	0,16 <sup>d</sup>	2,12 <sup>d</sup>
7	3,18 <sup>c</sup>	0,37 <sup>c</sup>	3,74 <sup>c</sup>	3,03 <sup>b</sup>	0,33 <sup>b</sup>	3,55 <sup>b</sup>
14	7,74 <sup>b</sup>	0,81 <sup>b</sup>	7,97 <sup>b</sup>	3,89 <sup>c</sup>	0,41 <sup>a</sup>	4,00 <sup>a</sup>
21	15,73 <sup>a</sup>	1,24 <sup>a</sup>	10,37 <sup>a</sup>	3,46 <sup>a</sup>	0,27 <sup>c</sup>	2,17 <sup>c</sup>

\* Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste Newman Keuls a 5% de probabilidade

NIR et al. (1993) observaram aumento contínuo de peso de intestino, pâncreas e fígado, de frangos tipo carne, durante o período experimental, entretanto o pico máximo do peso relativo se deu aos 8 de idade.

NOY e SKLAN (1997) registram que o máximo de peso relativo de órgãos anexos ao trato gastrointestinal em frangos foi obtido na faixa entre 3 e 8 dias de idade. Seguindo este crescimento inicial, o peso relativo do intestino diminui suavemente com a idade.

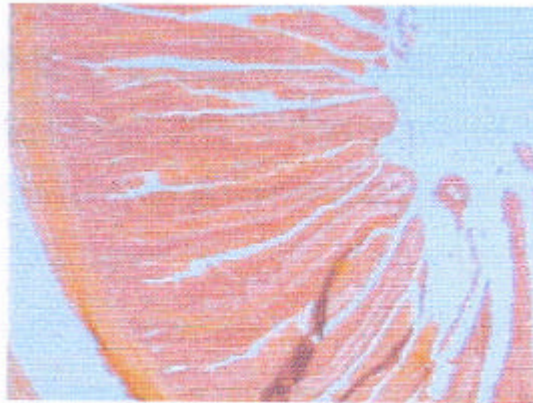
A diferença obtida neste experimento pode ser explicada pelo fato dos animais terem sido alimentados com dietas purificadas. Os animais sob este regime de alimentação apresentam um desempenho pior.

Tabela 6 – Valores médios\* de espessura de membrana, altura de vilo e profundidade de cripta de frangos de corte do nascimento aos 21 dias de idade.

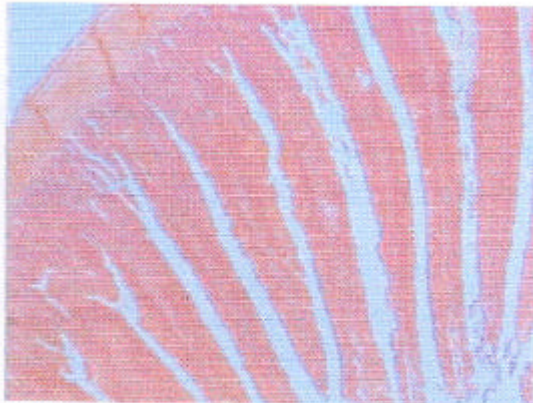
Idade (dias)	Espessura de Membrana ( $\mu\text{m}$ )	Profundidade de Cripta ( $\mu\text{m}$ )	Altura de Vilo ( $\mu\text{m}$ )
Ao nascimento	341 <sup>d</sup>	89 <sup>d</sup>	252 <sup>d</sup>
7	714 <sup>c</sup>	102 <sup>c</sup>	612 <sup>c</sup>
14	784 <sup>b</sup>	116 <sup>b</sup>	668 <sup>b</sup>
21	892 <sup>a</sup>	134 <sup>a</sup>	758 <sup>a</sup>

\* Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste Newman Keuls a 5% de probabilidade.

Observou-se que todos os parâmetros morfométricos analisados aumentaram com a idade. Esses resultados estão de acordo com vários estudos anteriores, que demonstram que alterações na espessura de membrana, profundidade de cripta e altura de vilo são dependentes da idade, linhagem e da região do intestino delgado. (JIN et. Al.; UNI et al., 1995; UNI et al., 1998; UNI et al.,1999 NOY e SKLN, 1997).



**07 dias de idade (40x)**



**14 dias de idade (40 x)**

**Figura 01: Corte Histológico Corado com Hematoxina e Eosina da Porção Superior do Intestino Delgado**

### 3.2 Atividade de $\alpha$ -amilase, lipase e tripsina no quimo:

Os valores médios das atividades das enzimas no quimo são apresentados na tabela 7.

A atividade da  $\alpha$ -amilase quando expressa por grama de tecido ou por 100 gramas de peso corporal aumentou com a idade, entretanto a atividade relativa (UI/mg de proteína) só foi diferente para os animais com 7 dias de idade, ou seja para os animais de 14 e 21 dias de idade a atividade relativa não se alterou.

A atividade de lipase apresentou o mesmo comportamento da atividade de  $\alpha$ -amilase.

A atividade de tripsina não se alterou com a idade. Quando a atividade foi expressa por g de tecido a atividade dos animais com 21 dias de idade foi significativamente maior do que daqueles com 7 e 14 dias de idade, as quais não se diferenciaram.

Tabela 7 – Valores médios\* das atividades de  $\alpha$ -amilase, lipase e tripsina no quimo de frangos de corte do nascimentos aos 21 dias de idade.

Idade (dias)	Atividade (UI)	mg de proteína	UI/mg proteína	UI/ g tecido	UI/ 100g peso Corporal
7	0,64 <sup>c</sup>	3,56x10 <sup>-3a</sup>	174 <sup>b</sup>	80 <sup>c</sup>	127 <sup>c</sup>
14	0,94 <sup>b</sup>	4,13x10 <sup>-3a</sup>	250 <sup>a</sup>	136 <sup>b</sup>	389 <sup>b</sup>
21	1,28 <sup>a</sup>	4,62x10 <sup>-3a</sup>	291 <sup>a</sup>	246 <sup>a</sup>	583 <sup>a</sup>

Idade (dias)	Atividade (UI)	mg de proteína	UI/mg proteína	UI/ g tecido	UI/ 100g peso Corporal
7	7,0 <sup>c</sup>	1,93x10 <sup>-3b</sup>	3640 <sup>b</sup>	897 <sup>c</sup>	1424 <sup>c</sup>
14	11,0 <sup>b</sup>	2,64x10 <sup>-3a</sup>	4185 <sup>ab</sup>	1617 <sup>b</sup>	4646 <sup>b</sup>
21	12,0 <sup>a</sup>	2,53x10 <sup>-3a</sup>	4670 <sup>a</sup>	2327 <sup>a</sup>	5495 <sup>a</sup>

Idade (dias)	Atividade ( $\mu\text{Ms}^{-1}\text{g}^{-1}$ )	Mg de proteína	Atividade/mg proteína	Atividade/ g tecido	Atividade/ 100g peso Corporal
7	165x10 <sup>-6a</sup>	0,435 <sup>a</sup>	379x10 <sup>-6a</sup>	0,021 <sup>b</sup>	0,033 <sup>b</sup>
14	183x10 <sup>-6a</sup>	0,484 <sup>a</sup>	393x10 <sup>-6a</sup>	0,027 <sup>b</sup>	0,078 <sup>a</sup>
21	192x10 <sup>-6a</sup>	0,433 <sup>a</sup>	452x10 <sup>-6a</sup>	0,037 <sup>a</sup>	0,088 <sup>a</sup>

\*Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste de Newman Keuls a 5% de probabilidade.

O resultado obtido neste trabalho para lipase e amilase é coerente com vários estudos apresentados anteriormente, onde observa-se um comportamento de aumento da atividade com a idade. NIR et al. (1993) observaram que a atividade específica (UI/g) e atividade expressa por kg de peso corporal de amilase, lipase e tripsina aumentaram com a idade de frangos de corte.

NITSAN et al. (1991b) estudando a atividade de enzimas digestivas, no conteúdo do intestino delgado, de frangos de corte encontraram que a atividade de tripsina aumentou de 10 vezes do nascimento ao décimo quarto dia. A atividade de amilase aumentou até o décimo sétimo dia e a atividade de lipase aumentou gradualmente durante o período experimental. E quando as atividades foram expressas por kg de peso corporal as atividades de todas as enzimas aumentaram com a idade.

O resultado obtido neste experimento para tripsina, não se observou diferença significativa nos valores de atividade específica nas diferentes idades, pode ser explicado pelo fato dos animais terem recebido dietas purificadas.

### **3.3 Atividade de $\alpha$ -amilase, lipase e tripsina no pâncreas:**

Os valores médios para as atividades de  $\alpha$ -amilase, lipase e tripsina no pâncreas são apresentados na tabela 8.

Os valores para a atividade específica (UI/ mg de proteína) de  $\alpha$ -amilase foi maior aos 14 dias de idades e as atividades específicas observadas nos dias, do nascimento, 7 e 21 não foram diferentes. Para a enzima lipase a atividade específica foi maior no dia do nascimento e diminui ao sétimo dia, alcançando o pico máximo aos 14 dias e tornando a cair no vigésimo dia de idade. A atividade específica de tripsina não se alterou com a idade.

Quando os valores de atividade de  $\alpha$ -amilase e lipase foram expressos por UI/ 100g de peso corporal observou-se um aumento da atividade com a idade, sendo que no 21<sup>o</sup> a atividade foi menor. Para a atividade de tripsina (UI/100g peso corporal) observou-se que a maior atividade foi no 14<sup>o</sup> dia e a menor no dia do nascimento e nos dias 7 e 21 a atividade não variou.

Tabela 8 – Valores médios das atividades de  $\alpha$ -amilase, lipase e tripsina no pâncreas de frangos de corte do nascimentos aos 21 dias de idade.

Idade (dias)	Atividade (UI)	mg de proteína	UI/mg proteína	UI/ g tecido	UI/ 100g peso Corporal
<b><math>\alpha</math>-amilase</b>					
Ao nascimento	81 <sup>a</sup>	8,12x10 <sup>-3a</sup>	10348 <sup>b</sup>	15692 <sup>a</sup>	1949 <sup>d</sup>
7	60 <sup>b</sup>	6,88x10 <sup>-3a</sup>	9706 <sup>b</sup>	10786 <sup>b</sup>	3537 <sup>b</sup>
14	72 <sup>ab</sup>	4,90x10 <sup>-3b</sup>	14757 <sup>a</sup>	13529 <sup>ab</sup>	4594 <sup>a</sup>
21	57 <sup>b</sup>	4,32x10 <sup>-3b</sup>	12236 <sup>b</sup>	11259 <sup>b</sup>	3116 <sup>c</sup>
<b>Lipase</b>					
Ao nascimento	25 <sup>a</sup>	4,27x10 <sup>-3b</sup>	5749 <sup>a</sup>	3982 <sup>b</sup>	594 <sup>d</sup>
7	19 <sup>b</sup>	1,50x10 <sup>-2a</sup>	1327 <sup>c</sup>	3736 <sup>b</sup>	1132 <sup>b</sup>
14	23 <sup>a</sup>	1,10x10 <sup>-2ab</sup>	2786 <sup>b</sup>	4761 <sup>a</sup>	1718 <sup>a</sup>
21	18 <sup>b</sup>	1,10x10 <sup>-2ab</sup>	1697 <sup>c</sup>	3492 <sup>b</sup>	944 <sup>c</sup>
<b>Tripsina</b>					
Idade (dias)	Atividade ( $\mu\text{Ms}^{-1}\text{g}^{-1}$ )	mg de proteína	Atividade/mg proteína	Atividade/ g tecido	atividade/ 100g peso Corporal
Ao nascimento	1099x10 <sup>-6c</sup>	0,228 <sup>a</sup>	490x10 <sup>-5a</sup>	191x10 <sup>-3b</sup>	29x10 <sup>-3c</sup>
7	1432x10 <sup>-6b</sup>	0,298 <sup>a</sup>	495x10 <sup>-5a</sup>	295x10 <sup>-3a</sup>	94x10 <sup>-3b</sup>
14	1461x10 <sup>-6b</sup>	0,278 <sup>a</sup>	547x10 <sup>-5a</sup>	328x10 <sup>-3a</sup>	146x10 <sup>-3a</sup>
21	1747x10 <sup>-6a</sup>	0,283 <sup>a</sup>	630x10 <sup>-5a</sup>	346x10 <sup>-3a</sup>	94x10 <sup>-3b</sup>

\*Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste de Newman Keuls a 5% de probabilidade.

NIR et al. (1993) estudando o perfil enzimático de enzimas digestivas no pâncreas, de frangos de corte, observou que a atividade específica de amilase foi maior no dia da eclosão e diminuiu até o oitavo dia de idade dos animais. A atividade específica de lipase aumentou gradualmente de valores muito baixos na eclosão até décimo quarto dia de idade. E a atividade de tripsina aumentou gradualmente até atingir um pico no décimo primeiro dia de idade dos animais.

SELL et al. (1991) reportaram que a atividade específica de lipase em pâncreas de pintinhos recém eclodidos foi relativamente alta e após apresentou ligeira alteração.

KROGDAHL e SELL (1989) encontraram que a atividade específica de lipase em pintinhos diminuiu durante a primeira semana de vida e após, a atividade aumentou até atingir um platô com 35 dias de idade. Para a atividade de tripsina, os autores observaram um pequeno aumento até 14 dias de idade dos animais, seguido por uma rápida elevação da atividade até o vigésimo primeiro dia, após este período a atividade permaneceu constante até 56 dias de idade.

#### 4. RESUMO E CONCLUSÕES

Com o objetivo de estudar os efeitos da idade no desenvolvimento do trato gastrointestinal e no perfil enzimático de enzimas digestivas ( $\alpha$ -amilase, lipase e tripsina), foi conduzido um experimento inteiramente casualizado, com 4 repetições de 8 animais cada.

O experimento teve duração de 21 dias e foram utilizados pintos de um dia, Avian Farm. Os pintos foram criados em baterias aquecidas e alimentados à vontade com dieta purificada contendo os L-aminoácidos essenciais e ácido L-glutâmico como fonte de nitrogênio não específico, minerais e vitaminas. Ao término do experimento, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, fígado, pâncreas, quimo e intestino removidos e após os pesos absolutos e relativos (g/100g de peso corporal) dos órgãos, análise histológica da porção superior do intestino delgado e as atividades das enzimas digestivas no quimo e pâncreas foram determinados no dia da eclosão aos 7, 14 e 21 dias de idade.

O peso absoluto de fígado, intestino e pâncreas aumentou com a idade. O peso relativo também apresentou esta mesma tendência. O máximo de peso relativo dos órgãos (fígado, pâncreas e intestino) foi observado no 14º dia e enquanto o peso absoluto aumentou continuamente durante o período experimental.

Observou-se que todos os parâmetros morfométricos analisados aumentaram com a idade.

A atividade da  $\alpha$ -amilase e da lipase no quimo quando expressas por grama de tecido ou por 100 gramas de peso corporal aumentaram com a idade, entretanto a atividade relativa (UI/mg de proteína) só foi diferente para os animais com 7 dias de idade, ou seja para os animais de 14 e 21 dias de idade a atividade relativa não se alterou. Entretanto a atividade de tripsina no quimo não se alterou com a idade. Quando a atividade foi expressa por g de tecido a atividade dos animais com 21 dias de idade foi significativamente maior do que daqueles com 7 e 14 dias de idade, as quais não se diferenciaram.

Os valores para a atividade específica (UI/ mg de proteína) de  $\alpha$ -amilase foi maior aos 14 dias de idades e as atividades específicas observadas nos dias, do nascimento, 7 e 21 não foram diferentes. Para a enzima lipase a atividade específica foi maior no dia do nascimento e diminui ao sétimo dia, alcançando o pico máximo aos 14 dias e tornando a cair no vigésimo dia de idade. A atividade específica de tripsina não se alterou com a idade.

Quando os valores de atividade de  $\alpha$ -amilase e lipase, no pâncreas, foram expressos por UI/ 100g de peso corporal observou-se aumento da atividade com a idade, sendo que no 21<sup>o</sup> a atividade foi menor. Para a atividade de tripsina (UI/100g peso corporal) observou-se que a maior atividade foi no 14<sup>o</sup> e a menor no dia do nascimento e nos dias 7 e 14 a atividade não se alterou.

Em conclusão, as atividades máximas da enzimas digestivas ( $\alpha$ -amilase e lipase) estudadas foram observadas no décimo quarto dia de idade dos animais. Para a enzima digestiva tripsina o perfil enzimático observado, de maneira geral não se alterou com a idade, o que pode ser explicado pelo fato dos animais terem sido criados com dietas purificadas, e portanto não ter ocorrido estímulo, por ausência de substrato, para a produção de enzimas proteolíticas.

## RESUMO E CONCLUSÕES

Duzentos e cinquenta e seis pintinhos de um dia, machos, Avian Farm, de peso médio de 48 gramas foram criados em baterias aquecidas com piso de tela elevado. O desenho experimental foi um esquema fatorial 2X4 (2 níveis de ácido L-glutâmico; 6,25 e 12,5%, combinados com 4 níveis de vitamina K; 0,02; 0,20; 2,0 e 20,0 mg/kg de dieta). Consistindo de 8 tratamentos, 4 repetições e 8 animais por repetição. As aves receberam água e dieta a vontade, durante todo o período experimental de 14 dias, para o estudo de enzimas o período experimental foi de 21 dias.

De acordo com os resultados obtidos, não houve interação significativa entre os níveis de L-Glu e Vit. K e os níveis de Vit. K estudados não afetaram os parâmetros ganho de peso, consumo, conversão alimentar, resistência óssea, os teores de cinzas, os teores de Ca, P e Mg e da relação Ca:P nas cinzas. Os níveis de L-Glu não afetaram o consumo das aves, a resistência óssea, os teores de cinzas, os teores de Ca, P e Mg e da relação Ca:P nas cinzas durante o período experimental.

Os resultados mostraram que as aves alimentadas com dietas experimentais contendo 12,5% de L-Glu apresentaram maior ganho de peso (172g), melhor conversão alimentar (1,51), menor incidência de problemas de pernas (26,8%), ossos maiores (fêmures, 36,8 mm e tibiotarsos, 51,4 mm)

quando comparadas àquelas alimentadas com dietas contendo 6,25% de L-Glu, que apresentaram ganho de peso médio de 158g, conversão alimentar de 1,60, 100% de incidência de problemas de pernas e ossos menores (fêmures, 32,1mm e tibiotarsos 47,4mm).

Não foram observados efeitos significativos ( $P>0,01$ ) da interação L-Glu e Vit K) sobre a composição bioquímica dos ossos. Os teores de PNC foram maiores e o de PC menores nos ossos (tibiotarsos e fêmures) de pintos alimentados com 6,25% de L-Glu e os teores de PT não foram afetados pelos níveis de L-Glu e de Vit K.

Observou-se efeito quadrático dos níveis de Vit. K nos teores de PNC e PC dos ossos, tibiotarso e fêmur, sendo que para PNC o efeito foi decrescente e para PC crescente.

O melhor desempenho foi observado quando as aves receberam dietas experimentais suplementadas com 12,5% de L-Glu, independentemente dos níveis de Vit. K. Em relação à incidência de problemas de pernas, as aves alimentadas com a dieta contendo 12,5% de L-Glu e 2,0 mg/kg de dieta de vitamina K apresentaram um menor percentual de deformações 14,3%.

Conclui-se que os níveis de Vit. K estudados não afetaram os parâmetros de desempenho estudados e que o nível de 12,5% de L-Glu foi eficaz para maximizar o desempenho e reduzir a incidência de problemas de pernas de pintos de corte.

As aves alimentadas com dietas suplementadas com 12,5% de L-Glu apresentaram, significativamente ( $P<0,05$ ), ossos maiores do que aquelas alimentadas com dietas com 6,25% de L-Glu. Como este nível de L-Glu também, foi melhor para ganho de peso, pode-se supor que o comprimento dos ossos seja um reflexo do ganho de peso, ou seja aves que cresceram mais apresentaram ossos mais longo.

Não foi observada nenhuma relação entre as características físicas e composição química dos ossos com a incidências de problemas de pernas dos pintos alimentados com as diferentes dietas experimentais, o que sugere que o

aparecimento de problemas de pernas esteja relacionada com a porção orgânica do osso e não com a porção mineral.

A Vit. K pode estar envolvida na manutenção da saúde do tecido esquelético, possivelmente por estar envolvida no controle da remodelagem óssea. Entretanto, o desenvolvimento aparentemente normal do tecido ósseo, na deficiência de Vit. K pode ocorrer. A elevação do nível de 6,25% de L-Glu para 12,5% aumentou a fração colagenosa e diminui a fração não colagenosa. Isto pode explicar a redução da incidência de anormalidades do tecido ósseo, em pintos de corte alimentados com 12,5% de L-Glu.

Os animais alimentados com dietas com 12,5% de L-Glu apresentaram maior espessura do osso compacto e maior diâmetro do canal medular, tanto no corte longitudinal como no transversal, do que aqueles alimentados com 6,25% de L-Glu. As diferenças observadas entre os tratamentos em relação aos níveis de Vit. K foram pouco significativas. O menor comprimento médio do disco epifisário e alto nível de organização foi obtido com 12,5% de L-Glu independente do nível de Vit. K. Com 6,25% de L-Glu, o disco epifisário apresentou-se com a pior organização em relação às diversas zonas de células que compõem o disco, e os vários estágios até a calcificação da cartilagem.

Em geral, as alterações na placa de crescimento foram coincidentes com as aves que apresentaram pior desempenho, maior incidência de problemas de pernas e tibiotarsos com maiores teores de proteínas não colagenosas.

Observou-se que: o peso absoluto de fígado, intestino e pâncreas aumentou com a idade. O peso relativo também apresentou esta mesma tendência. O máximo de peso relativo dos órgãos (fígado, pâncreas e intestino) foi observado no 14º dia. Enquanto o peso absoluto aumentou continuamente durante o período experimental. E que todos os parâmetros morfométricos analisados aumentaram com a idade.

O perfil enzimático de enzimas digestivas apresentou-se da seguinte forma: a atividade da  $\alpha$ -amilase e da lipase no quimo quando expressas por grama de tecido ou por 100 gramas de peso corporal aumentaram com a idade,

entretanto a atividade relativa (UI/mg de proteína) só foi diferente para os animais com 7 dias de idade. A atividade de tripsina no quimo não se alterou com a idade

Os valores para a atividade específica (UI/ mg de proteína) de  $\alpha$ -amilase foi maior aos 14 dias de idades e as atividades específicas observadas nos dias, do nascimento, 7 e 21 não foram diferentes. Para a enzima lipase a atividade específica foi maior no dia do nascimento e diminui ao sétimo dia , alcançando o pico máximo aos 14 dias e tornando a cair no vigésimo dia de idade. A atividade específica de tripsina não se alterou com a idade.

Quando os valores de atividade de  $\alpha$ -amilase e lipase, no pâncreas, foram expressos por UI/ 100g de peso corporal observou-se um aumento da atividade com a idade, sendo que no 21<sup>o</sup> a atividade foi menor. Para a atividade de tripsina (UI/100g peso corporal) observou-se que a maior atividade foi no 14<sup>o</sup> e a menor no dia do nascimento e nos dias 7 e 14 a atividade não se alterou.

Em conclusão, as atividades máximas da enzimas digestivas ( $\alpha$ -amilase e lipase) estudadas foram observadas no décimo quarto dia de idade dos animais. Para a enzima digestiva tripsina o perfil enzimático observado, de uma maneira geral, não se alterou com a idade, o que pode ser explicado pelo fato dos animais terem sido criados com dietas purificadas, e portanto não ter ocorrido estímulo para a produção de enzimas proteolíticas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKEDO, Y.; TAKAYUKI, H.; INOUE,S.; IKEGAMI, A; MIZUNO, Y.; KANEKI, M.; NAKAMURA, T.; OUCHI, Y.; ORIMO, H. Vitamin K2 modulates proliferation and function of osteoblastic cells in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, (187): 2: 814-20, 1992.
- ALBERS, G. A A Criação e resistência às doenças em avicultura. *Conferência APINCO* 1994, 3-14, 1994.
- ALBUQUERQUE, A & RODRIGUES, T. Avanços a olhos vistos. *Avicultura industrial* 1025(85): 56-60, 1995.
- BAKER, D. H. Amino acid nutrition of the chick. In: DRAPER, H.H. ed., *Advances in Nutricional Research*. New York, Plenum Press, p.229-335, 1977.
- BAKER D.H. & MOLITORIS, B.A Utilization of nitrogen from selected purines and pyrimidines and from urea by young chick. *J Nutr.*,104, (5): 557, 1974.
- BAKER, D.H. & HAN, Y. Ideal amino acid profile for chicks during the first three weeks posthatching. *Poultry Science*, 73: 1441-47, 1994.
- BAIN, S.D. & WATKINS, B. A . Local modulation of skeletal growth and bone modeling in poultry. *J. Nutr.* 123: 317-322, 1993.

- BARONE, L.M.; ARONOW, M.A; TASSINARI, M.S.; CONLON, D.; CANALIS, E.; STEIN, G.S.; LIAN, J.B. Differential effects of warfarin on mRNA levels of developmentally regulated vitamin K dependent proteins, osteocalcin and matrix GLA protein in vitro. *J. Cell. Physiol.*, 160:255-64, 1994.
- BEIRNE, T.J. & JENSEN, L.S. Influence of high levels of pyridoxine on twisted legs in broilers. *Poultry Sci.*, 60: 1026-1029, 1981.
- BINKLEY, N.C. & SUTTIE, J.W. Vitamin K and osteoporosis. *J. Nutr.*, 125: 1812-1821, 1995.
- BITENSKY, L.; HART, J.P.; CATTERALL, A; HODGES, S.J.; PILKINGTON, M.J.; CHAYEN, J. Circulating vitmin K levels in pacients with fractures. *J. Bone Joint Surg. (Br.)* 70: 663-64, 1988.
- BIRD, F.H. Distribution of trypsin and amylase activities in the duodenum of the domestic fowl. *Br. Poult. Sci.*, 12: 373-375, 1971.
- BLAIR, R.; SHANNOM, D.W.F.; McNAB, J.M.; LEE, D.J. Effects on chick growth of adding glycine, proline, glutamic acid or diammonium citrato to diets containing cristalline essential amino acids. *Br. Poult. Sci.*, 13: 215-228, 1972.
- BOREN, B. Nutritional aspects of leg weakness. *Broiler Industry*, May, 1993.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgam quantities of protein utilizing the principle of protein dye binbing. *Anal. Biochem.*, 72: 248-54, 1976.
- CHAPUS, C.; ROVERY, M.; SARDA, L.; VERGER, r. Minireview on pancreatic lipase e colipase. *Biochemic.*, 70: 1223-1234, 1988.
- COOK, M.E. Skeletal deformities and their causes: Introduction. *Poultry Science*, 79: 982-984, 2000.
- CORNÉLIO, L. dos R. *Efeitos do ácido L-glutâmico e da relação cálcio e fósforo no desempenho e anormalidades de pernas de pintos de corte*. Viçosa, MG, UFV, 1995. 54p. (tese de M.S.).
- DAY, E. J. Future research needs focus on new, old problems. *Feedstuffs* 23:12-15, 1990.

- DELMAS, P.D., WAHNER, H.W.; MANN, K.G.; RIGGS, B.L. Assessment of bone turnover in postmenopausal osteoporosis by measurement of serum bone Gla-protein. *J. Lab. Clin. Med.*, 102: 470-76, 1983.
- DUKE, G.E. In: *Avian Physiology*, ed. By P.D. Sturkie, Springer-Verlag, N.Y., 516p, 1986.
- ERLANGER, B.F.; KOKOWSY, N.; COHEN, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 95:271-278, 1961.
- FARQUHARSON, C. & JEFFERIES, D. Chondrocytes and longitudinal bone growth: the development of tibial dyschondroplasia. *Poultry Science*, 79:994-1004, 2000.
- FEATHERSTON, W.R. Adequacy of glutamic acid synthesis by chick for maximal growth *Poult. Sci*, v53, p.680-686, 1976.
- FEATHERSTON, W.R & ROGLER, J.C. Methionine-cystine interrelationship in chicks fed diets containing suboptimal levels of methionine. *J. Nutr.*, 108: (10):1954-1058, 1978.
- FETEIH, R.; TASSINARI, M.S. & LIAN, J.B. Effects of sodium warfarin on vitamin K-dependent proteins and skeletal development in rat fetus. *J. Bone Miner. Res.* 5: 885-94, 1990.
- FLEMING, R.H. McCORMACK, H.A. & WHITEHEAD, C.C. Bone structure and strength at different ages in laying hens and effects of dietary particulate limestone, vitamin K and ascorbic acid. *British Poultry Sc.*, 39: 434-440, 1998.
- FRASER, J.D. & PRICE, P.A Lung, heart, and kidney express high levels of mRNA for the vitamin K-dependent matrix Gla-protein. Implications for the possible functions of matrix Gla-protein and for the possible distribution of the gamma carboxylase. *J. Biol. Chem.*, 263: 11033-36, 1988.
- FUJISAWA, R.; WADA, Y.; NODASAKA, Y.; KUBOKI, Y. Acidic amino acid-rich sequences as binding sites of osteonectin to hydroxyapatite crystals. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1292: 53-60, 1996.
- GARDINER, E.E.; ROGLER, J.C.; PARKER, H.E. Interrelationships between magnesium and fluoride in chicks. *J. Nutr*, 75(3): 270-74, 1961.
- GALLOP, P.M.; LIAN, J.B.; HAUSCHKA, P.V. Carboxylated calcium binding proteins and vitamin K. *New England Journal of Medicine*, 302: 1460-66, 1980.

- GIJSBERS, B.L.M.G., van HAARLEM, L.J.M.; SOUTE, B.A.M.; EBBERINK, R.H.M.; VERMEER, C. Characterization of a Gla-containing protein from calcified human atherosclerotic plaques. *Arteriosclerosis* 10: 991-95, 1990.
- GUIMARÃES, V.M. *Efeito de aminoácidos dispensáveis e indispensáveis no desempenho e anomalias das pernas de pintos de corte*. Viçosa, MG, UFV, 1988. 54p. (tese de M.S.).
- GUIMARÃES, V.M.;MORAES, G.H.K.de; FONSECA, J.B. ROSTAGNO, H.S. Efeitos do aminoácido L-Glutâmico, L-Prolina e L-lisina da dieta no desenvolvimento e incidência de problemas de pernas em pintos de corte. *R. Soc. Bras. Zoot.*, 22: 584-90, 1993.
- 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 pinto de corte. *R. Soc. Bras. Zoot.*,25: 481-493, 1996.
- GUYTON, AC. *Tratado de Fisiologia Médica*. Tradução da 8<sup>a</sup>. ed. Ed. Guanabara Koogan, RJ, 1992.
- HALL, J.; PAULI, R.M.; WILSON, K.M. Maternal and fetal sequelae of anticoagulants. *Am. J. Med.* 68: 122-140, 1980.
- HAUSCHKA, P.V.; LIAN, J.B; GALLOP, P.M. Direct identification of the calcium binding aminoacid gamma-carboxyglutamic in mineralized tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70:3925-29, 1975.
- HAUSCHKA, P.V. & GALLOP, P.M. Purification and calcium binding properties of osteocalcin, the gamma-carboxyglutamic acid-containing proteins of bone. In: WEISSIERMAN, R.H. et al. (ed), *Calcium Binding Proteins and Calcium Function*. Amsterdam, Elsevier, p. 338-47, 1977.
- HAUSCHKA, P.V. Osteocalcin: the vitamina K dependent calcium binding protein of bone matrix. *Haemostasis* 16: 2589-272, 1986.
- HAUSCHKA, P.V.; LIAN, J.B.; COLE, D.E.C; GUNDBERG, C.M. Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K dependent proteins in bone. *Phys. Rev.* 69: 990-1047, 1989.
- JANDACECK, R.J.; WHITESIDE, J.A.; HOLCOMBE, B.N.; VOLPANHEIN, R.A.; TAULBEE, J.D. The rapid hidrolisis and eficiente absorption of triglycerides with octanoic acid in the 1 and 3 positions and log-chain fatty acid in the position. *Am. J. Clin. Nutr.*, 45: 940-945, 1987.

- JIN, S.H.; CORLESS, A. & SELL, J.L. Digestive system development in post-hatch poultry. *World's Poultry Science*, 54: 335-345, 1998.
- JOSHI, B.V. Review on nutrition and leg problems in commercial broilers. *Poultry Adviser*, Vol.XXVIII: 57-62, 1995.
- KESTIN, S.C.; KNOWLES, T.G.; TINCH, AE.; GREGORY, N.G. Prevalence of leg weakness in broiler chickens and its relationship with genotype. *Veterinary Record*, 131: 190-94, 1992.
- KOHLMEIER, M.; SALOMON, A; SAUPE, J.; SHEARER, M.J. Transport of vitamin K to bone in humans. *J. Nutr.*, 126: 1192S-1196S, 1996.
- KROGDAHL, A. & SELL, L. Development of digestive enzymes and fat digestion. In: *World Poultry Congress*, 17, Helsinki, Finland, 1984, Proceedings, Helsinki, Finland, p. 352-354, 1984.
- LAVELLE, P.A . LLOYD, Q.P. GAY, C.V.; LEACH, R.M. Vitamin K deficiency does not functionally impair skeletal metabolism of laying hens and their progeny *J. Nutr.* 124: 371-377, 1994.
- LEACH, R.M. Leg weakness in broilers complex situation involving many factors. *Poultry digest*, March, 1992.
- LEACH, R.M. & NESHEIM Nutritional, genetic and morphological studies of an abnormal cartilage formation in young chicks. *J. Nutrition*, 86: 236-244, 1965.
- LEACH, R.M. and TWAL, W.O. Autocrine, paracrine and hormonal signals involved in growth plate chondrocyte differentiation. *Poultry Science*, 73: 883-888, 1994.
- LEASE, J.G. Effect of histidine on tibia alkaline phosphatase of chicks fed zinc deficient sesame meal diets. *J. Nutr.* 102: 1323-1329, 1982.
- LEESON, S. & SUMMERS, J.D. Some nutritional implications of leg problems with poultry. *Br. Vet. J.* ,144 (1): 81-92, 1988.
- LEWIS, K. The leg enigma in broilers. *Poultry Digest*, 40: 270-271, 1981.
- LHOSTE,E.F.; FISZLEWICZ, M.; GUEUGNEAU, AM.; WICKER-PLANQUART, C.; PUIGSERVER, A.; CORRING, T. Effects of dietary proteins on some pancreatic mRNAs encoding digestive enzymes in the pig. *J. Nutr. Biochem*, 4: 143-152, 1993.

- LIAN, J.B.; REIT, B.; ROUFOSSE, AH.; GLIMCHER, M.J.; GALLOP, P.M. *Vitamin K metabolism and vitaminK-dependent proteins*. J.W. Suttie, (ed). P.237-244, University Park Press, Baltimore, 1979.
- LIAN, J.B.; DUNN, K.; KEY, L.L. In vitro degradation of bone particles by human monocytes is decreased with depletion of the vitaminK-dependent protein from the matrix. *Endocrinology*,118: 1636-42, 1986.
- LILBURN, M.S. Skeletal growth of commercial poultry species. *Poultry Science* v.73, p.897-903, 1994.
- LOESER, R.F. & WALLIN, R. Cell adhesion to matrix Gla protein and its inhibition by na Arg-Gly\_Asp-containing peptide. *J. Biol. Chem.*,267: 9459-62, 1992.
- MAHAGNA, M. & NIR, I. Comparative development of digestive organs, intestinal disaccharidases and some blood metabolites in broiler and layer-tipe chicks after hatching. *British Poultry Science*, 37: 359-371, 1996.
- McNAMEE, P.T.; McCULLAGH, J.J.; THORP, B.H.; BALL, H.J.; GRAHAM, D.; McCULLOUGH, S.J.; McCONAGHY, D.; SMYTH, J.A Study of leg weakness in two commercial flocks. *Vet. Rec.*, 143: 131-135, 1998.
- MAILLARD, C.; BERRUYER, M.; SERRE, C.M.; DECHAVANNE, M.; DELMAS, P.D. Protein S, a vitamin K-dependent protein , is a bone matrix component synthesized and secreted by osteoblasts. *Endocrinology*, 130: 1599-1604, 1992.
- McDOWELL, L. R. *Vitamins in Animal Nutrition*. Cunha T. J. (ed), Academic Press, 1989.
- MIKES, O.; HOLEYSOVSKY, V.; TOMBASEK, V.; SORM, F. Covalente struture of bovine trypsinogen. The position of the remaining amides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 24: 346-352, 1966.
- MORAES, G.H.K.de,; ROGLER, J.C.; FEATHERSTON, W.R. Effects of non-specific nitrogen deficiency on growth rate and leg problem in chicks. *Poultry Sci.*, 63: 344-54, 1984.
- MORAES, G.H.K.de,; ROGLER, J.C.; FEATHERSTON, W.R. Effects of D-amino acids on growth rate and leg problems in chicks. *Poultry Sc.* 66: 98-102, 1987.

- 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, *Anais.....*p.28, São Paulo, USP, 1998.
- MORAN Jr., E.T. *Comparative nutrition of fowl and swine. The gastrointestinal systems*. Ed. E.T. Moran Jr., Guelph, Canadá, 253p., 1982a.
- MORAN Jr., E.T. Starch digestion in fowl. *Poultry Sci.* 61:1257, 1982b.
- MORAN, Jr E.T. Digestão e absorção de gorduras. In: *Fisiologia da digestão e absorção das aves*. Campinas: Fundação APINCO de Ciências e Tecnologia Avícolas, 1994.
- MORRIS, M.P. National survey of leg problems. *Broiler Ind.*, May, 20-24, 1993.
- NELSON, T.S. KIRBY, L.K.; JOHNSON, Effect of calcium, phosphorus and energy on the incidence of weak legs in heavy male broilers, *J. Appl. Poultry Res.* 1: 11-18, 1992.
- NEURATH, H. & SCHWERT, G.W. The mode of action of the crystallin pancreatic proteolytic enzymes. *Chem. Rev.*, 46:69-153,1950.
- 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* 34: 523-532, 1993.
- NIR, I. Mecanismos de digestão e absorção de nutrientes durante a primeira semana. In: Conferência Apinco 98 - Simpósio Internacional sobre Manejo de Pintos de Corte. Conferência Apinco 1998, *Anais.....* 81-91, Campinas, SP, 13 de maio, 1998.
- NITSAN, Z.; DUNNINGTON, E.A.; SIEGEL, P.B. Organ growth and digestive enzyme levels to fifteen days of age in lines of chickens differing in body weight. *Poultry Science*, 70: 2040-2048, 1991a.
- 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*, 32: 515-523, 1991b.

- NITSAN, Z.; TURRO-VICENT; LIU, G.; DUNNINGTON, E.A.; SIEGEL P.B. Intubation of weight-selected chicks with soybean oil or residual yolk: effect on early growth and development. *Poultry Science*, 74: 925-936, 1995.
- NOY, Y. & SKLAN, D. Posthatch development in poultry. *J. Appl. Poultry Res.* 6: 344-354, 1997.
- PARFITT, A.M. Pharmacologic manipulation of bone remodelling and calcium homeostasis. In: *Progress in Basic and Clinical Pharmacology*, Kanis ed, Karger AG, Basel, Switzerland, vol. 4, 1-27, 1990.
- PARTHEMORE, P.; BURTON, D.W.; DEFTOS, L.J. Associations and dissociations between serum bone Gla protein and alkaline phosphatase in skeletal metabolism. *J. Orthop. Res.*, 11:671-76, 1993.
- PASTOUREAU, P.; VERGNAUD, P.; MEUNIER, P.J.; DELMAS, P.D. Osteopenia and bone remodeling abnormalities in warfarin-treated lambs. *J. Bone Miner. Res.*, 8: 1417-26, 1993.
- PERINI, D.T. *Efeitos do ácido L-glutâmico e da vitamina D<sub>3</sub> no desempenho e anormalidades das pernas de pintos de corte*. Viçosa, Mg, UVF, 1993, 94p. (tese de M.S.).
- PENZ Jr, A M. Digestão e absorção de proteínas e aminoácidos. In: *Fisiologia da digestão e absorção das aves*. Campinas: Fundação APINCO de Ciências e Tecnologia Avícolas, 1994.
- PENZ Jr., A.M, & VIEIRA, S.L. Nutrição na primeira semana. In: Conferência Apinco 98 - Simpósio Internacional sobre Manejo de Pintos de Corte. Conferência Apinco 1998, *Anais..... 121-139*, Campinas, SP, 13 de maio, 1998.
- PIERSON, F.W. & HESTER, P.V. Factors influencing leg abnormalities in poultry: a review. *W.P.S.A Journal*, 38: 5-7, 1982.
- PINES, M. & HURWITZ. The role of the growth plate in longitudinal bone growth. *Poultry Sci.*, 70: 1806-1814, 1991.
- PRICE, P.A; OSUKA, AS.; POSSER, J.W.; KRISTAPONIS, J.; RAMAN, N. Characterization of a gammacarboxyglutamic acid-containing protein of bone. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 73: 1447-51, 1976.
- PRICE, P.A & WILLIAMSON, M.K. Effects of warfarin on bone. *J. Biol. Chem.* 253: 12754-59, 1981.

- PRICE, P.A Vitamin K-dependent formation of bone Gla-protein (osteocalcin) and its function. In: AUBARCH, (ed). *Vitamins and Hormones*. NY, Academic Press. V.42, p.65-109, 1985.
- PRICE, P.A & WILLIAMSON, M.K. Primary structure of bovine matrix Gla protein, a new vitamin K-dependent bone protein. *J. Biol. Chem.* 260: 14971-75, 1985.
- PRICE, P.A & KANEDA, Y. Vitamin K counteracts effects of warfarin in liver but not in bone. *Thromb. Res.*, 46: 121-31, 1987.
- RATH, N.C.; HUFF, G.R.; BALOG, J.M. Factors regulating bone maturity and strength in poultry. *Poultry Science*, 79: 1024-1032, 2000.
- RIBEIRO, M. *Efeitos de fontes e níveis de nitrogênio não específico no desempenho e incidência de anomalias nas pernas de pintos de corte*. Viçosa, MG, UFV, 1990, 82p. (tese M.S.).
- 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.*, 24 n1: 86-98, 1995a.
- RIBEIRO, M.; MORAES, G.H.K.de e 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.*, 42: 768-77, 1995b.
- RIBEIRO, M.; MORAES, G.H.K.de 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 ácido úrico séricos. *Rev. Soc. Bras. Zoot.*, 24 (5): 778-787, 1995c.
- RIDDELL, C. Skeletal deformities in poultry. In: *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine*, vol. 25, Academic Press, 277-307, 1981.
- ROBINSON, N.C.; NEURATH, H.; WALSH, K.A. The relation of the  $\alpha$ -amino group of trypsin to enzyme function and zymogen activation. *Biochemistry*, 12 (3): 420-426, 1973.
- RODRIGUES, AC.P. & MORAES, G.H.K. de Efeitos do ácido glutâmico e da vitamina K da dieta no desempenho e nas anomalias nas pernas de pintos de corte. *Revista Ceres*, 42 (241): 270-78, 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. *Revista Ceres*, 43 (249): 567-80, 1996.
- RODRIGUES, A C.P. *Efeitos do ácido L-glutâmico e da vitamina K da dieta em pintos de corte*. Viçosa, MG, UFV, 1992, 55p. (tese de M.S.).
- ROSTAGNO, S.H. Carboidratos. In: *Fisiologia da digestão e absorção das aves*. Campinas: Fundação APINCO de Ciências e Tecnologia Avícolas, 1994.
- RUTZ, F. Secreções digestivas. In: *Fisiologia da digestão e absorção das aves*. Campinas: Fundação APINCO de Ciências e Tecnologia Avícolas, 1994.
- SASSE, C.E. & BAKER, D.H. Modifications the Illinois reference standard amino acid mixture. *Poultry Sci.*, 52,(5): 1970-1972, 1973.
- SELL,J.L.; ANGEL,G.R.; PIQUER,F.J.; MALLARINO,E.G.; AL-BATSHAB, H.A. Developmental patterns of selected characteristics of the gastrointestinal tract of young turkeys. *Poultry Science*, 70: 1200-1205, 1991.
- SILVA, D.J. *Análise de alimentos (métodos químicos e bioquímicos)*. Viçosa, MG, Imprensa Universitária, UFV, 1990.
- SILVA, F.A da. *Efeitos do ácido L-glutâmico no desempenho e composição química de tíbias e fêmures de pintos de corte*. Viçosa, MG, UFV, 1995. 63p. (tese de M.S.).
- SILVA, F.A. *Efeitos do ácido L-glutâmico e da vitamina D3 no desempenho e anomalias ósseas de pintos de corte*. Viçosa, MG, UFV, 2000. 144p. (tese de D.S.)
- SILVA, F. A., MORAES, G.H.K.de Effects of L- glutamis acid on growth and partial chemical composition of tibia and femur of chicks. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 1995. Caxambú, MG. *Anais .....SSbq*, p.51, 1995.
- SILVA. F.A.; MORAES, G.H.K.de; RODRIGUES, A.C.P.; ALBINO, F.T.; ROSTAGNO, H.S.; OLIVEIRA, M.G.A.; FONSECA, C.C.; FANCHIOTTI, F.E. Efeitos do ácido L-glutâmico e da vitamina d3 nos parâmetros de tibiotarsos e fêmures de pintos de corte. *Revista Brasileira de Zootecnia*, no prelo (2000).

- SILVA, J. M. L. da Fatores que afetam a estrutura óssea das aves. In: *Congresso Brasileiro de Avicultura*, VI, BH, Anais, BH, p. 147-157, 1979
- SIMOES-NUNES, C. Adaptation of pancreatic lipase to the amount and nature of dietary lipids in the growing pig. *Reprod. Nutr. Develop.*, 26: 1273-1280, 1986.
- SUGAHARA, M. & ARIYOSHI, S. The nutritional value of the individual nonessential amino acid as the nitrogen source in the chick nutrition. *Agric. Biol, Chem.*, 31: 1270-1276, 1967.
- SUTTIE, J.W. Vitamin K. In: *Handbook of vitamins* (Machlin, L.J., ed.), 2<sup>a</sup>. ed p.145-94, Marcel Dekker, NY, 1991.
- TAFURI, M.L. VILORIA, M.I.V., FONSECA, J.B. MORAES, G.H.K., SANT'ANNA, R. Observações preliminares sobre a composição do tecido ósseo e deformações de pernas em frangos de corte. *Revista Ceres* 40 (231): 491-501, 1993.
- TARDIM, A C. Visão nutricional dos problemas locomotores em frangos de corte. *Conferência APINCO 1995*, p.71-83, 1995.
- THORP, B. Transtornos ósseos de las aves. *Industria Avicola V* 41, p. 22-24, 1994.
- THORP, B.H. & WADDINGTON, D. Relationships between the bone pathologies, ash and mineral content of long bones in 35-day-old broiler chickens. *Res. Vet. Sci.*, 62:67-73, 1997.
- THORP, B.H. Fisiopatologia do aparelho locomotor: etiologias infecciosas. In: Conferência APINCO'99 de Ciência e Tecnologia Avícolas. *Anais.....* 1-16, 1999.
- UNI, Z.; NOY, Y.; SKLAN, D. Posthatch changes in morphology and function of the small intestines in heavy- and light-strain chicks. *Poultry Science*, 74: 1622-1629, 1995.
- UNI, Z.; GANOT, S.; SKLAN, D. Posthatch development of mucosal function in the broiler small intestine. *Poultry Science* 77: 75-78, 1998
- UNI, Z.; NOY, Y.; SKLAN, D. Posthatch development of small intestinal function in the poult *Poultry Science* 78: 215-222, 1999.

- VAJDA, T. & GARAI, A. Comparison of the effect of calcium (II) and manganese (II) ions on trypsin autolysis. *J. Inorg. Biochem.*, 15: 307-315, 1981.
- VANDER, A.J., SHERMAN, J.H.; LUCIANO, D.F. *Human Physiology*, McGraw-Hill Publishing Company, New York, 1990.
- VERMEER, C.; JIE, K.S.G. & KNAPEN, H.J. Role of vitamin K in bone metabolism. *Ann. Rev. Nutr.*, 15:1-22, 1995.
- VETTER, V.; FISHER, L.W.; MINTZ, K.P.; KOPP, J.B.; TUROSS, N. TERMINE, J.D.; ROBEY, P.G. Osteogenesis imperfecta: changes in noncollagenous protein in bone. *J. bone Miner. Res.*, 6:501-505, 1991.
- YALÇIN, S., SETTAR, P.; DICLE, O. Influence of dietary protein and Sex on walking ability and bone parameters of broilers. *British Poultry Sc.* 39: 251-256, 1998.
- YOUNG, M.F.; KERR, J.M.; IBARAKI, K. HEEGAARD, A.M.; ROBEY, P.G. Structure, expression and regulation of major noncollagenous matrix proteins of bone. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 281: 275-293, 1992.
- WATKINS, B. A Avian bone metabolism: Cell mediated mineralization and localized regulatory factors. *J. Nutr.*, 123: 299-300, 1993.
- WOOD, G.M. & SUTTIE, J.W. Vitamin K-dependent carboxylase. *The J. Biol. Chem.*, 263 (7): 3242-39, 1988.

## **APÊNDICE**

Tabela 1 A – Resumo das análises de variância do ganho de peso, consumo de ração e da conversão alimentar.

FV	GL	Quadrado médio		
		Ganho de peso	Consumo de ração	Conversão alimentar
Ácido Glutâmico (GLU)	1	1572,203**	80,963 <sup>ns</sup>	0,7801**
Vitamina K (VitK)	3	9,373 <sup>ns</sup>	91,527 <sup>ns</sup>	0,8500 <sup>ns</sup>
GLU X VitK	3	20,846 <sup>ns</sup>	37,872 <sup>ns</sup>	0,2125 <sup>ns</sup>
Resíduo	24	14,174 <sup>ns</sup>	137,798	0,4433
CV (%)		4,590	2,287	4,289

\*\* F significativo a 1% de probabilidade

\* F significativo a 5% de probabilidade

ns F não significativo a 5% de probabilidade

Tabela 2A – Resumo das análise de variância do comprimento e resistência do fêmur e tibiotaso.

FV	GL	Quadrado médio		
		Comprimento	Resistência	
Fêmur	Ácido glutâmico (GLU)	1	225,625**	35,151 <sup>ns</sup>
	Vitamina K (VitK)	3	0,6917 <sup>ns</sup>	4,439 <sup>ns</sup>
	GLU X VitK	3	0,1583 <sup>ns</sup>	1,732 <sup>ns</sup>
	Resíduo	32	0,6750	31,104
	CV (%)		2,387	10,163
Tibiotarsos	Ácido glutâmico (GLU)	1	160,000**	41,841 <sup>ns</sup>
	Vitamina K (VitK)	3	0,2000 <sup>ns</sup>	2,059 <sup>ns</sup>
	GLU X VitK	3	0,0666 <sup>ns</sup>	1,139 <sup>ns</sup>
	Resíduo	32	0,2750	44,452
	CV (%)		1,062	11,990

\*\* F significativo a 1% de probabilidade

\* F significativo a 5% de probabilidade

ns F não significativo a 5% de probabilidade

Tabela 3A – Resumo das análise de variância do teor de cinzas de fêmur e tibiotaso.

			Quadrado médio	
	FV	GL	% Cinzas	
Fêmur	Ácido glutâmico (GLU)	1	0,2025 <sup>ns</sup>	
	Vitamina K (VitK)	3	0,8292 <sup>ns</sup>	
	GLU X VitK	3	0,09583 <sup>ns</sup>	
	Resíduo	32	2,7949	
	CV (%)		4,155	
Tibiotarsos	Ácido glutâmico (GLU)	1	0,00625 <sup>ns</sup>	
	Vitamina K (VitK)	3	0,1003 <sup>ns</sup>	
	GLU X VitK	3	0,05158 <sup>ns</sup>	
	Resíduo	32	2,5873	
	CV (%)		3,995	

\*\* F significativo a 1% de probabilidade

\* F significativo a 5% de probabilidade

ns F não significativo a 5% de probabilidade

Tabela 4A – Resumo das análise de variância do teor de cálcio e fósforo nas cinzas de fêmur e tibiotaso.

			Quadrado médio	
	FV	GL	Cálcio	Fósforo
Fêmur	Ácido glutâmico (GLU)	1	0,01225 <sup>ns</sup>	0,00900 <sup>ns</sup>
	Vitamina K (VitK)	3	0,01692 <sup>ns</sup>	0,02833 <sup>ns</sup>
	GLU X VitK	3	0,12492 <sup>ns</sup>	0,00300 <sup>ns</sup>
	Resíduo	32	4,096	0,654
	CV (%)		5,256	4,448
Tibiotarsos	Ácido glutâmico (GLU)	1	0,01600 <sup>ns</sup>	0,01225 <sup>ns</sup>
	Vitamina K (VitK)	3	0,01767 <sup>ns</sup>	0,09825 <sup>ns</sup>
	GLU X VitK	3	0,1513 <sup>ns</sup>	0,05825 <sup>ns</sup>
	Resíduo	32	3,8768	0,9755
	CV (%)		5,113	5,351

\*\* F significativo a 1% de probabilidade

\* F significativo a 5% de probabilidade

ns F não significativo a 5% de probabilidade

Tabela 5A – Resumo das análise de variância da relação Ca:P e do teor de magnésio nas cinzas de fêmur e tibiotaso.

			Quadrado médio	
	FV	GL	Ca:P	Mg
Fêmur	Ácido glutâmico (GLU)	1	0,0000900 <sup>ns</sup>	0,000010 <sup>ns</sup>
	Vitamina K (VitK)	3	0,000303 <sup>ns</sup>	0,000030 <sup>ns</sup>
	GLU X VitK	3	0,000303 <sup>ns</sup>	0,0000033 <sup>ns</sup>
	Resíduo	32	0,001615	0,00192
	CV (%)		1,927	5,600
Tibiotarsos	Ácido glutâmico (GLU)	1	0,00064ns	0,0000025 <sup>ns</sup>
	Vitamina K (VitK)	3	0,00139ns	0,0000292 <sup>ns</sup>
	GLU X VitK	3	0,0001267ns	0,00000917 <sup>ns</sup>
	Resíduo	32	0,004105	0,002522
	CV (%)		3,069	6,398

\*\* F significativo a 1% de probabilidade

\* F significativo a 5% de probabilidade

ns F não significativo a 5% de probabilidade

Tabela 6A – Resumo das análise de variância do teor de proteína colagenosa (PC), não colagenosa (PNC) e totais (PT) do fêmur e tibiotaso.

			Quadrado médio		
	FV	GL	PC	PNC	PT
Fêmur	Ácido glutâmico (GLU)	1	6,93056**	6,23310**	0,017639 <sup>ns</sup>
	Vitamina K (VitK)	3	9,82021**	9,46912**	0,004859 <sup>ns</sup>
	GLU X VitK	3	0,02715 <sup>ns</sup>	0,00414 <sup>ns</sup>	0,020219 <sup>ns</sup>
	Resíduo	32	0,457145	0,09559	0,424877
	CV (%)		2,505	8,527	2,129
Tibiotarso	Ácido glutâmico (GLU)	1	7,74399**	7,59513**	0,002403 <sup>ns</sup>
	Vitamina K (VitK)	3	9,30195**	9,66586**	0,015043 <sup>ns</sup>
	GLU X VitK	3	0,03101 <sup>ns</sup>	0,003942 <sup>ns</sup>	0,049016 <sup>ns</sup>
	Resíduo	32	0,429778	0,080106	0,36295
	CV (%)		2,425	7,879	1,967

\*\* F significativo a 1% de probabilidade

\* F significativo a 5% de probabilidade

ns F não significativo a 5% de probabilidade

Tabela 7A – Resumo das análise de variância do peso absoluto e relativo de pâncreas, fígado e intestino.

			Quadrado médio		
	FV	GL	Pâncreas	Fígado	Intestino
Peso absoluto	Tratamento (idade)	3	1,04477**	166,1242**	69,6769**
	Resíduo	8	5,233x10 <sup>-3</sup>	0,187411	0,114678
	CV (%)		11,693	6,207	5,855
Peso relativo	Tratamento (idade)	3	4,305x10 <sup>-2</sup> **	1,45471**	3,6898**
	Resíduo	8	5,683x10 <sup>-5</sup>	1,266x10 <sup>-2</sup>	8,658x10 <sup>-3</sup>
	CV (%)		2,282	3,50	3,142

\*\* F significativo a 1% de probabilidade

\* F significativo a 5% de probabilidade

ns F não significativo a 5% de probabilidade

Tabela 8A – Resumo das análise de variância da atividade (UI) de lipase, e mg de proteínas no quimo e pâncreas.

			Quadrado médio	
	FV	GL	UI	mg de proteínas
Quimo	Tratamento (idades)	2	20,4044 **	4,327x10 <sup>-7</sup> **
	Residuo	6	0,0333	4,467x10 <sup>-8</sup> **
	CV(%)		8,281	8,926
Pâncreas	Tratamento (idade)	3	42,972 *	6,029x10 <sup>-5</sup> *
	Resíduo	8	3,500	1,223x10 <sup>-5</sup>
	CV (%)		8,536	33,535

\*\* F significativo a 1% de probabilidade

\* F significativo a 5% de probabilidade

ns F não significativo a 5% de probabilidade

Tabela 9A – Resumo das análise de variância da atividade de lipase expressa em UI/mg de proteínas, UI/ g de tecido e UI/ 100g de peso corporal no quimo e pâncreas.

	FV	GL	Quadrado médio		
			UI/ mg de proteína	UI/ g de tecido	UI/ 100g peso corporal
Quimo	Tratamento (idade)	2	796555,1**	1532907,0**	1,383x10 <sup>7</sup> **
	Resíduo	6	74454,44	386,22	2629,67
	CV (%)		6,552	2,181	3,331
	Tratamento (idade)	3	1,205x10 <sup>7</sup> **	876561,0*	662995,6**
Pâncreas	Resíduo	8	264493,9	144071,5	28009,5
	CV (%)		17,797	9,519	15,257

\*\* F significativo a 1% de probabilidade

\* F significativo a 5% de probabilidade

ns F não significativo a 5% de probabilidade

Tabela 10A – Resumo das análise de variância da atividade (UI) de  $\alpha$ -amilase e mg de proteínas no quimo e pâncreas.

	FV	GL	Quadrado médio	
			UI	mg de proteínas
Quimo	Tratamento (idades)	2	0,3076**	8,449x10 <sup>-7</sup> ns
	Residuo	6	0,0121	4,118x10 <sup>-7</sup>
	CV(%)		11,579	15,644
Pâncreas	Tratamento (idade)	3	367,111*	9,270x10 <sup>-6</sup> *
	Resíduo	8	59,936	9,993x10 <sup>-7</sup>
	CV (%)		11,439	16,514

\*\* F significativo a 1% de probabilidade

\* F significativo a 5% de probabilidade

ns F não significativo a 5% de probabilidade

Tabela 11A – Resumo das análise de variância da atividade de  $\alpha$ -amilase expressa em UI/mg de proteínas, UI/ g de tecido e UI/ 100g de peso corporal no quimo e pâncreas.

	FV	GL	Quadrado médio		
			UI/ mg de proteína	UI/ g de tecido	UI/ 100g peso corporal
Quimo	Tratamento (idade)	2	10508,78*	21304,11**	157324,8**
	Resíduo	6	1401,111	73,778	522,556
	CV (%)		15,698	5,582	6,244
	Tratamento (idade)	3	1,542x10 <sup>7</sup> *	1,533x10 <sup>7</sup> *	3589695,0*
Pâncreas	Resíduo	8	1248287	2968399	435439,7
	CV (%)		9,499	13,443	20,003

\*\* F significativo a 1% de probabilidade

\* F significativo a 5% de probabilidade

ns F não significativo a 5% de probabilidade

Tabela 12A – Resumo das análise de variância da atividade de tripsina, e mg de proteínas no quimo e pâncreas.

	FV	GL	Quadrado médio	
			Atividade	mg de proteínas
Quimo	Tratamento (idades)	2	5,5511x10 <sup>-10</sup> ns	2,501x10 <sup>-3</sup> ns
	Residuo	6	2,3544x10 <sup>-10</sup>	5,618x10 <sup>-3</sup>
	CV(%)		8,530	16,631
Pâncreas	Tratamento (idade)	3	2,114x10 <sup>-7</sup> *	2,810x10 <sup>-3</sup> ns
	Resíduo	8	1,527x10 <sup>-8</sup>	1,633x10 <sup>-3</sup>
	CV (%)		8,610	14,865

\*\* F significativo a 1% de probabilidade

\* F significativo a 5% de probabilidade

ns F não significativo a 5% de probabilidade

Tabela 13A – Resumo das análise de variância da atividade de tripsina expressa em atividade/mg de proteínas, atividade/ g de tecido e atividade/ 100g de peso corporal no quimo e pâncreas.

		Quadrado médio			
	FV	GL	Atividade/ mg de proteína	Atividade/ g de tecido	atividade/ 100g peso corporal
Quimo	Tratamento (idade)	2	4,547x10 <sup>-9</sup> ns	2,023x10 <sup>-4</sup> *	2,599x10 <sup>-3</sup> *
	Resíduo	6	5,6984x10 <sup>-9</sup>	1,356x10 <sup>-5</sup>	1,393x10 <sup>-4</sup>
	CV (%)		18,497	12,995	17,825
Pâncreas	Tratamento (idade)	3	1,344x10 <sup>-6</sup> ns	1,449x10 <sup>-2</sup> *	6,850x10 <sup>-3</sup> *
	Resíduo	8	1,021x10 <sup>-6</sup>	1,122x10 <sup>-3</sup>	4,218x10 <sup>-4</sup>
	CV (%)		18,654	11,666	22,653

\*\* F significativo a 1% de probabilidade

\* F significativo a 5% de probabilidade

ns F não significativo a 5% de probabilidade