

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO ZOOTÉCNICO, DA FUNÇÃO
DA MUCOSA INTESTINAL E DA MICROBIOTA ILEAL
QUANDO DA SUBSTITUIÇÃO DO MILHO PELO SORGO NA
RAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE**

Karoll Andrea Alfonso Torres
Médica Veterinária

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL

Março de 2010

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO ZOOTÉCNICO, DA FUNÇÃO
DA MUCOSA INTESTINAL E DA MICROBIOTA ILEAL
QUANDO DA SUBSTITUIÇÃO DO MILHO PELO SORGO NA
RAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE**

Karoll Andrea Alfonso Torres

**Orientador: Prof. Dr. Marcos Macari
Co-orientador: Prof. Dr. Renato Luis Furlan**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Zootecnia (Produção Animal).

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL

Março de 2010

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

KAROLL ANDREA ALFONSO TORRES – natural de Garagoa – Boyacá, Colômbia, nasceu no dia 29 de janeiro de 1978. Em fevereiro de 1995 ingressou no curso de graduação em Medicina Veterinária, na Faculdade de Medicina Veterinária e de Zootecnia, da Universidade Nacional da Colômbia em Bogotá, formando-se em outubro de 2002. Em março de 2004 iniciou o curso de Mestrado em Zootecnia (Área de concentração: Produção Animal) na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista e concluiu em fevereiro de 2006. Na mesma Instituição, em março de 2006 iniciou o curso de Doutorado (Área de concentração: Produção Animal) concluindo-o em fevereiro de 2010. Foi bolsista do Programa Estudante-Convênio de Pós-Graduação (PEC-PG) da CAPES durante os períodos de março de 2005 até fevereiro de 2006 e de março de 2008 até fevereiro de 2010.

*Aos meus queridos pais,
Rosa Maria e Juan Antonio*

*À minha irmã, cunhado e sobrinha
Ingrid, Angel e Sofia*

*Porque por vocês sinto profundo amor e admiração.
E sempre sinto a sua presença pelo amor,
as orações, o apoio e o incentivo incondicional e constante.
A pesar da distância vocês permanecem sempre perto de mim.*

*Ao meu grande amor,
João Pedro*

*Por toda sua dedicação, amor, amizade e companhia.
Pela sua paciência, compreensão e incentivo constantes.*

Minha Dedicção especial

Ao,

Prof. Dr. Marcos Macari

*Pela oportunidade de trabalhar no seu grupo de pesquisa,
na área que eu gosto.
Pela orientação e incentivo durante a realização deste trabalho
e pelo grande exemplo profissional.*

Às minhas amigas,

Profa. Dra. Kênia C. Bicego

Profa. Dra. Luciane H. Gargaglioni

*Pela amizade, companhia, incentivo e apoio constante.
Pelos oportunos conselhos que sempre ajudaram a resolver
minhas inquietudes e preocupações profissionais e pessoais.*

Meu agradecimento especial

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Renato Luis Furlan, pela colaboração constante na consecução de recursos para este e outros trabalhos e as conversações sobre o valor da pós-graduação.

Aos professores Isabel C. Boleli, João M. Pizauro Jr., Luciane H. Gargaglione e Kênia C. Bicego (comissão examinadora do exame de qualificação); Isabel C. Boleli, João M. Pizauro Jr., Alex Maiorka e Alice Murakami (comissão examinadora da Tese) pelas importantes sugestões feitas para o aprimoramento da Tese.

Aos colegas de pós-graduação e grandes amigos Lilian F. Arantes de Souza, Marcos Gonçalves e Wedson Nogueira, Miguel F. Fernandez, Janaina Della Torre da Silva, Vanessa Karla da Silva, Viviane, Juliana D'Antonio, Rodrigo Antonio Gravena, Rafael Henrique Marques, Juan Carlos Rios, Fabrício Hirota Hada, Diana Correa Castiblanco, Anchieta. Agradeço a todos pela valiosa colaboração em diferentes fases do trabalho e as sugestões que contribuíram na realização do mesmo, e pelos momentos de descontração em churrascos e jantares que fortaleceram nossa amizade.

Aos funcionários da FCAV/UNESP, Jaboticabal: Clara A. Martines, Damares P. Rovieiro, Orandi Mateus, Euclides Secato e William Santos (Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal), Izildo J. Sant'Ana, Robson F. Santos, Vicente B. Ligeiro (Setor de Avicultura); Sandra, Oswaldo, Helio (Fábrica de Rações), Claudia, Claudinha (Laboratório de Microscopia Eletrônica), Fátima A. Ribeiro Harnich, Tânia (Departamento de Tecnologia), Silvina Berchielli (Departamento de Microbiologia) a todos, muito obrigada pela valiosa colaboração na realização deste trabalho.

Agradeço ao Prof. Dr. João M. Pizauro Jr. pela orientação e à Fátima R. Harnich, Cecília, Vanessa, Flávio e Andréia pela colaboração nas análises de determinação de enzimas de membrana no laboratório de Enzimologia Aplicada do departamento de Tecnologia da FCAV.

Agradeço à Profa. Dra. Christiane de Souza pela orientação e à Tarsia Giabardo pela colaboração nas análises de imunohistoquímica realizadas no laboratório de Citologia da UNESP de Araraquara.

Agradeço ao Prof. Dr. Ruben Pablo S. Iturrino pela orientação e à Mariana Beraldo, Marita e Silvína Berchielli pela colaboração nas análises bacteriológicas no laboratório de anaerobiose do departamento de Microbiologia da FCAV.

À Edna Mireya Gómez Ortiz, agradeço pela bonita amizade, apoio e pela excelente convivência. À Astrid Riveira, pela amizade de sempre. Aos queridos Dona Carmen e Sr. José Del Vecchio pela grande ajuda e amizade. A todos os meus familiares e amigos pelo carinho e apoio de sempre.

À família Cordido, Dona Tereza, Sr. Fernando, Luis, Ruth e meu amor João Pedro, agradeço pelo carinho, apoio, dedicação e compreensão durante este período de trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
Introdução	1
Efeitos antinutricionais dos taninos	2
Efeitos benéficos dos taninos.....	3
Classificação do sorgo (<i>Sorghum bicolor</i> L. Moench) pelo conteúdo de taninos.....	4
Inclusão de sorgo na ração de monogástricos.....	4
REFERÊNCIAS	5
CAPÍTULO 2 – DESEMPENHO ZOOTÉCNICO E RENDIMENTO DE CARÇAÇA E PARTES DE FRANGOS DE CORTE EM FUNÇÃO DA SUBSTITUIÇÃO DE MILHO PELO SORGO DA RAÇÃO	9
RESUMO	9
INTRODUÇÃO	10
MATERIAL E MÉTODOS	11
Desenho experimental, aves e dietas.....	11
Análise estatística.....	13
RESULTADOS	13
DISCUSSÃO	14
CONCLUSÕES	16
REFERÊNCIAS	17
CAPÍTULO 3 – MORFOLOGIA E INTEGRIDADE DA MUCOSA E CRESCIMENTO DO INTESTINO DELGADO EM FUNÇÃO DA SUBSTITUIÇÃO DE MILHO PELO SORGO DA RAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE	19
RESUMO	19
INTRODUÇÃO	20
MATERIAL E MÉTODOS	22
Colheita de amostras.....	22
Avaliação do crescimento do intestino delgado.....	22
Morfometria da mucosa do intestino delgado.....	22
- Número de células caliciformes e morfometria dos vilos.....	23

<i>Método de coloração pelo ácido periódico-Schiff (PAS)</i>	23
- Índice mitótico e morfometria das criptas.....	24
<i>Imunohistoquímica para PCNA</i>	24
<i>Aquisição e análise de imagens</i>	26
- Densidade de vilos e integridade da mucosa.....	27
Análise estatística.....	28
RESULTADOS	30
Crescimento do intestino delgado.....	30
Morfometria da mucosa do intestino delgado.....	31
Integridade da mucosa.....	34
<i>Análise descritiva da classificação dos vilos pelo grau de perda epitelial</i>	35
DISCUSSÃO	41
CONCLUSÕES	43
REFERÊNCIAS	43
CAPÍTULO 4 – ATIVIDADE DAS ENZIMAS DA BORDA EM ESCOVA DA MUCOSA DO JEJUNO EM FRANGOS ALIMENTADOS COM DIFERENTES NÍVEIS DE SUBSTITUIÇÃO DO MILHO PELO SORGO DA RAÇÃO	46
RESUMO	46
INTRODUÇÃO	47
MATERIAL E MÉTODOS	48
Colheita de amostras.....	48
Obtenção de vesículas de membrana da borda em escova (VMBE) a partir da mucosa do jejuno.....	49
Determinação da atividade da Aminopeptidase.....	51
Determinação da atividade da Fosfatase Alcalina intestinal.....	52
Determinação da atividade da Maltase.....	52
Análise estatística.....	53
RESULTADOS	53
<i>Fator de purificação das enzimas de membrana fosfatase alcalina, aminopeptidase e maltase e repetibilidade do procedimento de obtenção de VMBE</i>	53
<i>Atividade das enzimas aminopeptidase, fosfatase alcalina e maltase em VMBE obtidas do jejuno dos frangos</i>	56
<i>Aminopeptidase</i>	56
<i>Fosfatase alcalina intestinal</i>	56
<i>Maltase</i>	57

DISCUSSÃO.....	59
<i>Fator de purificação das enzimas.....</i>	59
<i>Atividade enzimática.....</i>	60
CONCLUSÕES.....	62
REFERÊNCIAS.....	62
CAPÍTULO 5 – MICROBIOTA, VISCOSIDADE E pH DO CONTEUDO ILEAL EM FRANGOS ALIMENTADOS COM SORGO EM SUBSTITUIÇÃO AO MILHO DA RAÇÃO.....	66
RESUMO.....	66
INTRODUÇÃO.....	67
MATERIAL E MÉTODOS.....	69
Contagem bacteriana.....	71
<i>Contagem de colônias de Clostridium perfringens.....</i>	71
Viscosidade e pH do conteúdo ileal.....	72
Análise estatística.....	72
RESULTADOS.....	73
DISCUSSÃO.....	74
CONCLUSÕES.....	76
REFERÊNCIAS.....	76

AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO ZOOTÉCNICO, DA FUNÇÃO DA MUCOSA INTESTINAL E DA MICROBIOTA ILEAL QUANDO DA SUBSTITUIÇÃO DO MILHO PELO SORGO NA RAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE

RESUMO- Experimento 1: Foram avaliados os efeitos da substituição do milho pelo sorgo na ração para frangos de corte sobre o desempenho, o rendimento de carcaça e partes, a morfometria (densidade de vilos, altura dos vilos, profundidade das criptas, número de células caliciformes e índice mitótico nas criptas) e a integridade da mucosa do duodeno, jejuno e íleo, e a atividade das enzimas de membrana (aminopeptidase, fosfatase alcalina e maltase) da mucosa do jejuno. Foram utilizados 792 pintainhos de um dia machos, Cobb-500, distribuídos ao acaso em quatro tratamentos (0, 50, 75 ou 100% de substituição do milho pelo sorgo do 1º ao 42º dia) e seis repetições. No 7º, 21º e 42º dia o peso dos frangos e as sobras das rações foram aferidas, e foram obtidas amostras do intestino delgado de um frango por repetição. Experimento 2: Foi avaliado o efeito da substituição total do milho pelo sorgo sobre as Enterobactérias, *Lactobacillus spp*, *Clostridium perfringens* (Log₁₀ UFC/g), a viscosidade e o pH do conteúdo ileal. Cem pintainhos foram distribuídos em dois grupos e alimentados com rações à base de milho ou sorgo do 1º ao 42º dia de idade. Concluiu-se desses experimentos que a substituição do milho da ração por sorgo, na fase inicial (1 a 21 dias), não altera o desempenho e a função da mucosa do intestino delgado dos frangos. A substituição parcial do milho pelo sorgo (50 ou 75%) durante a fase total de criação (1 a 42 dias) melhora a conversão alimentar dos frangos. A substituição total (100%), até os 42 dias, prejudica a estrutura dos vilos do duodeno e jejuno, mas, diminui a colonização por *Clostridium perfringens* no íleo e a viscosidade do conteúdo ileal. A substituição de 75 ou 100% até os 42 dias diminui a atividade de aminopeptidase e maltase. O rendimento de carcaça e partes, a atividade da fosfatase alcalina intestinal e as populações bacterianas de Enterobactérias e *Lactobacillus spp.*, não são afetados pelos tratamentos.

Palavras-chave: Enzimas de membrana, microbiota ileal, milho, morfometria intestinal, sorgo, taninos.

EVALUATION OF PERFORMANCE, THE FUNCTION OF INTESTINAL MUCOSA AND ILEAL MICROBIOTA AFTER THE REPLACEMENT OF CORN BY SORGHUM IN CHICKEN DIET

ABSTRACT- Experiment 1: The effects of substitution of corn by sorghum in diets for broiler chickens on performance, carcass and parts (breast and thigh+drumstick), morphology (density of villi, villous height, depth crypts, number of goblet cells and mitotic index in the crypts) and integrity (score of epithelial loss) of the duodenum, jejunum and ileum mucosa, and the activity of membrane enzymes (aminopeptidase, intestinal alkaline phosphatase, and maltase) of the jejunum. We used 792 day-old chicks male Cobb-500, were randomly assigned to four treatments (0, 50, 75 or 100% replacement of corn by sorghum 1 to 42 days) and six replications. At 7, 21 and 42 days the weight of the chickens and the remains of the diets were measured, and samples were collected from the small intestine of a chicken for replication. Experiment 2: The effect of total substitution of corn by sorghum on the counts of Enterobacteriaceae, *Lactobacillus spp* and *Clostridium perfringens*, viscosity and pH of ileal contents. One hundred chicks were divided into two groups and fed diets based on corn or sorghum, 1 to 42 days of age. From the results of these experiments it was concluded that the substitution of corn by sorghum in the initial phase (1 to 21 days) does not affect the performance and function of small intestinal mucosa of chickens. The partial substitution of corn by sorghum (50 or 75%) during the total period (1 to 42 days) seems to improve feed conversion of chickens. Total substitution (100%), up to 42 days, affect the structure of the villi of the duodenum and jejunum, but reduced colonization by *Clostridium perfringens* in the ileum and the viscosity of ileal contents. The replacement of 75 or 100% up to 42 days reduces the activity of aminopeptidase and maltase. The carcass and parts, the activity of intestinal alkaline phosphatase and the count of Enterobacteriaceae and *Lactobacillus spp*, are not affected by treatments.

Keywords: corn, ileal microbiota, membrane enzymes, intestinal morphology, sorghum, tannins.

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

Introdução

O milho é o principal ingrediente utilizado nas rações formuladas para aves e suínos, sendo recomendada uma inclusão de até 65% na ração de frangos de corte (ROSTAGNO, *et al.*, 2005). Por isso, entre 70 e 80% da produção de milho no Brasil é destinada para este fim (GARCIA *et al.*, 2006). Entretanto, o sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) é um cereal que, por sua qualidade nutricional, tem substituído ao milho principalmente quando seu preço apresenta-se 15 a 20% inferior ao do milho. No entanto, de forma prática, em rações calculadas a custo mínimo, o milho não é completamente substituído pelo sorgo (ROSTAGNO *et al.*, 2001), devido aos efeitos adversos causados sobre a pigmentação da pele e carne dos frangos, ao menor teor dos aminoácidos lisina, metionina e treonina, menor digestibilidade de proteína e à presença de fatores antinutricionais, como os taninos. Esses fatores limitam o nível prático de inclusão do sorgo a 30% (ROSTAGNO *et al.*, 2005).

Em relação à digestibilidade do amido, tem sido observado que os grânulos de amido do sorgo e do milho são semelhantes em tamanho, forma e composição, sendo que a principal diferença entre os dois cereais está no tipo e distribuição das proteínas ao redor do amido do endosperma. A região periférica do endosperma do sorgo está constituída por elevado conteúdo protéico, formando uma camada resistente, que prejudica a degradação física e enzimática do amido (ROONEY & PFLUGFELDER, 1986). Nesse sentido, ANTUNES *et al.* (2006) observaram valores menores de energia metabolizável aparente e verdadeira em frangos de corte quando alimentados com rações contendo grãos de sorgo de genótipos que apresentaram endosperma de textura dura comparado com grãos de genótipos com endosperma de textura intermediária ou macia.

Na década de 1990 foi desenvolvido o cultivar de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) altamente digestível, que apresenta uma taxa de digestibilidade de proteína 10% maior em relação ao sorgo comum e adicionalmente apresenta maior teor de amido, sendo economicamente viável sua inclusão em proporções de 25 a 60% dependendo da fase de criação (DOWLING *et al.*, 2002). NYANOR *et al.* (2007) observaram que a digestibilidade ileal aparente da matéria seca, da proteína, e da energia não foi diferente em frangos alimentados com dietas contendo milho ou sorgo de alta digestibilidade. No entanto, a

retenção aparente de matéria seca, energia e nitrogênio foi maior nos frangos alimentados com milho em relação aos alimentados com sorgo de alta digestibilidade, e nestes últimos por sua vez, foi maior a retenção em relação aos alimentados com sorgo comum. O ganho de peso, o consumo de ração e a eficiência produtiva não diferiram nos frangos alimentados com rações contendo milho ou sorgo de alta digestibilidade e comum (NYANOR *et al.*, 2007).

Efeitos antinutricionais dos taninos

O sorgo contém vários compostos fenólicos que podem afetar a cor, a aparência e qualidade nutricional da ração. Esses compostos podem ser ácidos fenólicos, flavonóides e taninos. Os taninos hidrolisáveis podem ser degradados no trato digestório dos animais a ácido gálico, glicose e outros monossacarídeos. Em contraste, os taninos condensados ou proantocianidinas são polímeros de flavonóides, contendo uniões aromáticas, e não podem ser quebradas no intestino (AGOSTINI-COSTA, 2003). O grande tamanho da molécula de taninos impede a absorção direta pela mucosa intestinal. O grau de toxicidade do tanino depende do seu tipo, se hidrolisável ou condensado, das suas proporções na dieta, dos produtos finais da hidrólise no intestino e da espécie animal (QUINTERO PINTO, 2000).

Os taninos condensados estão ligados à coagulação e precipitação de enzimas (proteínas) e alguns minerais, formação de complexos com os carboidratos da dieta, inibição da atividade de algumas enzimas digestivas, como a tripsina e a α -amilase. Quando ingeridos em grandes quantidades, reduzem a taxa de crescimento, uma vez que diminui o aproveitamento energético e protéico da dieta, levando a maior excreção de nitrogênio nas fezes como resultado da interação tanino-proteínas formada pelas múltiplas pontes de hidrogênio. Também tem sido observada hipersecreção de enzimas endógenas, que ocasiona perda endógena de aminoácidos e minerais. Os taninos condensados podem reduzir a digestibilidade de aminoácidos sulfurados, causar necroses e alterações na forma dos vilos da mucosa intestinal e aumentar o número de células calciformes (MITJAVILA *et al.*, 1977; CHANG *et al.*, 1994).

Os taninos hidrolisáveis também podem interagir com proteínas, no entanto, formam uniões menos estáveis em comparação com as formadas com taninos

condensados. A inclusão de taninos hidrolisáveis na ração de frangos de corte ocasiona alterações na mucosa intestinal sem prejudicar o desempenho e as características da carcaça (JAMROZ *et al.*, 2009). Pela inclusão de 1000 mg de tanino hidrolizável por kg de ração verificou-se a ativação da imunidade local, com infiltração do tecido conectivo sub-epitelial por numerosos macrófagos, mastócitos, neutrófilos e linfócitos (JAMROZ *et al.*, 2009). Os autores descreveram, ainda, diminuição do número de células em proliferação nas criptas e enterócitos mostrando sinais de degradação.

Os ácidos fenólicos não têm efeito adverso na qualidade nutricional, porém podem causar cor indesejável aos alimentos quando processados sob condições alcalinas. Os flavonóides, a exemplo dos ácidos fenólicos, também não causam problemas na digestibilidade e palatabilidade do sorgo (BUTULO, 2003).

Efeitos benéficos dos taninos

De outro lado, também tem sido atribuídos efeitos benéficos da presença de taninos nas rações. No trato digestório, os taninos podem formar uma fina camada de proteínas insolúveis e desnaturadas que cobrem a superfície mucosa intestinal e também pode cobrir a superfície da membrana celular bacteriana. A espessura desta camada depende da concentração de taninos da dieta. A este fenômeno, atribuem-se funções de proteção e inibição da colonização da mucosa intestinal por bactérias patogênicas quando da presença de quantidades controladas de taninos na dieta. Nesse sentido, no trabalho de JAMROZ *et al.* (2009) foi verificado que a inclusão de tanino hidrolizável na proporção de 250 mg por Kg de ração (ração à base de milho/trigo/cevada e soja) reduz a contagem de *Escherichia coli* e outras bactérias coliformes no intestino delgado de frangos de 28 dias. Outro efeito benéfico observado pela inclusão de taninos hidrolisáveis (250 e 500 mg/kg) na dieta foi a redução da umidade da cama, que os autores atribuíram a um possível melhor balanço hídrico no lúmen intestinal (JAMROZ *et al.*, 2009).

Apesar dos taninos não serem absorvidos através da mucosa intestinal, outros compostos fenólicos presentes no sorgo podem ser absorvidos e atuar como antioxidantes. Nesse sentido, DU *et al.* (2002) demonstraram que a inclusão de 10% de

sorgo com baixo ou alto conteúdo de taninos melhoraram a estabilidade do processo oxidativo e da cor da carne de peito e pernas cozida e armazenada, sendo maior a estabilidade quando foi incluído sorgo com alto teor de taninos.

Classificação do sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) pelo conteúdo de taninos

O sorgo classificava-se de acordo com o teor de taninos condensados em: sorgo alto tanino (1,3 a 3,6%) ou sorgo baixo tanino (0,1 a 0,7%) (MYER *et al.*, 1986), e vários dos estudos encontrados na literatura científica, avaliando a utilização do sorgo nas rações de aves e suínos, também consideram esta classificação (GARCIA *et al.*, 2005 b; CAMPOS, 2006; BOZUTTI, 2009). No entanto, atualmente as variedades de sorgo bicolor utilizado para nutrição de monogástricos são consideradas como variedades de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) com ou sem taninos, sendo o sorgo com teor de tanino inferior a 0,7% considerado sem taninos (SCHEUERMANN, 1998). GARCIA *et al.* (2005 a), realizaram um estudo utilizando sorgo com tanino (cultivar AG3002) e sorgo sem tanino (cultivar SAARA) que continham teores de taninos de 1,89% e 0,49%, respectivamente. Dessa forma, as denominações sorgo baixo tanino ou sem taninos podem ser consideradas equivalentes, e igualmente, as denominações sorgo alto tanino ou com tanino.

Inclusão de sorgo na ração de monogástricos

Vários estudos têm demonstrado que a inclusão de sorgo baixo tanino ou sem tanino na ração, de 25 até 100% de substituição do milho, não prejudica as variáveis de desempenho (ganho de peso, consumo de ração, conversão alimentar, índice de eficiência produtiva e viabilidade criatória), o rendimento da carcaça e das partes, nem na composição química e sensorial da carne dos frangos de corte (DU *et al.*, 2002; GARCIA *et al.*, 2005 b; CAMPOS, 2006; BOZUTTI, 2009). De outro lado, MARQUES *et al.* (2007) observaram que o fornecimento de dietas com substituição total do milho por sorgo sem tanino para suínos na fase de crescimento diminui a digestibilidade da matéria seca, da proteína bruta e da energia bruta comparado com dietas à base de milho. No entanto, a substituição de 50% do milho por sorgo sem tanino não afeta a digestibilidade da dieta e o metabolismo dos animais.

De acordo com FAQUINELLO *et al.* (2004), as cordornas japonesas apresentam maior resistência aos taninos condensados do sorgo que as galinhas poedeiras. Os autores demonstraram que o milho da dieta pode ser substituído de 20 até 80% por sorgo com alto teor de tanino (1,44% tanino condensado), sem prejudicar o consumo de alimento, a conversão alimentar, o peso e a qualidade interna dos ovos (unidades Haugh), a espessura e o peso da casca.

No presente trabalho foram conduzidos dois experimentos, o primeiro para estudar os efeitos da porcentagem de 0, 50, 75 ou 100% de substituição do milho por sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) na ração sobre o desempenho, as características da carcaça, a morfometria e a integridade da mucosa do intestino delgado e a atividade das enzimas de membrana da mucosa do jejuno. E o segundo para avaliar o efeito da substituição total do milho pelo sorgo sobre as populações bacterianas (Enterobactérias, *Lactobacillus* spp., *Clostridium perfringens*), a viscosidade e o pH do conteúdo ileal, em frangos de corte.

REFERÊNCIAS

AGOSTINI-COSTA, T. S. Determinação de tanino em pedúnculo de caju: método da vanilina versus método do butanol ácido. **Química Nova**, v. 5, p. 763-765, 2003.

ANTUNES R.C.; RODRIGUEZ, N.M.; GONÇALVES, L.C.; RODRIGUES, J.A.S.; BAIÃO, N.C.; PEREIRA, L.G.R.; LARA, L.J. Valor nutritivo de grãos de sorgo com diferentes texturas do endosperma para frangos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 5, p. 877-883, 2006.

BOZUTTI, S.R.A. **Avaliação de ingredientes alternativos na alimentação de frangos de corte com a adição de enzimas**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo. Pirassununga, 2009.

BUTULO, J., E. Qualidade de Ingredientes de Alimentação Animal. CBNA, 2003.

CAMPOS, D.M.B. **Efeito do sorgo sobre o desempenho zootécnico, características da carcaça e o desenvolvimento da mucosa intestinal de frangos**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

CHANG, J.J., BAILEY, J. W., COLLINS, J. L. Dietary tannins from cowpeas and tea transiently alter apparent calcium absorption and utilization of protein in rats. **Journal of Nutrition**, v.124, p.283-88, 1994.

DOWLING, L. F., ARNDT, C., HAMAKER, B. R. Economic Viability of high digestibility sorghum as feed for market broilers. **Agronomy Journal**, v. 94, p. 1050-1058, 2002.

DU, M.; CHERIAN, G.; STITT, P.A.; AHN, D.U. Effect of Dietary Sorghum cultivars on the Storage Stability of Broiler Breast and Thigh Meat. **Poultry Science**. V. 81, p. 1385–1391, 2002.

FAQUINELLO, P.; MURAKAMI, A.E.; CELLA, P.S.; FRANCO, J.R.G.; SAKAMOTO, M.I.; BRUNO, L.D.G. High tannin sorghum in diets of Japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*). **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 6, n. 2, p -81-86 , 2004.

GARCIA, R.G.; MENDES, A.A.; KLINK, U.P.; ALMEIDA PAZ, I.C.L.; TAKAHASHI, S.E.; PELÍCIA, K.C.; KOMIYAMA, M.; QUINTEIRO, R.R. Digestibilidade de rações contendo sorgo com e sem tanino em frangos de corte colostomizados submetidos a três temperaturas ambiente **ARS Veterinária**, v, 21, n. 2, p. 257-264, 2005 a.

GARCIA, R. G.; MENDES A. A.; COSTA, C.; PAZ, I. C. L. A.; TAKAHASHI, S. E.; PELÍCIA, K. P.; KOMIYAMA, C. M.; QUINTEIRO, R. R. Desempenho e qualidade de carne de corte alimentados com diferentes níveis de sorgo em substituição ao milho. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.5, p.634-643, 2005 b.

GARCIA, J.C.; MATTOSO, M.J.; DUARTE, J.O.; CRUZ, J.C. Aspectos econômicos da produção e utilização do milho. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Circular técnica 74, EMBRAPA, Sete Lagoas, MG, 2006.

JAMROZ, D.; WILICZKIEWICZ, A.; SKORUPIŃSKA, J.; ORDA, J.; KURYSZKO, J.; TSCHIRCH, H. Effect of sweet chestnut tannin (SCT) on the performance, microbial status of intestine and histological characteristics of intestine wall in chickens. **British Poultry Science** v. 50, n. 6, p. 687-699, 2009.

MARQUES, B.M.F.P.P.; ROSA, G.B.; HAUSCHILD, L.; CARVALHO, A.d'A.; LOVATTO, P.A. Substituição de milho por sorgo baixo tanino em dietas para suínos: digestibilidade e metabolismo. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.3, p.767-772, 2007.

MITJAVILA, S., LACOMBE, C., CARRERA, G., DERACHE, R. Tannic acid and oxidized tannic acid on the functional state of rat intestinal epithelium. **Journal of Nutrition**. v. 107, 2113-2121. 1977.

MYER, R.O.; GORBET, D.W.; COMBS, G.E. Nutritive value of high- and low-tannin grain sorghums harvested and stored in the high-moisture state for growing-finishing swine. **Journal of Animal Science**, v. 62, p.1290-1297, 1986.

NYANNOR, E.K.D.; ADEDOKUN, S.A.; HAMAKER, B.R.; EJETA, G.; ADEOLA, O. Nutritional evaluation of high-digestible sorghum for pigs and broiler chicks. **Journal of Animal Science**, v. 85, p. 196-203. 2007

QUINTERO PINTO, L. G. **Tanino em rações para peixes tropicais**. p55. Dissertação (mestrado em Aqüicultura) – Centro de Aqüicultura, UNESP (Universidade Estadual Paulista), Jaboticabal, 2000.

ROONEY, L.W.; PFLUGFELDER, R.L. Factors affecting starch digestibility with special emphasis on sorghum and corn. **Journal of Animal Science**, v. 63, p. 1607-1623, 1986.

ROSTAGNO H.S.; ALBINO, L.F.T; TOLEDO, R.S. Utilização de sorgo nas rações de aves e suínos. Artigo Técnico Polinutri Junho/2001. http://www.polinutri.com.br/conteudo_artigos_anteriores_junho.htm. Acesso 26/01/2010

ROSTAGNO H.S.; ALBINO, L.F.T; DONZELE, J.L.; GOMES, P.C.; OLIVEIRA R.F.; LOPES D.C.; FERREIRA A.S.; BARRETO, S.L.T. Tabelas brasileiras para aves e suínos. Composição de alimentos e exigências nutricionais. 2ª edição. Ed: Rostagno H.S. UFV-Departamento de Zootecnia, Viçosa-MG, 2005.

SCHEUERMANN, G.N. Utilização do sorgo em rações para frangos de corte. **Instrução técnica para o avicultor área de comunicação empresarial**. Embrapa suínos e aves, 1998.

CAPÍTULO 2 – DESEMPENHO ZOOTÉCNICO E RENDIMENTO DE CARÇAÇA E PARTES DE FRANGOS DE CORTE EM FUNÇÃO DA SUBSTITUIÇÃO DO MILHO PELO SORGO DA RAÇÃO

RESUMO

Um experimento foi conduzido para estudar o efeito da porcentagem de substituição do milho por sorgo na ração para frangos de corte sobre o desempenho zootécnico e o rendimento da carcaça e das partes. Foram utilizados 792 pintos de um dia machos, Cobb-500, distribuídos em delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos (0, 50, 75 ou 100% de substituição do milho pelo sorgo) e seis repetições. Os frangos receberam as rações experimentais do 1º ao 42º dia e o consumo foi *ad libitum*. As aves e as sobras de ração nos comedouros foram pesadas no 7º, 21º e 42º dia e foram determinados o consumo de ração, o ganho de peso, a conversão alimentar e o índice de eficiência produtiva. Aos 42 dias foram sacrificadas duas aves por unidade experimental para avaliação do rendimento de carcaça, peito e coxa+sobrecoxa. Não houve efeito significativo ($p>0,05$) do nível de substituição de milho pelo sorgo sobre o consumo de ração, o ganho de peso e a conversão alimentar nos períodos de 1 a 7 e 1 a 21 dias. No período de 1 a 42 dias, houve efeito quadrático na conversão alimentar em função do tratamento, sendo pior quando os frangos foram alimentados com a ração contendo 100% ou 0% de substituição do milho em comparação com as rações contendo 50 ou 75% de substituição ($p<0,05$). O rendimento da carcaça e das partes não foi afetado significativamente pela substituição do milho pelo sorgo na ração ($p>0,05$). Concluiu-se que a substituição parcial ou total do milho da ração por sorgo, na fase inicial de criação (1 a 21 dias), não altera o desempenho dos frangos. A substituição parcial, de 50 ou 75%, do milho pelo sorgo durante a fase total de criação (1 a 42 dias) melhora a conversão alimentar dos frangos. O rendimento da carcaça e das partes não é comprometido pela proporção de cereais, milho ou sorgo, na ração.

Palavras-Chave: Frangos de corte, sorgo, tanino, conversão alimentar.

INTRODUÇÃO

Estudos realizados por vários pesquisadores (GARCIA *et al.* 2005; BARCELLOS *et al.*, 2006; CAMPOS, 2006; BOZUTTI, 2009) mostram que o uso do sorgo sem tanino (*Sorghum bicolor* L. Moench) como substituto ao milho, não afeta o desempenho zootécnico de frangos e suínos. O sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) é uma espécie adaptada para o cultivo em regiões onde ocorrem com frequência períodos de seca que limitam a produção de grãos e forragens. Em relação ao milho, o sorgo apresenta maior adaptabilidade às condições edafoclimáticas predominantes de alguns Estados, caracterizadas por distribuição irregular de chuvas, solos rasos e pobres, que são fatores limitantes para o cultivo do milho.

Cultivares de sorgo altamente digestível têm mostrado taxas de digestibilidade 10% maiores em relação ao sorgo comum e maior teor de amido, sem diferenças na digestibilidade dos nutrientes em relação às rações à base de milho, quase igualando o valor nutricional do milho. Dessa forma, a inclusão entre 25 e 60% na ração de sorgo de alta digestibilidade pode ser realizada sem restrições (DOWLING *et al.*, 2002), salvo pela exigência do mercado de carne e pele pigmentados. No entanto, quando utilizado sorgo comum sem tanino, observam-se algumas diferenças na digestibilidade e retenção dos nutrientes e nos processos de proliferação e degradação dos enterócitos na mucosa do intestino delgado em frangos e suínos que geralmente não afetam o desempenho, mas, limitam seu uso, sugerindo a substituição do milho pelo sorgo em até 50% (SANTOS *et al.*, 2006; MARQUES *et al.*, 2007; JAMROZ *et al.*, 2009).

Foi conduzido um experimento com o objetivo de avaliar o efeito da substituição do milho pelo sorgo na ração sobre o desempenho produtivo e o rendimento da carcaça e partes de frangos de corte e, posteriormente, relacionar os resultados com os efeitos dos tratamentos sobre a morfologia e função da mucosa intestinal.

MATERIAL E MÉTODOS

Desenho experimental, aves e dietas

Um experimento foi conduzido no setor de Avicultura do Departamento de Zootecnia, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal-SP. Foram utilizados 792 frangos machos, Cobb-500, com um dia de idade, procedentes de incubatório comercial¹, que foram distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado. Na chegada dos pintainhos foi realizada pesagem de uma amostra do lote para a determinação do peso médio e foram montadas unidades experimentais com animais pesando em média $42,48 \pm 0,56$ g. Os tratamentos consistiram em quatro dietas a base de milho e/ou sorgo e farelo de soja com substituições de 0, 50, 75 e 100% do milho pelo sorgo, cada tratamento com seis repetições de 33 aves, totalizando 24 unidades experimentais. As aves foram alojadas em galpão com piso de alvenaria coberto com casca de arroz, e dividido em compartimentos de 3,2 x 1,4 metros. As aves foram criadas sob temperatura termoneutra de acordo com a guia de manejo de frango de corte da linhagem Cobb (2008), e o galpão foi mantido com iluminação contínua. As rações experimentais foram isonutrientes e isoenergéticas dentro de cada fase de criação: inicial (1-21 dias de idade) e crescimento (22-42 dias de vida) e foram formuladas seguindo a composição dos ingredientes e os níveis nutricionais indicados por ROSTAGNO *et al.* (2005) (Tabela 1). A ração e a água foram fornecidas *ad libitum* durante o período de criação.

O sorgo utilizado no presente experimento teve 5,64 mg de catequina por grama de sorgo (0,56%). O conteúdo total de tanino foi analisado pelo método da Vanilina – HCl, este método baseia-se na reação da leucoantocianidina (catequina) e proantocianidina (tanino condensado) com vanilina na presença de HCl, é um método específico para a determinação de tanino condensado e alguns flavonóides. Dessa forma, o sorgo utilizado no presente trabalho classificou-se como sorgo sem tanino.

As aves foram vacinadas no quarto dia de idade contra a Doença Infecciosa da Bursa via ocular, no sétimo dia contra a Doença de Newcastle via oral, junto à água ingerida, e no 18º dia foram re-vacinadas contras as duas doenças, via oral junto à água

¹ Sertanejo Alimentos S/A - Ipiгуá, SP.

ingerida. As aves foram mantidas em jejum hídrico durante o período de uma hora antes da vacinação via oral.

Tabela 1. Composição centesimal, conteúdo de nutrientes e valor energético das rações experimentais, para fase inicial de 1 a 21 dias e de crescimento de 21 a 42 dias.

Ingredientes %	INICIAL				CRESCIMENTO			
	0%	50%	75%	100%	0%	50%	75%	100%
Milho	51,333	25,666	12,883	-	58,666	29,333	14,666	-
Sorgo ¹	-	25,666	38,499	51,333	-	29,333	43,999	58,666
Farelo de Soja, 45	40,276	39,606	39,272	38,937	32,211	31,454	31,072	30,689
Óleo de soja	3,839	4,531	4,877	5,222	5,078	5,866	6,262	6,656
Fosfato bicálcico	1,873	1,865	1,862	1,858	1,606	1,597	1,593	1,589
Calcário calcítico	0,912	0,921	0,925	0,930	0,827	0,837	0,842	0,848
Sal Comum	0,511	0,511	0,511	0,511	0,466	0,466	0,466	0,466
DL-metionina	0,295	0,319	0,330	0,342	0,226	0,253	0,266	0,280
L-lisina	0,180	0,215	0,232	0,249	0,165	0,204	0,224	0,244
Premix ²	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100
Cloreto de colina	0,070	0,070	0,070	0,070	0,070	0,070	0,070	0,070
L-treonina	0,061	0,074	0,081	0,088	0,035	0,050	0,058	0,066
Coxistac	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050
Caulim	0,500	0,406	0,358	0,310	0,500	0,386	0,332	0,277
Total	100	100	100	100	100	100	100	100
Composição Calculada								
Energia metabolizável (Kcal/Kg)	3005	3005	3005	3005	3175	3175	3175	3175
Proteína bruta (%)	22,87	22,87	22,87	22,87	19,75	19,75	19,75	19,75
Cálcio (%)	0,92	0,92	0,92	0,92	0,81	0,81	0,81	0,81
Fósforo disponível (%)	0,46	0,46	0,46	0,46	0,40	0,40	0,40	0,40
Sódio (%)	0,22	0,22	0,22	0,22	0,20	0,20	0,20	0,20
Lisina digestível (%)	1,28	1,28	1,28	1,28	1,07	1,07	1,07	1,07
Metionina+cistina digestível (%)	0,91	0,91	0,91	0,91	0,77	0,77	0,77	0,77
Treonina digestível (%)	0,83	0,83	0,83	0,83	0,70	0,70	0,70	0,70

¹ Determinação de tanino condensado pelo método de vanilina-HCl: 5,64 mg de catequina por grama de sorgo.

² Níveis de garantia por quilograma do produto: Vitamina A 7000000 UI; vitamina D 3000000 UI; vitamina E 25000 mg; vitamina K 980 mg; vitamina B₁ 1780 mg; vitamina B₂ 9600 mg; vitamina B₆ 3465 mg; vitamina B₁₂ 10000 mcg; biotina 160 mg; pantotenato de cálcio 9500 mg; niacina 34650 mg; manganês 76260 mg; zinco 91250 mg; cobre 10000 mg; antioxidante 100 mg.

As aves e as sobras de ração nos comedouros foram pesadas no 7°, 21° e 42° dia de vida dos frangos, permitindo determinar o consumo de ração (CR), o ganho de peso (GP) e a conversão alimentar (CA= CR/GP). O índice de eficiência produtiva (IEP) foi calculado por meio da fórmula: $[(GMD \times VC) / (CA \times 10)]$, onde GMD corresponde ao ganho de peso médio diário e VC à viabilidade criatória aos 42 dias (VC=100% - %mortalidade). Aos 42 dias foram sacrificadas duas aves por unidade experimental para avaliação do rendimento de carcaça inteira, peito e coxa+sobrecoxa. O peso da carcaça foi expresso como uma porcentagem do peso da ave viva em jejum de 11 horas. O peso das partes foi expresso como uma porcentagem do peso absoluto da carcaça.

Análise estatística

Os dados foram verificados quanto à presença de dados discrepantes (*Box-&Whisker plot*), e testaram-se as pressuposições de normalidade dos erros estudentizados (teste de Cramer-Von-Mises) e de homogeneidade das variâncias (teste de Brown-Forsythe) (LITTELL *et al.*, 2002). Depois de constatada a não violação dessas pressuposições, os dados foram submetidos à análise de variância e, em caso de diferença significativa, Os graus de liberdade de tratamentos foram desdobrados em efeito linear, quadrático e cúbico. As análises foram realizadas usando o procedimento *General Linear Models* do programa SAS[®] versão 9.0 (SAS Institute, 2002).

RESULTADOS

Os resultados da análise de variância das variáveis de desempenho zootécnico encontram-se na Tabelas 2. Não houve efeito significativo ($p>0,05$) do nível de substituição de milho pelo sorgo da ração sobre o consumo de ração, o ganho de peso e a conversão alimentar nos períodos de 1 a 7 e 1 a 21 dias de idade. No período de 1 a 42 dias não houve efeito significativo do tratamento sobre o consumo de alimento, o ganho de peso e o índice de eficiência produtiva ($p>0,05$). A conversão alimentar aos 42 dias apresentou um efeito quadrático ($p<0,05$), sendo observados maiores valores, pior conversão, quando os frangos foram alimentados com a ração contendo 100% de substituição do milho pelo sorgo, seguida pela que conteve 0% de substituição. As melhores conversões foram observadas nos frangos alimentados com as rações contendo 75% ou 50% de substituição. O índice de eficiência produtiva (Tabela 2) e o rendimento da carcaça e das partes (Tabela 3) aos 42 dias não foram afetados pela substituição do milho pelo sorgo na ração ($p>0,05$).

Tabela 2. Médias \pm erro padrão e resultados da análise de variância para consumo de ração (CR), ganho de peso (GP) e conversão alimentar (CA) de frangos de corte alimentados com rações contendo diferentes porcentagens de substituição de milho pelo sorgo (0, 50, 75 ou 100%), nos períodos de 1 a 7, 1 a 21 e 1 a 42 dias de idade. O índice de eficiência produtiva (IEP) foi avaliado para o período de 1 a 42 dias de idade.

Período (dias)	Variável	Porcentagem de substituição de milho por sorgo na ração (%)				Valor P	CV(%)
		0	50	75	100		
1 a 7	CR (g)	166 \pm 2,60	165 \pm 2,72	160 \pm 2,11	163 \pm 1,01	0,30	3,30
	GP (g)	146 \pm 1,04	142 \pm 2,45	141 \pm 1,86	140 \pm 1,83	0,10	3,08
	CA	1,13 \pm 0,01	1,16 \pm 0,01	1,14 \pm 0,02	1,16 \pm 0,02	0,40	3,16
1 a 21	CR (g)	1238 \pm 11,7	1232 \pm 8,48	1198 \pm 28,4	1213 \pm 21,2	0,53	3,84
	GP (g)	955 \pm 5,90	932 \pm 15,6	929 \pm 7,18	938 \pm 8,50	0,27	2,62
	CA	1,29 \pm 0,01	1,32 \pm 0,02	1,29 \pm 0,03	1,29 \pm 0,02	0,53	3,58
1 a 42	CR (g)	4643 \pm 17,7	4649 \pm 29,4	4580 \pm 17,4	4634 \pm 39,6	0,30	1,46
	GP (g)	2765 \pm 16,2	2804 \pm 17,5	2771 \pm 18,7	2729 \pm 24,8	0,09	1,73
	CA	1,68 \pm 0,01	1,66 \pm 0,01	1,65 \pm 0,01	1,70 \pm 0,01	0,02*	1,47
	IEP	376 \pm 3,98	397 \pm 3,07	383 \pm 5,45	371 \pm 10,29	0,05	4,07

Valor P, resultados da análise de variância (5%). CV(%) = Coeficiente de variação.

n = seis repetições por tratamento.

*Desdobramento dos graus de liberdade de tratamentos em efeitos:

linear ($p=0,26$), quadrático ($p=0,003$) e cúbico ($p=0,48$), da CA no período de 1 a 42 dias.

Tabela 3. Médias \pm erro padrão e resultados da análise de variância para o rendimento da carcaça e das partes (peito e coxa+sobrecoxa) de frangos de corte na idade de abate (42 dias) que foram alimentados com rações contendo diferentes porcentagens de substituição de milho pelo sorgo (0, 50, 75 ou 100%).

	Porcentagem de substituição de milho por sorgo na ração (%)				Valor P	CV(%)
	0	50	75	100		
Peso Absoluto (g)						
Carcaça	2001 \pm 13	2017 \pm 27	1963 \pm 23	1949 \pm 27	0,14	3,93
Peito	755 \pm 12	768 \pm 16	745 \pm 18	742 \pm 14	0,64	6,81
Coxa+sobrecoxa	540 \pm 9	546 \pm 6	545 \pm 6	532 \pm 6	0,45	4,38
Peso Relativo (%)*						
Carcaça	74 \pm 0,63	75 \pm 0,74	73 \pm 0,53	73 \pm 0,53	0,13	2,82
Peito	38 \pm 0,56	38 \pm 0,52	38 \pm 0,68	38 \pm 0,48	0,97	5,10
Coxa+sobrecoxa	27 \pm 0,45	27 \pm 0,36	28 \pm 0,42	27 \pm 0,36	0,54	5,05

Valor P, resultados da análise de variância (5%). CV(%) = Coeficiente de variação.

n = seis repetições por tratamento.

* Da carcaça: peso relativo ao peso da ave viva em jejum de 11 horas, das partes: peso relativo ao peso absoluto da carcaça.

DISCUSSÃO

Segundo GARCIA *et al.* (2005), CAMPOS (2006) e BOZUTTI (2009), a substituição do milho pelo sorgo sem tanino pode ser recomendada, desde que o preço do sorgo seja economicamente favorável em relação ao milho e que seja adicionado um pigmento natural ou sintético na ração para alcançar a coloração desejável da carcaça e da pele dos frangos, de acordo às exigências do mercado interno ou externo.

No presente trabalho foi observado que nas fases de 1 a 7 e de 1 a 21 dias de idade, não houve efeitos dos tratamentos sobre nenhuma das variáveis avaliadas para o desempenho e, na fase de 1 a 42 dias o consumo de ração, o ganho de peso e o índice de eficiência produtiva também não foram afetados pelos tratamentos. Contudo, nesse último período, foi observado que a conversão alimentar apresentou um efeito quadrático em função das proporções de milho e sorgo na ração, sendo que foi pior quando os frangos foram alimentados com rações contendo 0 ou 100% de substituição do milho pelo sorgo e melhor quando houve substituição parcial do milho pelo sorgo (de 50 ou 75%). Esse resultado parece indicar um efeito benéfico da inclusão de sorgo na ração substituindo parcialmente ao milho, em comparação com dietas sem sorgo. Todavia, a substituição total do milho pelo sorgo levou ao valor mais alto (pior) de conversão alimentar para o período de 1 a 42 dias (Tabela 2). MARQUES *et al.* (2007) observaram que a substituição parcial (50%) do milho pelo sorgo em dietas para suínos não influi na digestibilidade dos nutrientes e no metabolismo dos animais, mas a substituição total prejudica estas variáveis, porque diminui os coeficientes de digestibilidade aparente da matéria seca, a proteína bruta e a energia bruta, aumenta a excreção de nitrogênio e energia nas fezes e diminui a absorção de nitrogênio.

O sorgo apresenta valor nutricional similar ao do milho. No entanto, fatores como a presença de taninos e a densidade e rigidez das proteínas distribuídas ao redor do amido do endosperma do grão de sorgo, podem alterar a digestibilidade e na absorção dos nutrientes, e em consequência o desempenho dos frangos pode ser afetado (ANTUNES *et al.*, 2006; JAMROZ *et al.*, 2009). JAMROZ, *et al.* (2009) observaram que a inclusão de taninos hidrolizáveis em doses baixas (0,025, 0,05%) não altera a mucosa do intestino delgado, no entanto, a inclusão de 0,1% diminui a taxa de proliferação e aumenta os processos de degradação dos enterócitos. Contudo, os efeitos observados na mucosa intestinal não representaram alterações no desempenho dos frangos (JAMROZ, *et al.*, 2009). O sorgo utilizado no presente trabalho continha 0,56% de tanino condensado, o que implicou inclusões de taninos nas rações do tratamento com 100% de substituição do milho de 0,29% na ração inicial e 0,33% na ração de crescimento. No trabalho de GARCIA *et al.* (2005) foi utilizado sorgo com 0,049% de tanino, pelo que os níveis de inclusão de taninos no tratamento com 100% de substituição foram de 0,028% na ração inicial, 0,03% na ração de crescimento e 0,03% na ração final. No trabalho de CAMPOS (2006) foi utilizado sorgo com 0,45% de tanino, pelo que os níveis de inclusão de taninos nas rações do tratamento

com 100% de substituição foram 0,25% na ração inicial e 0,27% na ração de crescimento. Dessa forma, verificou-se que a inclusão de taninos nas rações utilizadas no presente trabalho foram maiores em relação às inclusões feitas por GARCIA *et al.* (2005) e CAMPOS (2006), o que poderia explicar a diferença nos resultados obtidos para a conversão alimentar no período de 1 a 42 dias.

Atualmente, considera-se o sorgo com ou sem tanino, sendo que o cultivo de variedades de sorgo com tanino está bastante reduzido restringindo-se a algumas regiões. Por isso, a ênfase da utilização do sorgo na alimentação de aves não é mais a composição em taninos, mas sim sua viabilização de uso principalmente em regiões onde há exigência do mercado quanto a frangos e ovos com forte pigmentação (SCHEUERMANN, 1998). No entanto, devido ao efeito observado sobre a conversão alimentar pela substituição parcial ou total do milho pelo sorgo sem tanino, considera-se importante quantificar a presença de taninos por análise laboratorial antes de realizar a formulação das rações. De acordo com SCHEUERMANN (1998), considera-se sorgo sem tanino quando o teor for inferior a 0,7% pelo método de Azul de Prússia.

Em relação às características da carcaça, a substituição do milho pelo sorgo não teve efeito significativo sobre o rendimento da carcaça, do peito e da coxa+sobrecoxa. Esses resultados estão de acordo com os apresentados por CAMPOS (2006), GARCIA *et al.* (2005 a) e BOZUTTI (2009), que não acharam diferenças significativas nas mesmas variáveis quando comparados frangos alimentados com milho ou com sorgo sem tanino (baixo tanino). Por outro lado, de acordo com BOZUTTI (2009) a suplementação com enzimas digestivas (α -amilase, protease e xilanase) aumenta o rendimento da carcaça e das pernas de frangos alimentados com milho, mas não de frangos alimentados com sorgo.

CONCLUSÕES

Concluiu-se que a substituição parcial ou total do milho da ração por sorgo, na fase inicial de criação (1 a 21 dias), não altera o desempenho dos frangos. Entretanto, a substituição parcial, de 50 ou 75%, do milho pelo sorgo durante a fase total de criação (1 a 42 dias) melhora a conversão alimentar dos frangos. O rendimento da carcaça e das partes não é comprometido pela proporção de cereais, milho ou sorgo, na ração.

REFERÊNCIAS

ANTUNES R.C.; RODRIGUEZ, N.M.; GONÇALVES, L.C.; RODRIGUES, J.A.S.; BAIÃO, N.C.; PEREIRA, L.G.R.; LARA, L.J. Valor nutritivo de grãos de sorgo com diferentes texturas do endosperma para frangos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 5, p. 877-883, 2006.

BARCELLOS, L.C.G.; FURLAN, A.C.; MURAKAMI, A.E.; SILVA, M.A.A.; SILVA, R.M. Avaliação nutricional da silagem de grãos úmidos de sorgo de alto ou de baixo conteúdo de tanino para frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 1, p. 104-112, 2006.

BOZUTTI, S.R.A. **Avaliação de ingredientes alternativos na alimentação de frangos de corte com a adição de enzimas**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo. Pirassununga, 2009.

Broiler management guide, Cobb. Revised 2008. www.cobb-vantress.com

CAMPOS, D.M.B. **Efeito do sorgo sobre o desempenho zootécnico, características da carcaça e o desenvolvimento da mucosa intestinal de frangos**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

DOWLING, L. F., ARNDT, C., HAMAKER, B. R. Economic Viability of high digestibility sorghum as feed for market broilers. **Agronomy Journal**, v. 94, p. 1050-1058, 2002.

GARCIA, R. G.; MENDES A. A.; COSTA, C.; PAZ, I. C. L. A.; TAKAHASHI, S. E.; PELÍCIA, K. P.; KOMIYAMA, C. M.; QUINTEIRO, R. R. Desempenho e qualidade de carne de frangos de corte alimentados com diferentes níveis de sorgo em substituição ao milho. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.5, p.634-643, 2005.

JAMROZ, D.; WILICZKIEWICZ, A.; SKORUPIŃSKA, J.; ORDA, J.; KURYSZKO, J.; TSCHIRCH, H. Effect of sweet chestnut tannin (SCT) on the performance, microbial

status of intestine and histological characteristics of intestine wall in chickens. **British Poultry Science** v. 50, n. 6, p. 687-699, 2009.

LITTELL, R.C.; STROUP, W.W.; FREUND, R.J. **SAS for linear models**. 4.ed. Cary, NC: SAS Institute, 2002.

MARQUES, B.M.F.P.P.; ROSA, G.B.; HAUSCHILD, L.; CARVALHO, A.d'A.; LOVATTO, P.A. Substituição de milho por sorgo baixo tanino em dietas para suínos: digestibilidade e metabolismo. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.3, p.767-772, 2007.

ROSTAGNO H.S.; ALBINO, L.F.T; DONZELE, J.L.; GOMES, P.C.; OLIVEIRA R.F.; LOPES D.C.; FERREIRA A.S.; BARRETO, S.L.T. **Tabelas brasileiras para aves e suínos. Composição de alimentos e exigências nutricionais**. 2ª edição. Ed: Rostagno H.S. UFV-Departamento de Zootecnia, Viçosa-MG, 2005.

SANTOS, M.S.V.; ESPÍNDOLA, G.B.; FUENTES, M.F.F.; FREITAS, E.R.; CARVALHO, L.E. Utilização de complexo enzimático em dietas à base de sorgo-soja para frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n.3, p. 811-817, 2006.

SCHEUERMANN G.N. Utilização do sorgo em rações para frangos de corte. **Instrução técnica para o avicultor área de comunicação empresarial**. Embrapa suínos e aves, 1998.

CAPÍTULO 3 – MORFOLOGIA E INTEGRIDADE DA MUCOSA DO INTESTINO DELGADO DE FRANGOS DE CORTE EM FUNÇÃO DA SUBSTITUIÇÃO DE MILHO PELO SORGO DA RAÇÃO.

RESUMO

Um experimento foi conduzido para estudar os efeitos da porcentagem de substituição do milho por sorgo na ração para frangos de corte sobre a morfometria e integridade da mucosa do intestino delgado. Foram utilizados 72 pintainhos de um dia machos, Cobb-500, distribuídos em delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos (0, 50, 75 ou 100% de substituição do milho pelo sorgo) e seis repetições. Os frangos receberam as rações experimentais do 1º ao 42º dia. No 7º, 21º e 42º dia um frango por repetição foi sacrificado e o intestino delgado foi dissecado, estendido e aferido seu peso e comprimento. Amostras de duodeno, jejuno e íleo foram coletadas e a densidade dos vilos e o grau de perda do epitélio dos vilos foram determinados por microscopia eletrônica de varredura. O número de células caliciformes e a altura dos vilos foram determinados em cortes histológicos corados com PAS. Em cortes processados por imunohistoquímica para detecção do Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA) foi determinado o índice mitótico nas criptas e a profundidade das criptas. Pelos resultados obtidos concluiu-se que a substituição de milho pelo sorgo na ração de frangos de corte até os 21 dias não prejudica a mucosa do intestino delgado. No entanto, o uso de rações com substituição total do milho pelo sorgo até os 42 dias, prejudica a estrutura das vilosidades da superfície mucosa, principalmente no duodeno e no jejuno, com alterações da forma (menor altura dos vilos do duodeno e menor densidade dos vilos do jejuno) e da integridade dos vilos (marcada perda epitelial), sendo alterações que podem limitar as funções características de digestão e absorção do intestino delgado.

Palavras-Chave: Células caliciformes, densidade de vilos, enterócitos, índice mitótico, morfometria do vilo.

INTRODUÇÃO

Anatomicamente o intestino apresenta inúmeras vilosidades que aumentam amplamente a superfície absorptiva de nutrientes e apresenta quatro regiões concêntricas a partir da serosa até o lúmen: a camada muscular, a lâmina própria, uma camada de células epiteliais e a camada mucosa. Adicionalmente, ao longo do intestino encontra-se difundido o sistema imune ligado ao intestino (sistema GALT). O epitélio consiste de uma única camada de células colunares, onde predominam os enterócitos, com função absorptiva. Também estão presentes as células caliciformes secretoras de mucinas (glicoproteínas), células enteroendócrinas, secretoras de hormônios e neuropeptídeos, células M e leucócitos intra-epiteliais (KOUTSOS & ARIAS, 2006).

No momento da eclosão o trato gastrointestinal dos pintainhos está anatomicamente completo. No entanto, a superfície de absorção e a taxa de proliferação dos enterócitos aumentam após a eclosão, sendo esse rápido desenvolvimento diferente ao longo do intestino delgado. No duodeno, o crescimento dos vilos está praticamente completo aos sete dias de vida, enquanto que no jejuno e íleo o desenvolvimento continua além do 14° dia de vida (UNI, 1999).

O desenvolvimento da mucosa intestinal envolve o aumento na altura e quantidade de vilos, o que corresponde a um aumento em número de suas células epiteliais, enterócitos, células caliciformes e enteroendócrinas. Esse processo decorre primariamente de dois eventos citológicos associados: renovação e extrusão celular. A renovação consiste na proliferação e diferenciação resultante das divisões mitóticas sofridas por células totipotentes (“stem cells”) localizadas na cripta e ao longo dos vilos, e a extrusão é a perda de células, que ocorre normalmente no ápice dos vilos. O equilíbrio entre esses dois processos determina o “turnover” (síntese-migração-extrusão) constante na mucosa, o qual garante a manutenção do tamanho e a função dos vilos. Quando a mucosa intestinal responde a algum agente com um desequilíbrio no “turnover” a favor de um desses processos, ocorre modificação na forma dos vilos (altura, largura, integridade do epitélio). A energia conservada pelo reduzido “turnover” de células no epitélio intestinal poderá ser utilizada para o desenvolvimento de massa muscular. Assim, o rendimento econômico do lote será seriamente comprometido quando o “turnover” intestinal for alterado (MAIORKA *et al.*, 2002).

As células caliciformes, responsáveis pela produção de uma camada de muco composta principalmente por glicoproteínas, conhecidas como mucinas, que contêm uma longa porção polissacarídica tornando-as hidrofílicas e viscosas. As funções das mucinas são: proteger a membrana em escova contra agressões químicas e efeitos abrasivos da digesta, atuar como barreira contra microrganismos, pois integrada ao muco encontra-se a flora intestinal natural e imunoglobulinas, e influenciar o transporte entre o conteúdo luminal e a membrana em escova (BOLELI, *et al.*, 2002).

Devido a que os cereais incluídos na dieta de frangos como fonte de energia constituem geralmente mais de 60% da formulação da ração, alterações nas proporções de inclusão na dieta podem causar efeitos diferentes na função intestinal, desejáveis ou indesejáveis, dependendo do valor nutricional ou da presença de fatores anti-nutricionais dos cereais utilizados. No caso do sorgo, é conhecido que os taninos condensados podem causar necroses e alterações na forma dos vilos da mucosa intestinal e aumento no número de células caliciformes (MITJAVILA *et al.*, 1977; CHANG *et al.*, 1994), e que variedades de sorgo com textura dura do endosperma apresentam menor metabolizabilidade da energia do grão (ANTUNES *et al.*, 2006).

Alguns nutrientes específicos são limitantes para o trato gastrointestinal como o zinco, a vitamina A, a cianocobalamina (B12). A glutamina é considerada como principal substrato para o metabolismo energético intestinal. Ausência de glutamina limita o “turnover” do epitélio e compromete a função de barreira da mucosa intestinal. Nesse sentido, MURAKAMI *et al.*, (2007) observaram que frangos que receberam suplementação de 10 mg/kg de vitamina E, e foram suplementados com 1% de glutamina durante os primeiros sete dias de vida, apresentaram maior altura do vilo no jejuno e no íleo aos 41 dias de vida, indicando melhor desenvolvimento da mucosa intestinal. A suplementação de glutamina na dieta de frangos de 1 a 28 dias causa aumento na densidade dos vilos, na largura dos microvilos e na área de superfície do ápice dos enterócitos (SILVA *et al.*, 2007).

De outro lado, a restrição alimentar atrofia a mucosa intestinal e reduz a área de superfície do ápice dos enterócitos do intestino delgado (SILVA *et al.*, 2007). O peso relativo dos órgãos do trato gastrointestinal intestino, fígado, proventrículo e moela e o tamanhos dos vilos da mucosa intestinal diminuem quando os frangos sofrem restrição hídrica e alimentar por períodos prolongados pós-eclosão, indicando que a disponibilidade

de água e alimento são indispensáveis para o desenvolvimento adequado do trato gastrointestinal pós-eclosão (MAIORKA *et al.*, 2003).

Este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito da substituição do milho pelo sorgo sobre a morfologia e a integridade da mucosa do intestino delgado de frangos de corte.

MATERIAL E MÉTODOS

O desenho experimental, as aves, as dietas e o manejo utilizados no experimento foram descritos no Capítulo 2 item “Desenho experimental, aves e dietas”, exceto porque neste estudo foram utilizadas 72 aves no total.

Nas idades de 7, 21 e 42 dias quando foi aferido o peso médio das aves de cada repetição (seis por tratamento) dos quatro tratamentos (0, 50, 75 ou 100% de substituição do milho por sorgo), foi escolhida uma ave por repetição com peso próximo ao peso médio. As aves escolhidas permaneceram cinco horas em jejum e, posteriormente, foram abatidas por deslocamento cervical.

Colheita de amostras

Avaliação do crescimento do intestino delgado

O intestino delgado de cada ave foi dessecado desde o piloro até a união íleo-cecal. Foram aferidos o peso absoluto (g) e o comprimento (cm), e calculados o peso relativo ao peso corporal (%) e a relação entre o peso e o comprimento (g/cm).

Morfometria da mucosa do intestino delgado

Os segmentos duodeno, jejuno e íleo foram delimitados considerando-se como duodeno a alça duodenal a partir do piloro, o jejuno desde o final da alça duodenal até o divertículo de Meckel e, o íleo desde o divertículo de Meckel até a união íleo-cecal. Amostras de três centímetros tomadas da metade de cada segmento foram dissecadas, abertas longitudinalmente, estendidas e fixadas com grampos em papelão, lavadas

abundante e cuidadosamente com solução tampão fosfato (PBS pH 7,4) refrigerada e fixadas em formaldeído 10% tamponado (pH 7,4) durante 48 horas.

Paralelamente, nas mesmas aves foram coletadas amostras de dois centímetros do duodeno, do jejuno e do íleo para análise da densidade de vilos e da integridade da mucosa por microscopia eletrônica de varredura. As amostras foram abertas longitudinalmente, cuidadosamente lavadas com tampão fosfato 0,1M (pH 7,4) e fixadas em glutaraldeído 3% tamponado (pH 7,4) durante 24 horas a 4°C.

- Número de células caliciformes e altura dos vilos

As análises foram realizadas no Laboratório de Histologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, Jaboticabal, SP. Os tecidos fixados em formaldeído foram desidratados em série de concentração crescente de etanol (70, 80, 90 e 100%), diafanizados em xilol e incluídos em parafina.

Método de coloração pelo ácido periódico-Schiff (PAS)

Para a determinação de células caliciformes, cinco cortes semi-seriados, com 5 µm de espessura, foram corados com PAS, coloração específica de células caliciformes produtoras de mucinas neutras. Os cortes foram desparafinizados em xilol, hidratados e corados com ácido periódico 5% por cinco minutos. Em seguida, foi realizada uma lavagem rápida com água destilada à temperatura ambiente, seguida de uma lavagem com água destilada à 50°C. Posteriormente, os cortes foram incubados com reativo de Schiff por 15 minutos (acompanhando a coloração do tecido), e realizadas lavagens, uma com água sulfurosa (10mL de metabissulfito de sódio, mais 10 mL ácido clorídrico 1N com 200 mL de água destilada), outra com água corrente seguida com água destilada. Após esta bateria de coloração, os cortes foram desidratados, diafanizados e finalmente as lâminas foram montadas.

Imagens dos cortes com 200x de aumento foram feitas utilizando um sistema de análise de imagens² e foram analisadas pelo programa *Image J*® (RASBAND, 2004). O número de células caliciformes (PAS+) foi determinado ao longo de 200 µm na parte média

² LEICA: Microscópio DM2500, câmera digital DFC280 e Leica QWin Software.

do vilos, em um total de 10 vilos por amostra (Figura 1 B). Imagens dos cortes com 50x de aumento também foram feitas para aferição da altura média dos vilos (μm), sendo analisados de 25 a 30 vilos por amostra (Figura 1 A). Preferiu-se realizar as análises da profundidade das criptas nos cortes processados para imunohistoquímica, devido ao processo de coloração de PAS quando as criptas ficaram pouco definidas.

- Índice mitótico e profundidade das criptas

Imunohistoquímica para PCNA

Imunohistoquímica foi realizada para a detecção de Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA) usando complexo peroxidase Avidina-Biotina³. As análises foram realizadas no Laboratório de Citologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, Araraquara, SP. Dos tecidos fixados em formaldeído e embebidos em parafina foram obtidos dois cortes de 5 μm que foram montados em lâminas silanizadas. Os cortes foram desparafinizados em xilol e reidratados através de um gradiente decrescente de etanol. Para a recuperação antigênica, os cortes foram imersos em tampão 10 mM citrato de sódio ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$), pH 6,0 e, em uma panela a vapor, foram submetidos a 95°C por 30 minutos. Os cortes foram esfriados à temperatura ambiente e imersos em uma solução de metanol/peróxido de hidrogênio (3%) durante 30 minutos protegido da luz. Os cortes foram lavados por três vezes consecutivas em 1M PBS padrão, e foram incubados em solução de leite desnatado em PBS (1%) para o bloqueio de ligações não específicas, durante 40 minutos protegido da luz.

³ Kit of detection Starr Trek Universal HRP, Biocare Medical, USA

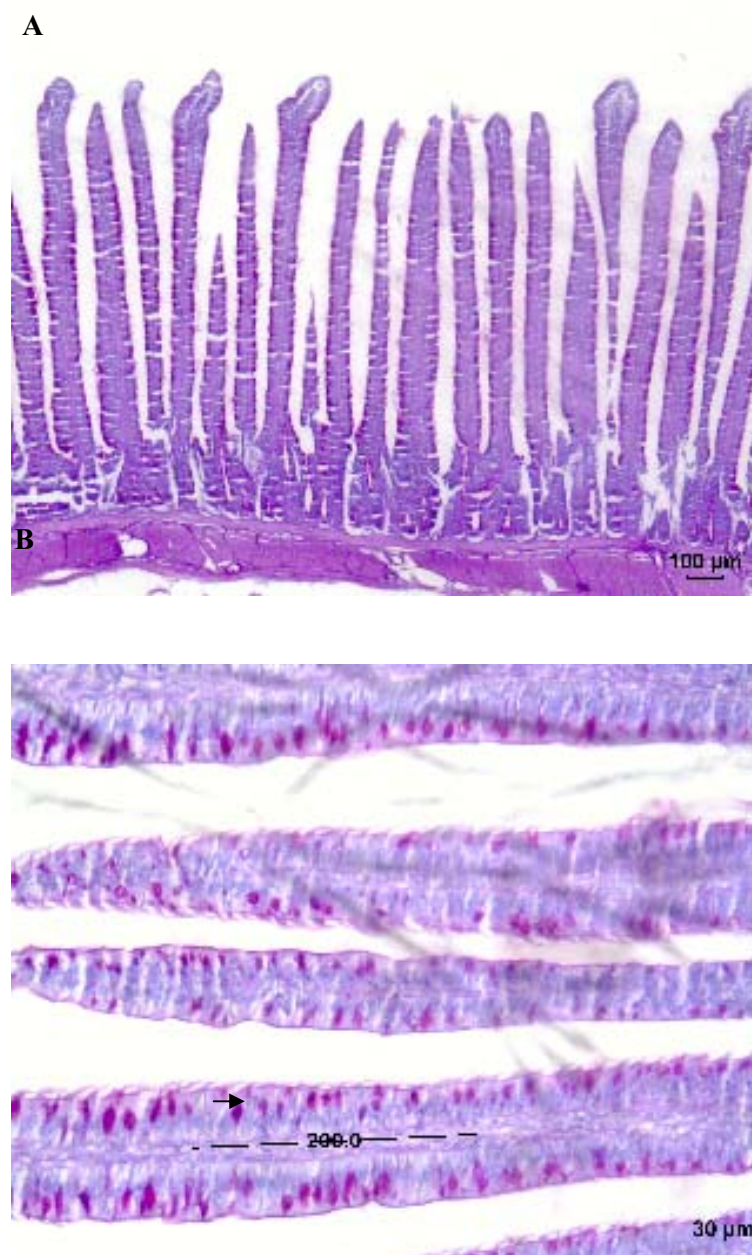


Figura 1. Altura do vilão e número de células caliciformes em cortes corados com reagente de Schiff (PAS). (A) Fotomicrografia em aumento 50x, corte de íleo de frango com 21 dias de idade para mensuração da altura dos vilos. **(B)** Fotomicrografia em aumento 200x, corte de jejuno de frango de 7 dias; sobre o corte foi desenhada uma barra de 200 µm na parte média dos vilos e foi determinado o número de células caliciformes (PAS+) a ambos os lados da barra, sendo o valor dividido por dois (No. de células caliciformes em 200 µm).

Após o bloqueio inespecífico, os cortes foram incubados com anticorpo primário contra PCNA⁴ em diluição 1:250 em PBS/BSA 1%. Foi realizado um teste prévio utilizando diluições do anticorpo primário de 1:100, 1:150, 1:200, 1:250 e 1:500 em duas lâminas por cada diluição, obtendo-se a melhor marcação quando foi utilizada a diluição 1:250. A incubação com anti-PCNA foi realizada *overnight* à temperatura ambiente, em câmara úmida.

Depois, os cortes foram lavados três vezes em PBS e corados com imunoperoxidase usando um anticorpo secundário com biotina e, posteriormente, com o complexo streptavidina-peroxidase. Em ambos os passos, as lâminas foram incubadas durante 15 minutos a temperatura ambiente e lavadas três vezes com PBS. Posteriormente, as lâminas foram incubadas em uma solução contendo 5 mg de diaminobenzidina⁵ (DAB) dissolvido em 5 ml de PBS, e 100 ml de solução fresca de peroxidase (450 ml PBS, 50 ml de peróxido de hidrogênio). A reação com DAB foi bloqueada com imersão das lâminas em PBS, seguido de três lavagens com água destilada. Em seguida, os cortes foram contrastados com hematoxilina de Harris por 1 minuto, seguido de várias lavagens com água destilada. Os cortes foram desidratados com quatro imersões em álcool absoluto e quatro em xilol e as lâminas foram montadas.

Foram incluídos três controles para cada vez que foi iniciado o processo de imunohistoquímica. Um controle positivo, que consistiu em um corte de câncer de mama humano (como indicado pelo fabricante do anticorpo primário) e dois controles negativos, um corte de câncer de mama humano e uma lâmina com dois cortes de mucosa do intestino de frango. Nos controles negativos o anticorpo primário (anti-PCNA) foi omitido da reação e substituído por PBS.

Aquisição e análise de imagens

Imagens dos cortes com aumento de 400x foram feitas utilizando um sistema de análise de imagem⁶ de análise de imagens. Imagens de 10 criptas por amostra foram analisadas quanto ao número total de células com o núcleo marcado marrom (PCNA+) e número de células com o núcleo de cor azul (PCNA-), ao longo de 100 µm a partir da base da cripta ou na parte média do vilão, e determinou-se a porcentagem média de células

⁴ PCNA Clone PC10, Biocare Medical, USA, fonte: anticorpo monoclonal de camundongo.

⁵ GIBCO; Gaithersburg, MD

⁶ LEICA: Microscópio DM2500, câmera digital DFC280 e Leica QWin Software.

PCNA+ em 100 μm (Figura 2). Adicionalmente, imagens dos cortes em aumento de 100x foram realizadas para mensuração da profundidade das criptas (μm), variável determinada pela média de 10 a 15 criptas por amostra.

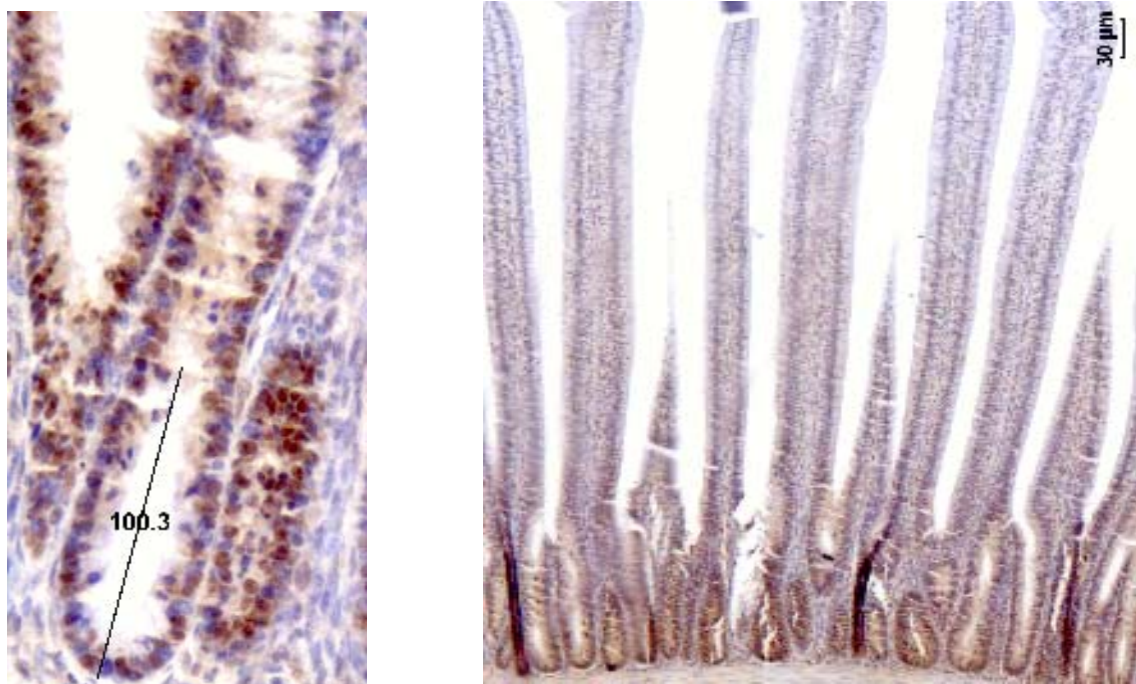


Figura 2. Índice de mitose celular e profundidade das criptas. Fotomicrografias em aumento 400x (esquerda) e 100x (direita). Corte de jejuno de frango de sete dias; sobre o corte foi desenhada uma barra de 100 μm a partir da base da cripta e foi determinada a porcentagem de células PCNA+ contando o total de células com o núcleo marcado marrom (PCNA+, cabeça de seta) e com o núcleo azul (PCNA-, seta) a ambos os lados da barra (esquerda). As criptas foram mensuradas desde a sua base até a base do vilô (direita).

- Densidade de vilos e integridade da mucosa

Os procedimentos para microscopia eletrônica de varredura foram realizados no Setor de Microscopia Eletrônica da FCAV/UNESP, em Jaboticabal, SP. As amostras fixadas em glutaraldeído foram lavadas com tampão fosfato e cortados três pequenos fragmentos os quais foram desidratados em concentrações crescentes de álcool (30, 50, 70, 80, 90 e 100%). Após obtenção do ponto crítico de secagem, utilizando CO_2 , os fragmentos foram metalizados em ouro e a superfície da mucosa foi fotografada em

microscópio eletrônico de varredura⁷. Foi obtida uma fotomicrografia eletrônica por cada fragmento, em aumento de 150 vezes, dessa forma, a área total de todas as fotomicrografias correspondeu a uma área de 1,368 mm² da mucosa de cada amostra. As fotomicrografias foram analisadas para determinar a densidade de vilos por área, variável que foi expressa como o número de vilos em um mm² da mucosa.

Adicionalmente a integridade da mucosa do intestino delgado foi avaliada pela classificação dos vilos de acordo com o grau de perda do epitélio. A classificação foi baseada em GOMIDE Jr. *et al.* (2004) como apresentado na Figura 3. No entanto, não foi incluído o grau 0 (vilo normal sem perda aparente do epitélio) devido a que todos os vilos apresentaram algum grau de perda epitelial. Adicionalmente, o grau 5 (carência de epitélio no vilo inteiro, e exposição do tecido conectivo, assemelhando-se a uma língua totalmente exposta) e o 6 (perda de vilos, assemelhando-se a vilos quebrados) da classificação de GOMIDE Jr. *et al.* (2004), foram considerados dentro da mesma classificação (grau 5), a fim de diminuir o número de graus e facilitar a análise dos resultados. Os dados foram expressos como porcentagem de vilos em cada grau de perda de epitélio, do total de vilos contados em 1,368 mm² de mucosa e foi calculado o grau médio para cada amostra.

Análise estatística

O efeito da substituição de sorgo pelo milho (em porcentagem) sobre as variáveis foi avaliado pela análise de variância (*one-way-ANOVA*), sendo que previamente foi verificada a presença de dados discrepantes (*Box-&Whisker plot*), a distribuição normal dos erros estudantizados (teste de Cramer-Von-Mises) e a homogeneidade das variâncias (teste de Brown-Forsythe) (LITTELL *et al.*, 2002). Já que as pressuposições foram atendidas, o efeito da substituição de milho pelo sorgo (em porcentagem) sobre as variáveis de crescimento do intestino e morfologia da mucosa foi avaliado pelo Valor de *p* ao nível de significância de 0,05, usando o procedimento *General Linear Model* do programa SAS versão 9.0. Quando as diferenças foram significativas, os graus de liberdade de tratamentos foram desdobrados em efeito linear, quadrático e cúbico. Também foi realizada análise descritiva dos dados da classificação dos vilos pelo grau de perda epitelial. Os gráficos apresentados foram realizados no programa GraphPad Prism® Versão 5.0 para Windows.

⁷ Modelo Jeol JSM 25SII®

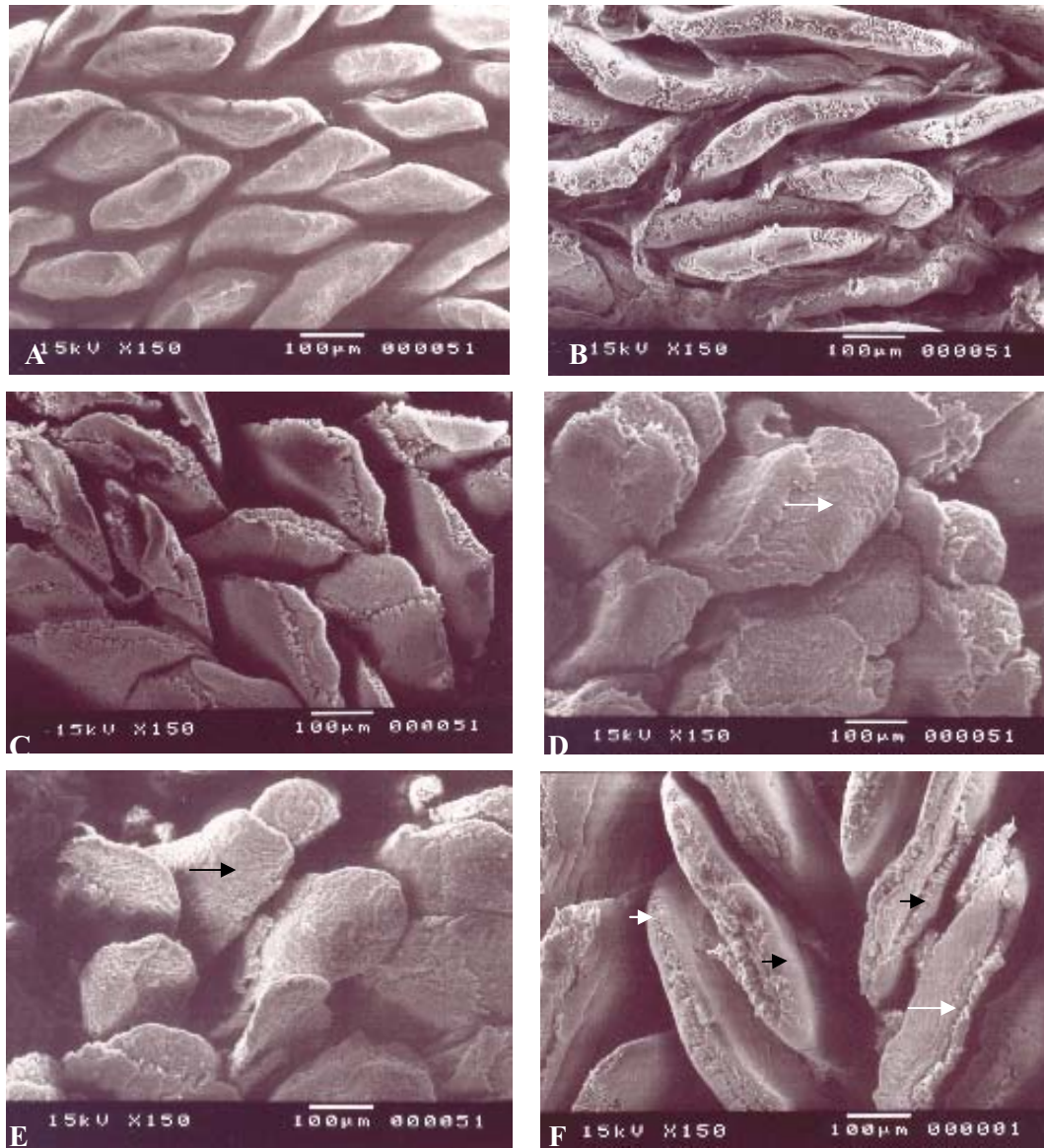


Figura 3. Graus de perda do epitélio para a avaliação da integridade da mucosa intestinal. **A) grau 1:** pequena perda do epitélio no ápice ou em pequenas áreas ao longo do vilão (extrusão normal); **B) grau 2:** perda do epitélio no ápice dos vilos com exposição do tecido conectivo; **C) grau 3:** perda do epitélio no ápice dos vilos assemelhando-se à ponta de uma língua exposta; **D) grau 4:** marcada perda do epitélio na metade superior do vilão com exposição do tecido conectivo assemelhando-se a uma língua exposta; **E) grau 5:** carência de epitélio no vilão inteiro, e exposição do tecido conectivo, assemelhando-se a uma língua totalmente exposta ou perda de vilos e vilos quebrados (seta preta); **F)** Vilos dos graus 2 (cabeça de seta branca), 3 (cabeça de seta preta) e 4 (seta branca). Fotomicrografias eletrônicas obtidas de amostras do presente trabalho para ilustrar os graus de perda epitelial. Aumento 150x.

RESULTADOS

Crescimento do intestino delgado

Aos sete dias de idade, o peso do intestino delgado foi afetado pelo tratamento ($p < 0,05$), sendo que os pesos, absoluto e relativo, apresentaram efeito linear ($p < 0,05$) em função do tratamento, e o efeito quadrático sobre o peso absoluto também foi significativo ($p < 0,05$). Os frangos que consumiram alimento com 100% de substituição do milho pelo sorgo apresentaram os maiores valores de peso absoluto e relativo e quando a substituição foi de 50%, o intestino delgado apresentou os menores pesos (Tabela 1). O comprimento e a relação entre o peso e o comprimento não foram afetados pelo tratamento na idade de sete dias ($p > 0,05$). Aos 21 e 42 dias as variáveis avaliadas no intestino delgado não foram afetadas pelos tratamentos ($p > 0,05$) (Tabela 1).

Tabela 1. Crescimento do intestino delgado. Média \pm erro padrão dos valores de peso absoluto (g), peso relativo (%) ao peso dos frangos em jejum de cinco horas, comprimento (cm) e relação entre o peso absoluto e o comprimento (g/cm) do intestino delgado de frangos de corte alimentados com rações contendo diferentes porcentagens de substituição de milho pelo sorgo (0, 50, 75 ou 100%), em avaliações feitas aos 7, 21 e 42 dias de idade.

Variável	Porcentagem de substituição de milho por sorgo na ração (%)				Valor de p	CV (%)
	0	50	75	100		
7 dias						
Peso absoluto (g)	14,21 \pm 0,42	13,09 \pm 0,29	14,61 \pm 0,54	15,69 \pm 0,63	0,01*	8,29
Peso relativo (%)	8,05 \pm 0,23	7,61 \pm 0,18	8,38 \pm 0,31	8,92 \pm 0,26	0,01*	7,45
Comprimento (cm)	85 \pm 3,58	82 \pm 2,66	87 \pm 3,18	94 \pm 2,95	0,08	8,72
Peso/comprimento (g/cm)	0,17 \pm 0,01	0,16 \pm 0,00	0,17 \pm 0,00	0,17 \pm 0,01	0,79	10,46
21 dias						
Peso absoluto (g)	47,76 \pm 1,56	45,55 \pm 1,99	45,51 \pm 1,70	46,27 \pm 1,77	0,78	9,33
Peso relativo (%)	4,95 \pm 0,16	4,91 \pm 0,19	4,92 \pm 0,19	4,93 \pm 0,21	0,99	9,35
Comprimento (cm)	114 \pm 6,66	113 \pm 2,27	116 \pm 4,07	114 \pm 5,21	0,96	10,36
Peso/comprimento (g/cm)	0,42 \pm 0,03	0,41 \pm 0,02	0,39 \pm 0,01	0,41 \pm 0,02	0,77	13,14
42 dias						
Peso absoluto (g)	97,23 \pm 2,61	89,74 \pm 5,82	92,26 \pm 6,81	102,74 \pm 2,87	0,34	12,90
Peso relativo (%)	3,47 \pm 0,07	3,15 \pm 0,20	3,32 \pm 0,22	3,59 \pm 0,11	0,32	12,05
Comprimento (cm)	155 \pm 5,35	144 \pm 3,46	146 \pm 4,04	150 \pm 1,52	0,18	6,09
Peso/comprimento (g/cm)	0,63 \pm 0,01	0,63 \pm 0,05	0,63 \pm 0,04	0,68 \pm 0,02	0,65	13,25

$P < F$ = Probabilidade de F, resultados da análise de variância (5%). CV(%) = Coeficiente de variação.
n= seis repetições por tratamento.

*Desdobramento dos graus de liberdade de tratamentos em efeitos:
linear ($p=0,01$), quadrático ($p=0,03$) e cúbico ($p=0,17$), da variável peso absoluto aos 7 dias.
linear ($p=0,01$), quadrático ($p=0,07$) e cúbico ($p=0,21$), da variável peso relativo aos 7 dias.

Morfometria da mucosa do intestino delgado

Os resultados das análises das variáveis morfométricas da mucosa do intestino delgado (densidade de vilos, altura dos vilos, profundidade das criptas, número de células caliciformes e índice de mitose celular) avaliadas aos 7, 21 e 42 dias de idade estão apresentados nas Tabelas 2, 3 e 4. Aos sete dias, houve efeito quadrático ($p < 0,05$) do tratamento sobre a altura dos vilos do duodeno e efeitos quadrático ($p < 0,05$) e cúbico ($p < 0,05$) sobre a altura dos vilos e o índice mitótico nas criptas do jejuno. A altura dos vilos do duodeno e do jejuno foi maior quando os frangos foram alimentados com 0% ou 100% de substituição e menor quando a substituição foi de 50%. A altura dos vilos no íleo não foi afetada pelos tratamentos. No jejuno, o menor índice mitótico nas criptas foi observado nos frangos alimentados com ração à base de milho, e os maiores valores nos frangos alimentados com rações contendo 50 ou 100% de substituição. O índice mitótico nas criptas do duodeno e íleo não foi afetado pelos tratamentos ($p > 0,05$). A densidade dos vilos, a profundidade das criptas e o número de células caliciformes no duodeno, jejuno e íleo, aos sete dias, não foram afetados significativamente pelos tratamentos (Tabela 2).

Aos 21 dias de idade nenhuma das variáveis avaliadas no duodeno, no jejuno e no íleo foram afetadas pelos tratamentos ($p > 0,05$) (Tabela 3).

Aos 42 dias houve efeito significativo do tratamento sobre a densidade dos vilos do jejuno, a altura dos vilos do duodeno e o índice mitótico nas criptas do jejuno e íleo ($p < 0,05$). As funções linear e quadrática foram significativas ($p < 0,05$) para a densidade de vilos do jejuno, sendo que o menor valor foi obtido nos frangos alimentados com ração com 100% de substituição e os maiores valores pelos alimentados com ração com 0 ou 50% de substituição. Houve efeitos, quadrático e cúbico, significativos ($p < 0,05$) sobre a altura dos vilos do duodeno, sendo que o menor valor foi observado nos frangos alimentados com 100% de substituição e o maior nos alimentados com 75% de substituição. Efeitos linear e cúbico foram significativos ($p < 0,05$) para o índice mitótico das criptas do jejuno, que foi menor nos frangos alimentados com rações 0% de substituição do milho pelo sorgo e maior nos frangos alimentados com rações contendo 50 ou 75% de substituição. E Efeito linear foi significativo ($p < 0,05$) para o índice mitótico das criptas do íleo, que foi menor quando a substituição foi de 0% e maior quando a substituição foi 50 ou 100% (Tabela 4). Entretanto, as variáveis, densidade de vilos no

jejuno e no íleo, profundidade das criptas e número de células caliciformes dos três segmentos do intestino delgado, não foram afetadas pelos tratamentos ($p>0,05$).

Tabela 2. Morfometria da mucosa do intestino delgado aos sete dias. Média \pm erro padrão e resultados da análise de variância dos valores da densidade de vilos (número de vilos por mm^2), da altura dos vilos (μm), da profundidade das criptas (μm), do número de células caliciformes em 200 μm da parte média dos vilos e do índice mitótico nas criptas (%), na mucosa do duodeno, jejuno e íleo de frangos de corte alimentados com rações contendo diferentes porcentagens de substituição de milho pelo sorgo (0, 50, 75 ou 100%).

Segmento do Intestino	Porcentagem de substituição de milho por sorgo na ração (%)				Valor de p	CV(%)
	0	50	75	100		
Densidade de vilos (No. de vilos/mm^2)						
Duodeno	62,35 \pm 2,57	49,69 \pm 2,79	52,06 \pm 4,70	50,29 \pm 4,01	0,75	16,57
Jejuno	70,27 \pm 8,57	64,60 \pm 6,36	64,85 \pm 5,71	57,78 \pm 6,50	0,65	26,13
Íleo	79,28 \pm 5,18	95,11 \pm 7,25	89,38 \pm 5,80	100,59 \pm 12,99	0,34	22,57
Altura dos vilos (μm)						
Duodeno	1204 \pm 41	1023 \pm 5	1042 \pm 10	1192 \pm 51	<0,01*	5,88
Jejuno	858 \pm 2	727 \pm 25	788 \pm 26	815 \pm 12	<0,01*	5,01
Íleo	556 \pm 25	603 \pm 14	571 \pm 27	573 \pm 27	0,53	7,86
Profundidade das criptas (μm)						
Duodeno	260 \pm 19	268 \pm 23	233 \pm 15	317 \pm 23	0,13	14,23
Jejuno	328 \pm 55	227 \pm 10	243 \pm 37	241 \pm 16	0,22	28,78
Íleo	183 \pm 28	236 \pm 8	208 \pm 31	193 \pm 13	0,37	20,18
No. Células caliciformes (em 200 μm)						
Duodeno	13,30 \pm 1,59	11,49 \pm 0,44	15,25 \pm 0,89	13,25 \pm 0,08	0,07	11,91
Jejuno	17,40 \pm 1,18	16,25 \pm 0,77	21,49 \pm 1,92	18,91 \pm 1,23	0,06	14,40
Íleo	18,14 \pm 1,50	20,82 \pm 3,41	15,63 \pm 2,09	18,89 \pm 1,18	0,44	20,36
Índice mitótico nas criptas (%)						
Duodeno	55,46 \pm 7,64	55,33 \pm 4,38	49,01 \pm 3,96	57,25 \pm 4,32	0,73	15,19
Jejuno	42,19 \pm 1,85	65,29 \pm 8,68	53,21 \pm 0,93	57,95 \pm 2,22	0,01*	13,14
Íleo	51,88 \pm 4,97	56,93 \pm 2,14	59,58 \pm 8,58	51,15 \pm 1,60	0,46	13,45

Valor de p = resultados da análise de variância (5%). CV(%) = Coeficiente de variação.

a, b Médias seguidas de letras iguais, na linha, não diferem entre si, pelo teste de Tukey (5%), n = densidade dos vilos: seis repetições por tratamento, demais variáveis: 2, 3 ou 4 repetições por tratamento.

*Desdobramento dos graus de liberdade de tratamentos em efeitos:

linear ($p=0,91$), quadrático ($p<0,01$) e cúbico ($p=0,67$), da altura dos vilos (μm) do duodeno.

linear ($p=0,50$), quadrático ($p<0,01$) e cúbico ($p=0,03$), da altura dos vilos (μm) do jejuno.

linear ($p=0,05$), quadrático ($p=0,03$) e cúbico ($p=0,01$), do Índice mitótico (%) nas criptas do jejuno.

Tabela 3. Morfometria da mucosa do intestino delgado aos 21 dias. Média \pm erro padrão e resultados da análise de variância dos valores da densidade de vilos (número de vilos por mm^2), da altura dos vilos (μm), da profundidade das criptas (μm), do número de células caliciformes em 200 μm da parte média dos vilos e do índice mitótico nas criptas (%), na mucosa do duodeno, jejuno e íleo de frangos de corte alimentados com rações contendo diferentes porcentagens de substituição de milho pelo sorgo (0, 50, 75 ou 100%).

Segmento do intestino	Porcentagem de substituição de milho por sorgo na ração (%)				Valor de <i>p</i>	CV(%)
	0	50	75	100		
Densidade de vilos (No. de vilos/mm^2)						
Duodeno	25,09 \pm 2,84	30,87 \pm 5,55	20,70 \pm 1,49	19,12 \pm 1,90	0,09	34,22
Jejuno	25,72 \pm 0,96	26,58 \pm 1,76	26,79 \pm 1,79	23,67 \pm 1,10	0,49	13,90
Íleo	34,58 \pm 2,89	34,78 \pm 5,28	46,15 \pm 2,76	38,58 \pm 3,13	0,09	21,39
Altura dos vilos (μm)						
Duodeno	1300 \pm 51	1360 \pm 152	1441 \pm 75	1456 \pm 75	0,70	14,13
Jejuno	1326 \pm 129	1179 \pm 45	1271 \pm 37	1191 \pm 87	0,57	13,41
Íleo	897 \pm 80	794 \pm 31	802 \pm 28	768 \pm 45	0,35	11,16
Profundidade das criptas (μm)						
Duodeno	294 \pm 15	296 \pm 26	276 \pm 28	321 \pm 7	0,54	14,38
Jejuno	273 \pm 20	334 \pm 50	266 \pm 24	280 \pm 10	0,39	19,52
Íleo	263 \pm 36	252 \pm 18	207 \pm 4	250 \pm 28	0,42	17,49
No. Células caliciformes (em 200 μm)						
Duodeno	16,01 \pm 1,12	13,86 \pm 0,67	15,85 \pm 0,97	13,97 \pm 0,64	0,21	11,72
Jejuno	19,75 \pm 0,76	16,84 \pm 1,61	20,62 \pm 1,60	17,31 \pm 1,40	0,24	15,34
Íleo	20,17 \pm 0,86	18,79 \pm 0,38	18,12 \pm 1,96	16,86 \pm 1,00	0,31	12,98
Índice mitótico nas criptas (%)						
Duodeno	47,22 \pm 3,21	51,57 \pm 1,15	51,02 \pm 5,00	57,65 \pm 1,94	0,45	11,89
Jejuno	56,29 \pm 5,59	46,69 \pm 6,22	44,54 \pm 7,19	59,67 \pm 0,42	0,13	14,32
Íleo	47,53 \pm 3,94	57,53 \pm 11,97	65,40 \pm 8,44	55,69 \pm 2,78	0,49	23,84

Valor de *p* = resultados da análise de variância (5%). CV(%) = Coeficiente de variação.

a, b Médias seguidas de letras iguais, na linha, não diferem entre si, pelo teste de Tukey (5%), *n* = densidade dos vilos: seis repetições por tratamento, demais variáveis: 2, 3 ou 4 repetições por tratamento.

Tabela 4. Morfometria da mucosa do intestino delgado aos 42 dias. Média \pm erro padrão e resultados da análise de variância dos valores da densidade de vilos (número de vilos por mm^2), da altura dos vilos (μm), da profundidade das criptas (μm), do número de células caliciformes em 200 μm da parte média dos vilos e do índice mitótico nas criptas (%), na mucosa do duodeno, jejuno e íleo de frangos de corte alimentados com rações contendo diferentes porcentagens de substituição de milho pelo sorgo (0, 50, 75 ou 100%).

Segmento do intestino	Porcentagem de substituição de milho por sorgo na ração (%)				Valor de p	CV(%)
	0	50	75	100		
	Densidade de vilos (No. de vilos/mm^2)					
Duodeno	14,47 \pm 1,07	15,05 \pm 0,55	12,42 \pm 0,94	15,85 \pm 0,69	0,07	12,94
Jejuno	23,75 \pm 1,33	24,99 \pm 1,07	20,88 \pm 1,83	16,01 \pm 0,68	< 0,01*	14,92
Íleo	34,49 \pm 2,35	31,42 \pm 2,28	30,03 \pm 0,57	29,96 \pm 2,05	0,39	14,54
	Altura dos vilos (μm)					
Duodeno	1526 \pm 95	1519 \pm 15	1728 \pm 67	1434 \pm 39	0,03*	7,93
Jejuno	1358 \pm 47	1332 \pm 149	1379 \pm 65	1365 \pm 70	0,99	13,51
Íleo	1047 \pm 71	959 \pm 92	905 \pm 117	1024 \pm 30	0,61	16,39
	Profundidade das criptas (μm)					
Duodeno	319 \pm 39	386 \pm 13	367 \pm 7	326 \pm 16	0,16	12,79
Jejuno	337 \pm 10	349 \pm 51	368 \pm 9	335 \pm 2	0,44	15,65
Íleo	210 \pm 16	221 \pm 29	251 \pm 17	223 \pm 14	0,67	12,14
	No. Células caliciformes (em 200 μm)					
Duodeno	13,21 \pm 0,51	15,05 \pm 1,60	13,94 \pm 1,03	15,40 \pm 2,16	0,71	20,31
Jejuno	18,27 \pm 2,27	19,15 \pm 2,07	18,44 \pm 1,30	15,62 \pm 0,39	0,49	18,81
Íleo	19,44 \pm 0,78	17,87 \pm 3,19	19,78 \pm 1,47	20,81 \pm 1,72	0,75	17,88
	Índice mitótico nas criptas (%)					
Duodeno	55,35 \pm 7,97	57,22 \pm 3,02	57,93 \pm 15,00	65,08 \pm 2,96	0,81	21,13
Jejuno	56,58 \pm 4,82	58,98 \pm 3,42	76,84 \pm 1,17	70,82 \pm 4,42	0,01*	13,14
Íleo	43,86 \pm 4,71	65,33 \pm 3,48	60,63 \pm 3,07	62,90 \pm 4,58	0,02*	13,51

Valor de p = resultados da análise de variância (5%). CV(%) = Coeficiente de variação.

a, b Médias seguidas de letras iguais, na linha, não diferem entre si, pelo teste de Tukey (5%), n= densidade dos vilos: seis repetições por tratamento, demais variáveis: 2, 3 ou 4 repetições por tratamento.

*Desdobramento dos graus de liberdade de tratamentos em efeitos:

Linear ($p < 0,01$), quadrático ($p = 0,03$) e cúbico ($p = 0,46$), da densidade de vilos (n° de vilos/ mm^2) no jejuno.

Linear ($p = 0,82$), quadrático ($p = 0,04$) e cúbico ($p = 0,02$), da altura dos vilos (μm) do duodeno.

Linear ($p < 0,01$), quadrático ($p = 0,24$) e cúbico ($p = 0,02$), do Índice mitótico (%) nas criptas do jejuno.

Linear ($p = 0,02$), quadrático ($p = 0,06$) e cúbico ($p = 0,14$), do Índice mitótico (%) nas criptas do íleo.

Integridade da mucosa

O grau de perda de epitélio do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) não foi afetado ($p > 0,05$) pela substituição de milho pelo sorgo na ração nas idades de sete e 21 dias. No entanto, aos 42 dias, houve efeitos, linear e cúbico, significativos ($p < 0,05$) do tratamento sobre o grau de perda do epitélio do duodeno e efeito cúbico ($p < 0,05$) sobre o grau de perda do epitélio do jejuno. Quando os frangos foram alimentados com rações contendo 100% de substituição de milho pelo sorgo apresentaram os maiores

graus de perda do epitélio no duodeno e no jejuno, e os menores graus foram observados nos frangos alimentados com 75% de substituição.

Tabela 5. Grau de perda do epitélio intestinal. Média \pm erro padrão e resultados da análise de variância do grau médio de perda do epitélio intestinal na mucosa do duodeno, jejuno e íleo de frangos de corte alimentados com rações contendo diferentes porcentagens de substituição de milho pelo sorgo (0, 50, 75 ou 100%).

Idade Segmento	Porcentagem de substituição de milho por sorgo na ração (%)				Valor de <i>p</i>	CV(%)
	0	50	75	100		
7 dias						
Duodeno	1,37 \pm 0,10	1,57 \pm 0,17	1,60 \pm 0,17	1,27 \pm 0,10	0,29	22,89
Jejuno	1,02 \pm 0,01	1,26 \pm 0,11	1,18 \pm 0,08	1,12 \pm 0,06	0,29	7,96
Íleo	1,07 \pm 0,04	1,08 \pm 0,03	1,02 \pm 0,01	1,08 \pm 0,04	0,57	17,11
21 dias						
Duodeno	2,40 \pm 0,41	1,55 \pm 0,27	2,49 \pm 0,10	2,33 \pm 0,12	0,06	29,00
Jejuno	1,29 \pm 0,15	1,73 \pm 0,21	1,76 \pm 0,19	1,56 \pm 0,18	0,31	27,65
Íleo	1,51 \pm 0,10	1,27 \pm 0,09	1,54 \pm 0,13	1,35 \pm 0,15	0,36	20,25
42 dias						
Duodeno	2,54 \pm 0,11	2,82 \pm 0,20	2,09 \pm 0,13	3,03 \pm 0,36	0,03*	18,94
Jejuno	1,47 \pm 0,17	1,81 \pm 0,21	1,19 \pm 0,09	2,18 \pm 0,15	0,001*	22,94
Íleo	1,39 \pm 0,08	1,45 \pm 0,13	1,50 \pm 0,00	1,26 \pm 0,12	0,40	16,34

Valor de *p* = resultados da análise de variância (5%). CV(%) = Coeficiente de variação.

a, b Médias seguidas de letras iguais, na linha, não diferem entre si, pelo teste de Tukey (5%), *n*= seis repetições por tratamento.

*Desdobramento dos graus de liberdade de tratamentos em efeitos:

Linear (*p*=0,45), quadrático (*p*=0,15) e cúbico (*p*=0,01), do grau de perda epitelial no duodeno aos 42 dias.

Linear (*p*=0,04), quadrático (*p*=0,06) e cúbico (*p*<0,01), do grau de perda epitelial no jejuno aos 42 dias.

Análise descritiva da classificação dos vilos pelo grau de perda epitelial

Nas Figuras 4, 5 e 6 é apresentada a classificação dos vilos aos 7, 21 e 42 dias, respectivamente, de acordo com o grau de perda do epitélio da mucosa. Em todas as idades, foi verificado que o duodeno foi o segmento do intestino delgado com maior grau de perda de epitélio, seguido pelo jejuno, e depois pelo íleo, sendo este último o segmento que teve o epitélio mais conservado. Adicionalmente, com a idade este efeito foi mais evidente, sendo que o duodeno apresentou graus mais altos de perda de epitélio.

Aos sete dias houve boa conservação da integridade do epitélio nos três segmentos (duodeno, jejuno e íleo). No duodeno, em todos os tratamentos foi observado que a maioria dos vilos foram classificados no grau 1 (extrusão normal do epitélio), obtendo-se médias de 63, 52, 56 e 77% para os tratamentos com 0, 50, 75 e

100% de substituição, respectivamente. Os vilos restantes apresentaram classificações nos graus 3 (exposição do tecido conetivo no ápice), grau 4 (exposição do tecido conetivo até a metade superior do vilos) e grau 5 (perda total do epitélio ou perda do vilos) quando houve substituição do milho (tratamentos 50, 75 e 100%) (Figura 4).

No jejuno foram observados valores médios de porcentagem de vilos do grau 1 de 98, 75, 83 e 87% para os tratamentos com 0, 50, 75 e 100% de substituição, respectivamente. Os demais vilos foram do grau 2, em todos os tratamentos. No íleo, mais de 90% dos vilos foram classificados no grau 1, independente do tratamento (Figura 4).

Aos 21 dias, o duodeno apresentou marcada perda do epitélio, sendo que em todos os tratamentos foram observados vilos com graus de perda epitelial 1, 2, 3 e 4. A melhor conservação da integridade foi observada no tratamento com 50% de substituição apresentando uma média de 60% de vilos grau 1. Nos tratamentos com 75 e 100% de substituição foram observadas as menores porcentagens de vilos do grau 1 (6 e 2%, respectivamente) (Figura 5). No jejuno os vilos foram classificados principalmente nos graus 1 e 2. Quando não houve substituição (tratamento 0%), a conservação da integridade dos vilos do jejuno foi maior (73%), em comparação com 50, 75 ou 100% de substituição (41, 37, 44%, respectivamente). Nos tratamentos com 50 e 75% de substituição foram observados vilos classificados nos graus 3 e 4 (Figura 5). No íleo os vilos foram classificados principalmente nos graus 1 e 2. A maior porcentagem de vilos do grau 1 (76%) foi apresentada pelo tratamento com 50% de substituição, em comparação com os outros tratamentos (53, 46 e 65% para os tratamentos 0, 75 e 100%, respectivamente) (Figura 5).

Aos 42 dias, o duodeno apresentou acentuada perda do epitélio, sendo que só no tratamento com 75% de substituição houve uma pequena porcentagem de vilos com grau 1 (8,3%). Em todos os tratamentos os vilos apresentaram perda epitelial principalmente dos graus 2 e 3. O tratamento com 100% de substituição de milho pelo sorgo levou à maior porcentagem de vilos classificados no grau 4 (20%) e o único a apresentar vilos classificados no grau 5 (6%) (Figura 6). No jejuno, foi observado que a conservação da integridade dos vilos foi maior quando a substituição foi de 75% e 0% (80%, 55% vilos no grau 1, respectivamente) em comparação com 50 e 100% (29%,

16%, respectivamente). Unicamente quando a substituição foi de 100% apresentaram-se vilos classificados nos graus 4 e 5. No íleo, os vilos foram classificados principalmente dentro dos graus 1 e 2. As porcentagens de vilos no grau 1 foram 61, 56, 50 e 63% para os tratamentos com 0, 50, 75 e 100% de substituição, respectivamente. Unicamente quando a substituição foi de 100% apresentaram-se vilos classificados nos graus 3 e 4 (Figura 6).

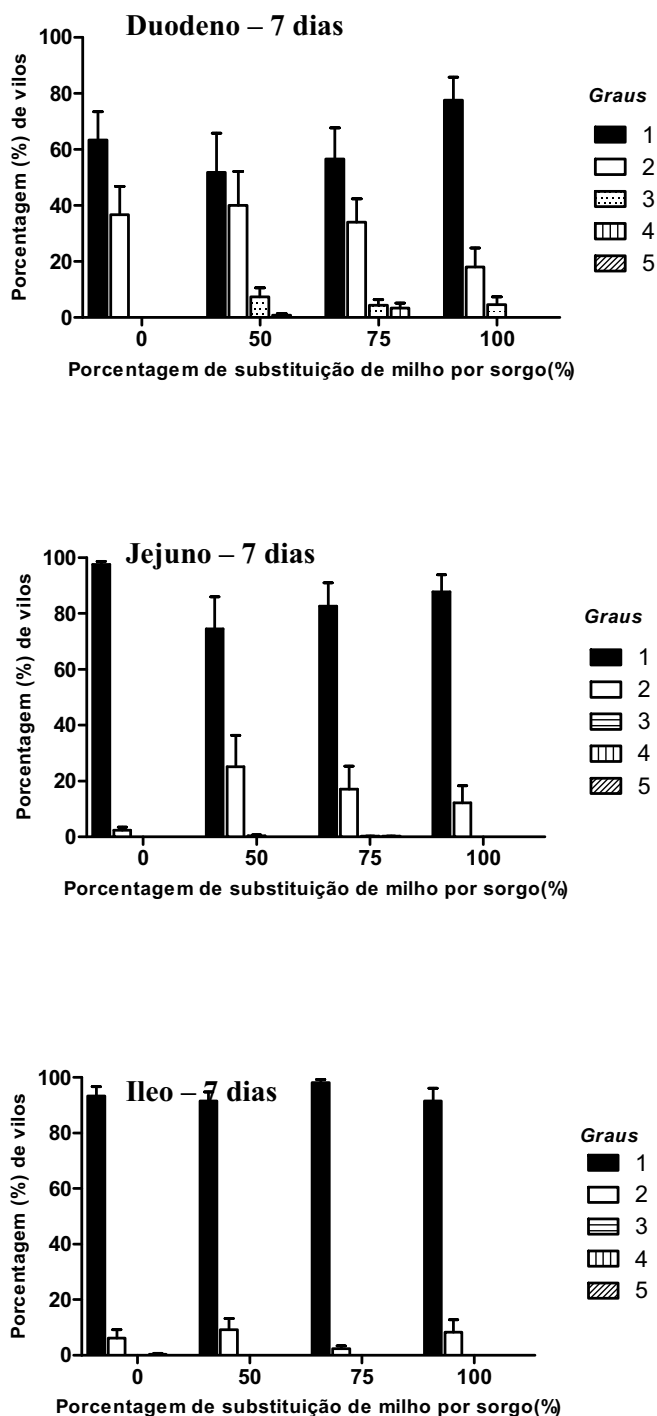


Figura 4. Classificação dos vilos da mucosa do duodeno, jejuno e íleo em frangos de corte de **sete dias** alimentados com rações contendo diferentes porcentagens de substituição de milho pelo sorgo (0, 50, 75 ou 100%). As barras representam a média \pm erro padrão da porcentagem de vilos em cada grau de classificação (desde grau 1: extrusão normal até grau 5: perda total do epitélio ou perda dos vilos). Na figura 3 são descritos em detalhe os graus de perda do epitélio da mucosa do intestino, utilizados nesta classificação.

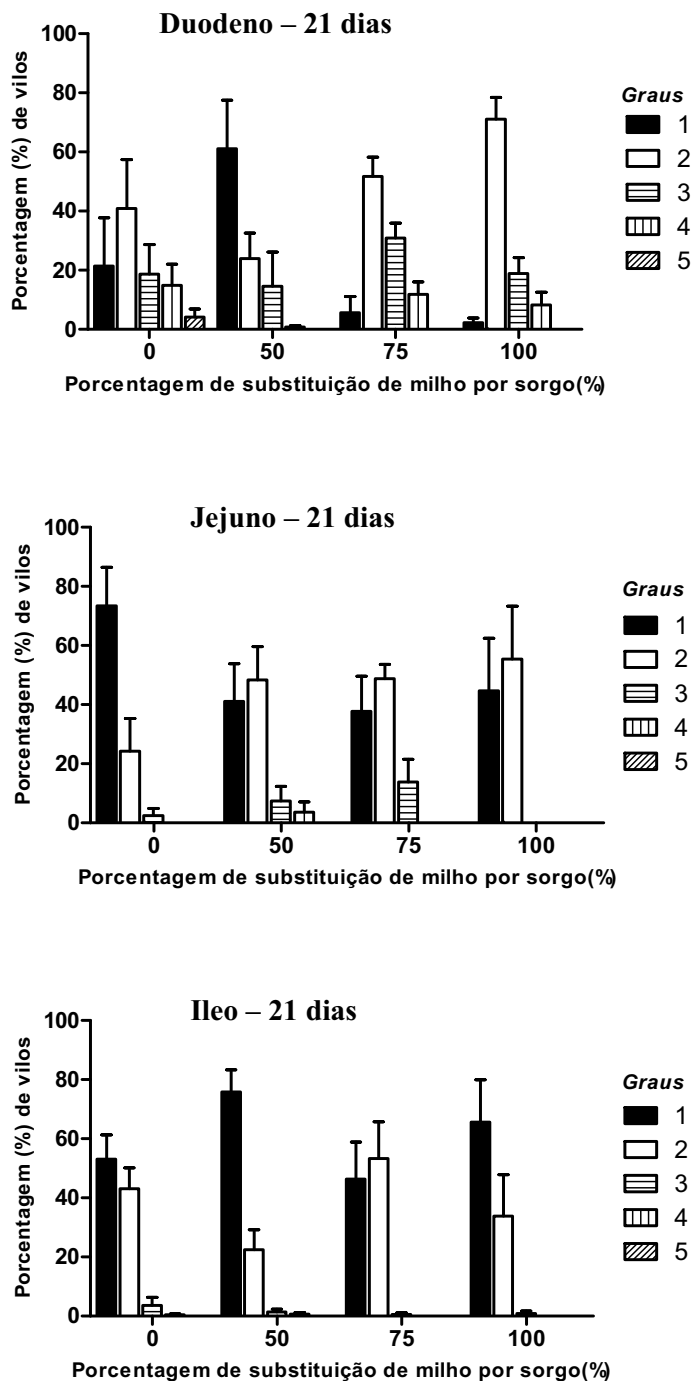


Figura 5. Classificação dos vilos da mucosa do duodeno, jejuno e íleo em frangos de corte de **21 dias** alimentados com rações contendo diferentes porcentagens de substituição de milho pelo sorgo (0, 50, 75 ou 100%). As barras representam a média \pm erro padrão da porcentagem de vilos em cada grau de classificação (desde grau 1: extrusão normal até grau 5: perda total do epitélio ou perda dos vilos). Na figura 3 são descritos em detalhe os graus de perda do epitélio da mucosa do intestino, utilizados nesta classificação.

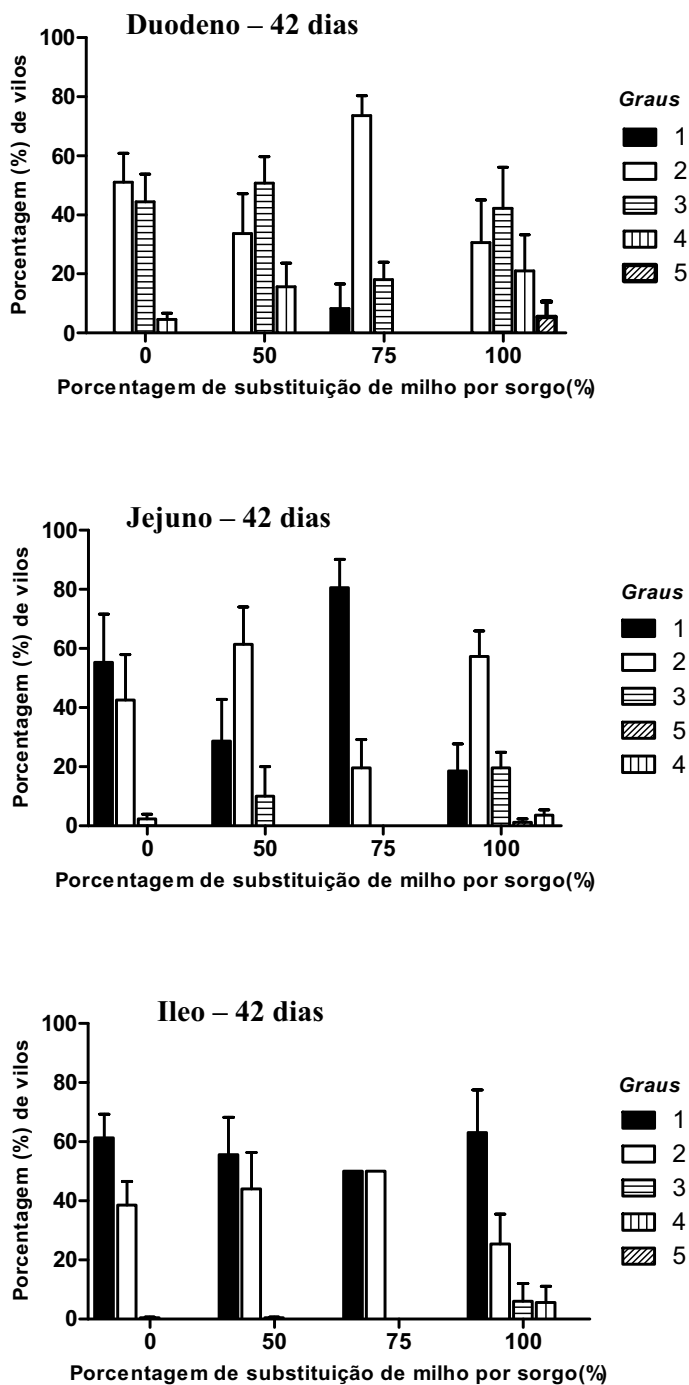


Figura 6. Classificação dos vilos da mucosa do duodeno, jejuno e íleo em frangos de corte de **42 dias** alimentados com rações contendo diferentes porcentagens de substituição de milho pelo sorgo (0, 50, 75 ou 100%). As barras representam a média \pm erro padrão da porcentagem de vilos em cada grau de classificação (desde grau 1: extrusão normal até grau 5: perda total do epitélio ou perda dos vilos). Na figura 3 são descritos em detalhe os graus de perda do epitélio da mucosa do intestino, utilizados nesta classificação.

DISCUSSÃO

Durante a primeira semana de vida o intestino delgado ganha peso mais rapidamente em relação ao ganho em peso corporal, sendo que o maior crescimento alométrico dos órgãos do trato digestório ocorre entre três e sete dias de idade (DENBOW, 2000; UNI & FERKET, 2004). No presente trabalho foi observado que a substituição total de milho por sorgo (100% de substituição) na ração levou aos maiores valores de peso do intestino delgado. Adicionalmente, os maiores valores do tamanho do vilos aos sete dias foram observados nos frangos alimentados com rações com 0 ou 100% de substituição, e não houve diferenças significativas ($p>0,05$) no grau de perda epitelial, na densidade de vilos e no número de células caliciformes em nenhum dos segmentos do intestino delgado (duodeno, jejuno, íleo) nos frangos alimentados com diferentes porcentagens de substituição do milho. Aos 21 dias de vida não foram observadas alterações na mucosa do intestino delgado. Esses resultados indicaram que o uso de sorgo durante as primeiras três semanas de vida dos frangos não alterou a morfologia da mucosa intestinal e aparentemente favoreceu o desenvolvimento do intestino delgado na primeira semana. A substituição parcial aparentemente ajudou na conservação do epitélio intestinal nas primeiras três semanas de vida. CAMPOS (2006) não observou diferenças significativas na morfometria das vilosidades intestinais nos frangos de corte alimentados com milho ou diferentes níveis de substituição do milho por sorgo. Os primeiros sete dias representam 20% da vida dos frangos e a escolha do cereal base da dieta utilizada na primeira semana é crítica para maximizar a disponibilidade de nutrientes e o desempenho durante a primeira semana de vida (THOMAS et al., 2008). Adicionalmente, as variações no crescimento da mucosa intestinal na primeira semana de vida dependem de vários fatores interagindo entre si, como o estabelecimento da microflora intestinal, a disponibilidade de enzimas digestivas, a presença de hormônios metabólicos como insulina, hormônio de crescimento, tiroxina e glicocorticoides, e a disponibilidade de nutrientes da dieta (MAIORKA et al., 2000; KOUTSOS & ARIAS, 2006).

De outro lado, no presente trabalho foi observado que aos 42 dias de vida dos frangos algumas das características da morfologia da mucosa intestinal foram afetadas pela substituição de milho por sorgo nas proporções de 75 e 100%, sendo que a altura dos vilos do duodeno e a densidade dos vilos do jejuno foram menores, houve maior perda do epitélio no duodeno e no jejuno e observaram-se os maiores índices mitóticos nas criptas.

Essas alterações podem limitar as funções de digestão e absorção do intestino delgado e poderiam implicar no desvio do uso de energia e nutrientes para o reparo da mucosa intestinal.

Os taninos hidrolizáveis também podem causar alterações histológicas na mucosa do intestino delgado. JAMROZ *et al.* (2009) descreveram que no jejuno de frangos que receberam ração com inclusão de 1000 mg de tanino hidrolisável por kg de ração houve ativação da imunidade local, com infiltração do tecido conectivo sub-epitelial por numerosos macrófagos, mastócitos, neutrófilos e linfócitos. Adicionalmente, observaram diminuição do número de células em proliferação nas criptas e enterócitos mostrando sinais de degradação. Entretanto, CAMPOS (2006) não observou diferenças significativas na altura dos vilos, profundidade das criptas e número de células calciformes na mucosa intestinal de frangos de sete, 21 e 42 dias alimentados com rações contendo milho e diferentes níveis de substituição do milho por sorgo.

Milho e sorgo sem tanino apresentam valores nutricionais similares, sendo que o cultivar de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) altamente digestível apresenta uma taxa de digestibilidade de proteína 10% maior em relação ao sorgo comum e apresenta maior teor de amido digestível (DOWLING *et al.*, 2002). Adicionalmente, a energia metabolizável aparente corrigida para nitrogênio e a digestibilidade do amido, nos primeiros sete dias de vida dos frangos, não diferem nos frangos alimentados com rações à base de milho ou sorgo, no entanto a digestibilidade da gordura é menor nos frangos alimentados com sorgo (THOMAS *et al.*, 2008). Entretanto, de forma prática, existe receio do uso de sorgo sem tanino, principalmente da inclusão na dieta pré-inicial (CAMPOS, 2006). Em rações calculadas a custo mínimo, o milho não é completamente substituído pelo sorgo (ROSTAGNO *et al.*, 2001), em parte devido aos efeitos adversos sobre a pigmentação da pele e carne dos frangos, ao menor teor dos aminoácidos lisina, metionina e treonina, menor digestibilidade de proteína e à presença de fatores antinutricionais, como os taninos. Esses fatores limitam o nível prático de inclusão do sorgo a 30% tanto na ração inicial quanto na ração de crescimento (ROSTAGNO *et al.*, 2005).

CONCLUSÕES

Concluiu-se que a substituição de milho pelo sorgo na ração de frangos de corte até os 21 dias não prejudica a mucosa do intestino delgado. No entanto, o uso de rações com substituição total do milho pelo sorgo até os 42 dias, prejudica a estrutura das vilosidades da superfície mucosa, principalmente no duodeno e no jejuno, com alterações da forma (menor altura dos vilos do duodeno e menor densidade dos vilos do jejuno) e da integridade dos vilos (marcada perda epitelial), sendo alterações que podem limitar as funções de digestão e absorção do intestino delgado e poderiam implicar no desvio do uso de energia e nutrientes para o reparo da mucosa intestinal.

REFERÊNCIAS

- ANTUNES R.C.; RODRIGUEZ, N.M.; GONÇALVES, L.C.; RODRIGUES, J.A.S.; BAIÃO, N.C.; PEREIRA, L.G.R.; LARA, L.J. Valor nutritivo de grãos de sorgo com diferentes texturas do endosperma para frangos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 5, p. 877-883, 2006.
- BOLELI, I. C. MAIORKA, A., MACARI, M. Estrutura Funcional do Trato Digestório. In: MACARI, M.; FURLAN, R.L.; GONZALES, E. (ed.). **Fisiologia Aviária: Aplicada a frangos de corte**. 2 ed. Jaboticabal: FUNEP, 2002. p. 75-95.
- CAMPOS, D.M.B. **Efeito do sorgo sobre o desempenho zootécnico, características da carcaça e o desenvolvimento da mucosa intestinal de frangos**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.
- CHANG, J.J., BAILEY, J. W., COLLINS, J. L. Dietary tannins from cowpeas and tea transiently alter apparent calcium absorption and utilization of protein in rats. **Journal of Nutrition**, v.124, p.283-88, 1994.
- DENBOW, D.M. Gastrointestinal anatomy and physiology. In: Whittow G.C. (Ed). **Sturkie's avian physiology**. 5th ed. San Diego. Academic Press, 2000. p. 299-325.

DOWLING, L. F., ARNDT, C., HAMAKER, B. R. Economic Viability of high digestibility sorghum as feed for market broilers. **Agronomy Journal**, v. 94, p. 1050-1058, 2002.

GOMIDE Jr., M.H.; STERZO, E.V.; MACARI, M.; BOLELI I.C. Use of Scanning Electron Microscopy for the Evaluation of Intestinal Epithelium Integrity. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.6, p.1500-1505, 2004.

JAMROZ, D.; WILICZKIEWICZ, A.; SKORUPIŃSKA, J.; ORDA, J.; KURYSZKO, J.; TSCHIRCH, H. Effect of sweet chestnut tannin (SCT) on the performance, microbial status of intestine and histological characteristics of intestine wall in chickens. **British Poultry Science** v. 50, n. 6, p. 687-699, 2009.

KOUTSOS, E.A.; ARIAS, V.J. Intestinal ecology: interactions among the gastrointestinal tract, nutrition, and the microflora. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 15, p. 161-173, 2006.

LITTELL, R.C.; STROUP, W.W.; FREUND, R.J. **SAS for linear models**. 4.ed. Cary, NC: SAS Institute, 2002.

MAIORKA, A.; SILVA, A.V.F.; SANTIN, E.; BORGES, S.A.; BOLELI, I.C.; MACARI, M. Influência da suplementação de glutamina sobre o desempenho e o desenvolvimento de vilos e criptas do intestino delgado de frangos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, n. 5, 2000.
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352000000500014

MAIORKA, A., BOLELI, I. C., MACARI, M. Desenvolvimento e reparo da mucosa intestinal. In: MACARI, M.; FURLAN, R.L.; GONZALES, E. (ed.). **Fisiologia Aviária: Aplicada a frangos de corte**. 2 ed. Jaboticabal: FUNEP, p. 113-123, 2002.

MAIORKA, A.; SANTIN, E.; DAHLKE, F.; BOLELI, I.C.; FURLAN, R.L.; MACARI, M. Posthatching water and feed deprivation affect the gastrointestinal tract and intestinal mucosa development of broiler chicks. **Journal of applied poultry research**, v. 12; p. 483-492, 2003.

MITJAVILA, S., LACOMBE, C., CARRERA, G., DERACHE, R. Tannic acid and oxidized tannic acid on the functional state of rat intestinal epithelium. **Journal of Nutrition**. v. 107, 2113-2121. 1977.

MURAKAMI, A.E.; SAKAMOTO, M.I.; NATALI, M.R.M.; SOUZA, L.M.G.; FRANCO, J.R.G. Supplementation of glutamine and vitamin E on the morphometry of the intestinal mucosa in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 86, p. 488-495, 2007.

RASBAND, W.S. Image J, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA.
<http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 2004.

ROSTAGNO H.S.; ALBINO, L.F.T; TOLEDO, R.S. Utilização de sorgo nas rações de aves e suínos. Artigo Técnico Polinutri Junho/2001.
http://www.polinutri.com.br/conteudo_artigos_anteriores_junho.htm Acesso 26/01/2010.

ROSTAGNO H.S.; ALBINO, L.F.T; DONZELE, J.L.; GOMES, P.C.; OLIVEIRA R.F.; LOPES D.C.; FERREIRA A.S.; BARRETO, S.L.T. **Tabelas brasileiras para aves e suínos. Composição de alimentos e exigências nutricionais**. 2ª edição. Ed: Rostagno H.S. UFV-Departamento de Zootecnia, Viçosa-MG, 2005.

SILVA, A.V.F.; MAIORKA, A.; BORGES, S.A.; SANTIN, E.; BOLELI, I.C.; MACARI, M. Surface área of the enterocytes in small intestine mucosa of broilers submitted to early feed restriction and supplemented with glutamine. **International Journal of Poultry Science**, v. 6, n. 1, p. 31-35, 2007.

THOMAS, D.V.; RAVINDRAN, V.; RAVINDRAN, G. Nutrient digestibility and energy utilisation of diets based on wheat, sorghum or maize by the newly hatched broiler chick. **British Poultry Science**, v. 49, n. 4, p. 429—435, 2008.

UNI, Z. Functional development of the small intestine in domestic birds: Cellular and molecular aspects. **Poultry and Biology Reviews**. p. 167-179, 1999.

UNI, Z., FERKET, R. P. methods for early nutrition and their potential. **Poultry Science**, v. 60, p. 101-111, 2004.

CAPÍTULO 4 – ATIVIDADE DAS ENZIMAS DA BORDA EM ESCOVA DA MUCOSA DO JEJUNO EM FRANGOS ALIMENTADOS COM DIFERENTES NIVEIS DE SUBSTITUIÇÃO DO MILHO PELO SORGO DA RAÇÃO

RESUMO

Este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito da substituição do milho pelo sorgo da ração sobre a atividade das enzimas aminopeptidase, fosfatase alcalina intestinal e maltase, contidas em vesículas de membrana da borda em escova (VMBE) obtidas a partir da mucosa do jejuno de frangos de corte. Foram utilizados 72 pintos de um dia machos, Cobb-500, distribuídos em delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos (0, 50, 75 ou 100% de substituição do milho pelo sorgo) e seis repetições. Os frangos receberam as rações experimentais do 1º ao 42º dia. No 7º, 21º e 42º dia um frango por repetição mantido em jejum de cinco horas foi sacrificado. Foram coletadas amostras do jejuno (20 cm), abertas longitudinalmente, lavadas com PBS (pH 7,4 a 4°C) e conservadas em freezer a -70°C. VMBE foram obtidas por homogeneização e fracionamento por centrifugações seriadas da mucosa do jejuno. As atividades específicas das enzimas aminopeptidase, fosfatase alcalina intestinal e maltase foram determinadas. Pelos resultados obtidos concluiu-se que o uso de rações contendo altas porcentagens de substituição de milho pelo sorgo (75 ou 100%) desde o primeiro dia de vida dos frangos diminui a atividade das enzimas aminopeptidase e maltase aos 42 dias de vida. A atividade da fosfatase alcalina intestinal não é afetada pela substituição de milho pelo sorgo na ração.

Palavras-chave: Aminopeptidase, fosfatase alcalina, maltase, vesículas de membrana da borda em escova (VMBE).

INTRODUÇÃO

As enzimas digestivas ancoradas na membrana em escova dos enterócitos da mucosa intestinal são responsáveis pela digestão final de muitas das macromoléculas da dieta, apresentam um papel importante na regulação da quantidade de nutrientes disponíveis para absorção. Além da função digestiva algumas das enzimas estão envolvidas em outras funções como transporte de nutrientes, recepção de sinais intracelulares e regulação da diferenciação e crescimento celular (IJI, *et al.*, 2001).

As mudanças temporais nas enzimas do intestino delgado são paralelas à maturação da função digestiva em outras partes do trato gastrointestinal (HENNING, 1985). A atividade das enzimas de membrana no jejuno de frangos começa ainda na idade embrionária. UNI *et al.* (2003) avaliaram a atividade da maltase e aminopeptidase, e das proteínas transportadoras ATPase e SGLT-1 em embriões de frango entre 15 e 21 dias. Os autores observaram que a maltase tem atividade baixa até o 19º dia de idade embrionária, e no 21º aumenta aproximadamente duas vezes. A atividade da aminopeptidase e das proteínas transportadoras ATPase e SGLT-1 aumentam gradativamente do 15º ao 21º dia. Um pico de expressão de mRNA das enzimas sacarase-isomaltase e aminopeptidase, e das proteínas transportadoras ATPase e SGLT-1 apresenta-se no 19º dia de incubação (UNI *et al.*, 2003).

A atividade enzimática varia dependendo da presença ou ausência de substratos, por exemplo, no caso dos mamíferos a atividade hidrolítica intestinal ao nascimento é específica e restrita aos componentes do leite materno, com alta atividade da lactase e baixa atividade da maltase nas primeiras duas semanas. Posteriormente, a atividade da maltase aumenta de cinco a 10 vezes pela presença de carboidratos da dieta e a atividade da lactase diminui após o desmame (HENNING, 1985). Em frangos também é observado que a atividade de dissacaridases, especialmente a maltase, é um reflexo da natureza da dieta consumida. As aves são deficientes em amilase salivar, e somente as carboidratases pancreática e intestinal atuam na digestão de carboidratos (IJI, *et al.*, 2001).

A membrana da borda em escova do intestino delgado está envolvida em numerosos processos digestivos e de transporte ativo. Tem sido demonstrado que ditos processos podem ser pesquisados *in vitro* quando a membrana intacta é isolada em forma de vesículas LOUVARD *et al.* (1973).

Nos estudos que descreveram inicialmente os procedimentos de obtenção de VMBE, a fosfatase alcalina era considerada um marcador da membrana da borda em escova, e por isso era determinada (LOUVARD *et al.*, 1973; MAROUX *et al.*, 1973, KESSLER *et al.*, 1978). Em estudos recentes em mamíferos, a atividade da fosfatase alcalina da membrana em escova do intestino delgado, tem sido associada com duas funções digestivas importantes, uma atuando como um componente principal da barreira imune da mucosa do intestino porque tem a habilidade de diminuir a toxicidade e hidrolisar lipopolissacarídeos, e de prevenir a invasão bacteriana através da mucosa (GEDDES & PHILPOTT, 2008; GOLDBERG *et al.*, 2008). A outra função está relacionada com a regulação da absorção de lipídeos, sendo demonstrado que ratos deficientes em fosfatase alcalina intestinal e alimentados com dietas ricas em gordura apresentaram um acelerado transporte de gordura através do intestino e níveis elevados de triglicérides séricos (NARISAWA *et al.*, 2003). MAROUX *et al.* (1973) purificaram a enzima aminopeptidase e concluíram que esta enzima é responsável por quase toda a atividade peptidase da membrana em escova isolada a partir da mucosa de jejuno e íleo de suíno.

Este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito da substituição do milho pelo sorgo da ração sobre a atividade das enzimas aminopeptidase, fosfatase alcalina intestinal e maltase contidas em VMBE (vesículas de membrana da borda em escova), obtidas a partir da mucosa do jejuno de frangos de corte. Foram escolhidas estas enzimas devido à maior concentração relativa dos seus substratos naturais na dieta dos frangos, proteínas no caso da aminopeptidase e carboidratos no caso da maltase. A fosfatase alcalina foi determinada pela relação com as funções de absorção de lipídeos e componente da barreira da mucosa intestinal, descritas anteriormente.

MATERIAL E MÉTODOS

O desenho experimental, as aves, as dietas e o manejo utilizados no experimento foram descritos no Capítulo 2 item “Desenho experimental, aves e dietas”.

Colheita de amostras

As amostras foram coletadas nas mesmas aves descritas no Capítulo 3, lembrando que foi escolhida uma ave com o peso médio por cada repetição, nas idades de 7, 21 e 42

dias, e que estas aves permaneceram cinco horas em jejum e, posteriormente, foram sacrificadas por deslocamento cervical. Foram coletadas amostras de aproximadamente 20 centímetros do jejuno (correspondendo à porção do intestino delgado posterior a alça duodenal e anterior ao divertículo de Meckel). As amostras foram abertas longitudinalmente, grampeadas pelos extremos sobre papelão e a mucosa foi lavada com solução salina tamponada (pH 7,4) a 4°C. As amostras foram envolvidas em papel de alumínio, congeladas em nitrogênio líquido e conservadas em freezer a -70°C para posterior processamento e análise no Laboratório de Enzimologia Aplicada (LEA), do Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, Campus de Jaboticabal- SP.

Obtenção de vesículas de membrana da borda em escova (VMBE) a partir da mucosa do jejuno

Os procedimentos para a obtenção de VMBE foram baseados no trabalho de LOUVARD *et al.* (1973), No entanto, foram realizadas algumas modificações como descrito a seguir (ver esquema geral do procedimento na Figura 1).

Todos os procedimentos de homogeneização e centrifugação foram realizados a 4°C. Com a ajuda de uma espátula foi raspada a superfície interna do jejuno para obter a camada mucosa, a qual foi suspensa 1:10 (peso/volume) em tampão 10 mM Tris-HCl (pH 7,3) contendo 1 mM de CaCl₂, 10 mM de MgCl₂ e 0,25 M de sacarose. A suspensão foi processada em homogeneizador⁸ a 20000 rpm, durante três períodos de 30 segundos cada. O homogeneizado foi centrifugado⁹ a 3000xg por 8 min. De acordo com LOUVARD *et al.* (1973) com esta centrifugação foi possível precipitar o muco, as células intactas, os restos de tecidos e núcleos. Por isso, o precipitado foi descartado e o sobrenadante foi reservado para continuar o processo de purificação.

O sobrenadante (S1) foi filtrado usando fibra de vidro e centrifugado a 8000xg por 10 min e sem retirá-lo da centrífuga foi submetido a um período adicional de 8 min a 12000xg, para assim obter o Sobrenadante (S2) contendo a maior parte dos marcadores de borda em escova e praticamente nenhum núcleo (LOUVARD *et al.*, 1973). Dessa forma, o

⁸ Omni International GLM

⁹ Himac CR21E, Hitachi - Japão.

precipitado foi descartado e o S2 foi submetido a 105000xg por 30 min em ultracentrífuga¹⁰. Nesta oportunidade, o sobrenadante foi descartado e o precipitado (P1) foi reservado para continuar o processo de obtenção das VMBE.

O P1 foi submetido a tratamento alcalino, para extrair as proteínas solúveis incluídas no lúmen das vesículas de membrana (MELDOLESI *et al.*, 1971). Para isso, o P1 foi re-suspendido em tampão (tampão A) 10 mM Tris-HCl [pH 7.3] contendo 0.17 M NaCl, 10 mM MgCl₂ e 1 mM CaCl₂, em volume equivalente a 0,22 x ½ do volume do S2 e foi homogeneizado em agitador mecânico tipo *Potter*¹¹. A suspensão resultante foi diluída em tampão alcalino 0,2 M Tris-HCl (pH 7.8) contendo 10 mM MgCl₂ e 1 mM CaCl₂ em volume equivalente a 0,78 x ½ do volume do S2, e novamente foi homogeneizado no agitador tipo *Potter*. Dessa forma, as proporções de tampões para o tratamento alcalino foram ajustadas para um volume final equivalente à metade do volume do S2.

A suspensão resultante foi centrifugada a 8000xg por 5 min, e posteriormente o sobrenadante foi descartado e o precipitado (P2) foi re-suspendido no tampão A, homogeneizado no “Potter”, filtrado e dividido em alíquotas (de 200 µl) que foram congeladas em nitrogênio líquido e estocadas em freezer a -70°C, para posterior determinação da atividade enzimática (ver esquema geral do procedimento na Figura 1).

Para verificar o fator de purificação das enzimas aminopeptidase, fosfatase alcalina intestinal e maltase foi determinada a atividade das enzimas em todas as frações obtidas durante o processo de obtenção de VMBE a partir de mucosa do jejuno. O fator de purificação das enzimas foi calculado pelo quociente da atividade da enzima em cada fração obtida em relação à atividade na fração inicial (homogeneizado). Também foi verificada a repetibilidade do procedimento pelo fracionamento de três amostras procedentes da mesma amostra inicial.

¹⁰ Optima™ LE-80K Ultracentrifuge, Beckman - USA.

¹¹ TE-039 Série 990-98, Tecnal Equipamentos para Laboratório Ltda – Brasil.

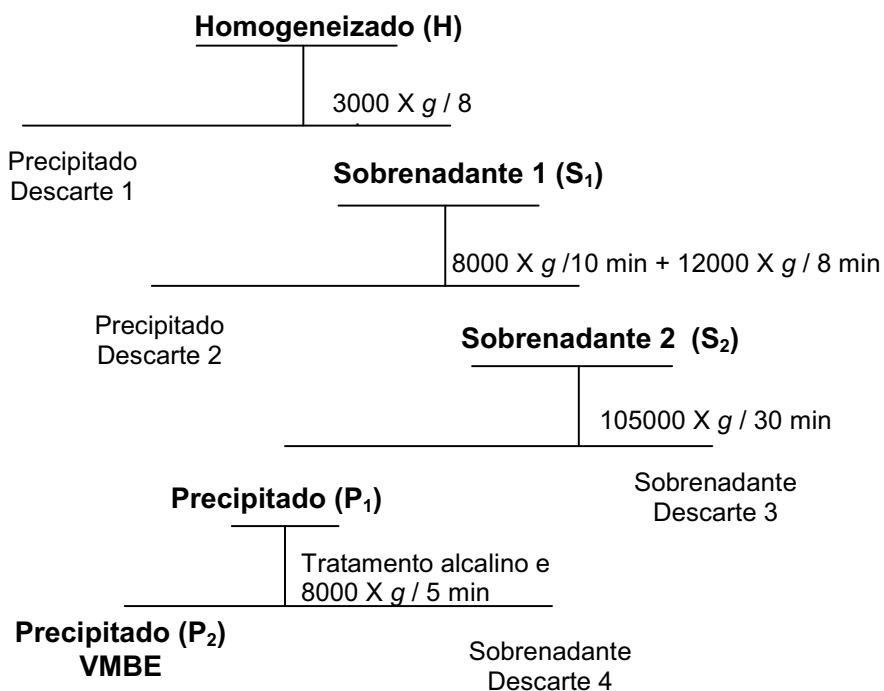


Figura 1. Esquema geral do procedimento utilizado para a obtenção de vesículas de membrana da borda em escova (VMBE) de amostras de jejuno de frangos de corte, baseado em Louvard *et al.* (1973).

Determinação da atividade da Aminopeptidase

A atividade da aminopeptidase (EC 3.4.11.2) foi determinada como descrito por RUEDA *et al.* (2007), em meio de reação contendo 25 μl de BBMV, 250 μl de tampão 50mM imidazol, pH 7,5, e 125 μl de 1,6 mM L-leucine-p-nitroanilide (diluído em dimetil-sulfoxido). Depois de 15 min de incubação a 41°C, a reação foi interrompida pela adição de 250 μl de ZnSO_4 (5% p/v). A atividade enzimática foi expressa como nmoles de p-nitroanilida produzidos por minuto por mg de proteína. O valor de $\epsilon_{(1M, pH7,5)} = 9705 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 405 nm foi calculado pela equação de Beer-Lambert a partir de uma reta padrão de diferentes concentrações de p-nitroanilina¹² variando de 3,0 a 1,0 nmoles no meio de reação. Uma unidade de atividade enzimática foi definida e expressa como nmoles de p-nitroanilina liberados por minuto por mg de proteína (U/mg de proteína).

¹² Sigma Sigma-Aldrich - St. Louis, USA

Determinação da atividade da Fosfatase Alcalina intestinal

Para a determinação da atividade da fosfatase alcalina (EC 3.1.3.1), VMBE (0,12 ml) foram incubadas a 41°C na presença de tampão 2-amino-2-metil-1-propanol (AMPOL) 59 Mm, pH 9,4, contendo 2 mM MgCl₂ e 1 mM p-nitrofenilfosfato¹¹ em volume final de 1,0 ml. A reação foi iniciada pela adição das VMBE e interrompida com 1,0 ml de 1,0M NaOH depois de seis minutos. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro¹³ a 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida e expressa como nmoles de p-nitrofenol liberados por minuto por mg de proteína (U/mg de proteína) (PIZAURO *et al.*, 1995).

Determinação da atividade da Maltase

A atividade da maltase foi determinada seguindo a metodologia descrita por DAHLQVIST (1964) e KIDDER & MANNERS (1980). A atividade da maltase foi determinada em meio de reação contendo tampão fosfato (0,25 M), EDTA (6,25 μ M), maltose (0,125 M), pH 6,5 e duas gotas de tolueno, em um volume final de 1 ml, a 37°C. A reação foi iniciada pela adição de VMBE ao meio de reação e interrompida pela transferência dos tubos para banho-maria em ebulição durante dois minutos e posterior resfriamento no gelo. Em seguida, o material foi centrifugado em microcentrífuga SPIN I durante 2 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi utilizado para dosagem de glicose utilizando-se o kit Glicose PAP liquiform¹⁴. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro¹² a 505 nm.

Em cada ensaio foi incluída uma reta padrão com concentrações de maltose variando de 0 a 0,4 mg/mL de solução. Uma unidade de atividade enzimática foi definida e expressa como nmoles de glicose liberados por minuto por mg de proteína (U/mg de proteína).

As atividades das enzimas aminopeptidase, fosfatase alcalina intestinal e maltase foram determinadas em triplicata. Em cada determinação foi incluído um controle (branco) para se estimar a hidrólise espontânea do substrato, no qual a amostra foi adicionada

¹³ Hitachi® U-2000 – Japão.

¹⁴ Biodiagnostica.

depois de terminada a reação. A proteína total de todas as amostras foi determinada pelo método descrito por HARTREE (1972), usando soro albumina bovino como padrão.

Análise estatística

O efeito da substituição de sorgo pelo milho (em porcentagem) sobre as variáveis foi avaliado pela análise de variância (*one-way-ANOVA*), sendo que previamente foi verificada a presença de dados discrepantes (*Box-&Whisker plot*), a distribuição normal dos erros estudatizados (teste de Cramer-Von-Mises) e a homogeneidade das variâncias (teste de Brown-Forsythe) (LITTELL *et al.*, 2002). Já que as pressuposições foram atendidas, o efeito da substituição de milho pelo sorgo (em porcentagem) sobre a atividade das enzimas aminopeptidase, fosfatase alcalina e maltase foi avaliado pelo valor de *p* ao nível de significância de 0,05, usando o procedimento *General Linear Model* do programa SAS versão 9.0. Quando as diferenças foram significativas, os graus de liberdade de tratamentos foram desdobrados em efeito linear, quadrático e cúbico. Os gráficos apresentados foram realizados no programa GraphPad Prism® Versão 5.0 para Windows.

RESULTADOS

Fator de purificação das enzimas de membrana fosfatase alcalina, aminopeptidase e maltase e repetibilidade do procedimento de obtenção de VMBE

Na Tabela 1 são apresentados o volume total (ml), a proteína (mg/ml) e a proteína total (mg) de cada fração; a atividade enzimática total (U), a atividade enzimática por ml (U/ml), a atividade enzimática específica (U/mg de proteína) e o fator de purificação das enzimas de membrana, aminopeptidase, fosfatase alcalina e maltase em cada uma das frações obtidas no processo de purificação parcial das VMBE a partir da mucosa do jejuno de frangos. O fator de purificação foi calculado como o quociente da atividade específica da fração em relação à atividade específica do homogeneizado. Observou-se que a fração utilizada no presente trabalho (Precipitado 2- VMBE) teve um fator de purificação de 4,72 vezes para aminopeptidase, 11,47 vezes para fosfatase alcalina e 6,04 vezes para maltase. A repetibilidade do procedimento de obtenção de

VMBE foi demonstrada pela obtenção de valores da atividade da fosfatase alcalina de três ensaios feitos com a mesma amostra, os que tiveram desvio padrão inferior a 5% (Tabela 2).

Tabela 1. Volume, proteína, atividade total e específica e fator de purificação das enzimas de membrana fosfatase alcalina, aminopeptidase e maltase em cada uma das frações obtidas no processo de purificação parcial das VMBE¹ a partir da mucosa do jejuno de frangos.

Fração	Volume (ml)	Proteína (mg/ml)	Proteína Total (mg)	Aminopeptidase				Fosfatase Alcalina				Maltase			
				U/ml	UT	U/mg	Fator de purificação	U/ml	UT	U/mg	Fator de purificação	U/ml	UT	U/mg	Fator de purificação
Homogeneizado	40,0	15,16	606,4	1776	71060	117	1,00	1747	69886	115	1,00	415	16602	27	1,00
Sobrenadante 1	35,5	5,85	207,8	1518	53872	259	2,21	1697	60231	290	2,52	275	9778	47	1,74
Precipitado (Descarte 1)	10,0	19,96	199,6	1128	11276	56	0,48	1501	15009	75	0,65	358	3581	18	0,67
Sobrenadante 2	33,0	5,23	172,6	1632	53870	312	2,67	1118	37500	217	1,89	215	7101	41	1,52
Precipitado (Descarte 2)	10,0	2,67	26,7	1509	15086	564	4,82	1758	17582	658	5,72	448	4476	167	6,18
Sobrenadante (Descarte 3)	29,0	3,94	11,3	324	9401	82	0,70	318	8971	79	0,69	31	905	8	0,30
Precipitado 1	15,0	2,03	30,4	1507	22611	743	6,35	2718	39915	1312	11,41	383	5741	189	7,00
Sobrenadante (Descarte 4)	12,0	2,13	23,9	1073	12874	503	4,30	1698	20379	795	6,91	323	3874	162	6,00
Precipitado 2 VMBE	3,0	1,71	5,1	942	2826	552	4,72	2326	6761	1320	11,47	278	835	163	6,04

¹ VMBE= vesículas de membrana da borda em escova; U= Unidades de atividade enzimática em nmoles do produto liberado por minuto; UT= Unidades totais; U/mg= Unidades por mg de proteína. O fator de purificação foi calculado como o quociente da atividade específica da fração em relação à atividade específica do homogeneizado.

Tabela 2. Repetibilidade do procedimento de obtenção de VMBE. O processo de obtenção de VMBE de uma mesma amostra foi repetido três vezes e foi determinada a atividade específica da fosfatase alcalina para cada repetição. A repetibilidade foi indicada pela obtenção do desvio padrão inferior a 5%.

Fração	Repetição	Atividade da Fosfatase Alcalina
Precipitado 2	1	3092
	2	3335
	3	3305
Média		3244
Desvio Padrão		133

Atividade das enzimas aminopeptidase, fosfatase alcalina intestinal e maltase em VMBE obtidas do jejuno dos frangos

Aminopeptidase

Na Figura 2 são apresentadas as médias \pm erro padrão dos valores e os resultados da análise de variância realizada para verificar o efeito do tratamento sobre a atividade da enzima aminopeptidase dentro de cada idade. Foi observado que nas idades de sete e 21 dias não houve efeito significativo da porcentagem de substituição de milho pelo sorgo ($p>0,05$). No entanto, aos 42 dias houve efeito linear significativo em função do tratamento ($p<0,05$), com maior atividade da aminopeptidase nos frangos alimentados rações contendo 0 ou 50% de substituição do milho pelo sorgo e menor atividade quando alimentados com 75 ou 100% de substituição. Os valores médios aos 42 dias (728, 702, 487 e 542 U/mg de proteína, para os tratamentos 0, 50, 75 e 100%, respectivamente) indicaram uma diminuição na atividade da aminopeptidase de 4, 33 e 25% nos tratamentos com 50, 75 e 100% de substituição do milho, respectivamente, quando comparados com o tratamento com 0% de sorgo na ração (Figura 2).

Fosfatase Alcalina intestinal

Na Figura 3 são apresentadas as médias \pm erro padrão dos valores e os resultados da análise de variância realizada para verificar o efeito do tratamento sobre a atividade da enzima fosfatase alcalina intestinal dentro de cada idade. De

acordo com a análise, não houve efeito da porcentagem de substituição de milho pelo sorgo na ração sobre a atividade da fosfatase alcalina aos 7, 21 e 42 dias ($p>0,05$) (Figura 3).

Maltase

Na Figura 4 são apresentadas as médias \pm erro padrão dos valores e os resultados da análise de variância realizada para verificar o efeito do tratamento sobre a atividade da enzima maltase dentro de cada idade. Foi observado que nas idades de sete e 21 dias não houve efeito significativo da porcentagem de substituição de milho pelo sorgo ($p>0,05$). No entanto, aos 42 dias os efeitos, linear e cúbico, em função do tratamento foram significativos ($p<0,05$). Apresentou-se maior atividade da maltase nos frangos alimentados rações contendo 50% de substituição do milho pelo sorgo seguida pela atividade dos frangos alimentados com rações sem sorgo (0% de substituição). Os menores valores de atividade da maltase foram observados nos frangos alimentados com rações contendo 75 ou 100% de substituição (Figura 4).

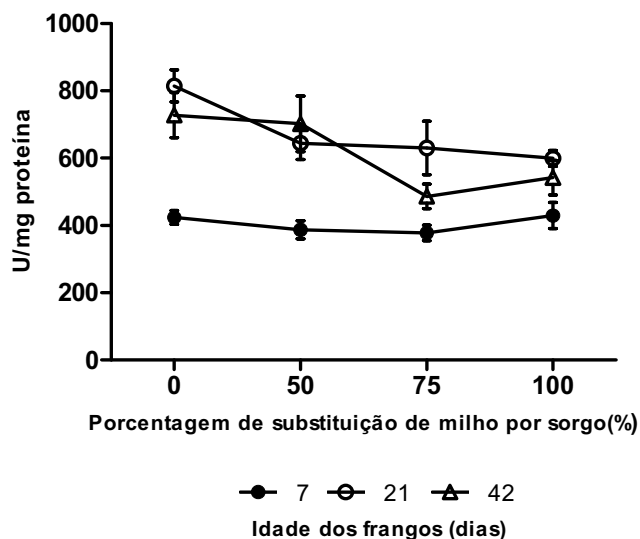


Figura 2. Atividade da Aminopeptidase ligada à membrana (U/mg proteína) obtida na mucosa do jejuno de frangos de corte de 7, 21 e 42 dias de idade, os quais foram alimentados com diferentes porcentagens de sorgo (0, 50, 75 e 100%) em substituição ao milho da ração. Valores expressos como a média \pm erro padrão de seis repetições por tratamento.

Análise de variância e coeficientes de variação (CV%) para o efeito do tratamento:
Aos 7 ($p=0,51$; CV= 17,06%), 21 ($p=0,12$; CV=21,50%) e 42 ($p=0,03^*$; CV=24,55%) dias de idade.

* Desdobramento dos graus de liberdade de tratamentos em efeitos:
Linear ($p=0,01$), quadrático ($p=0,51$) e cúbico ($p=0,11$), da atividade da enzima aminopeptidase aos 42 dias de idade.

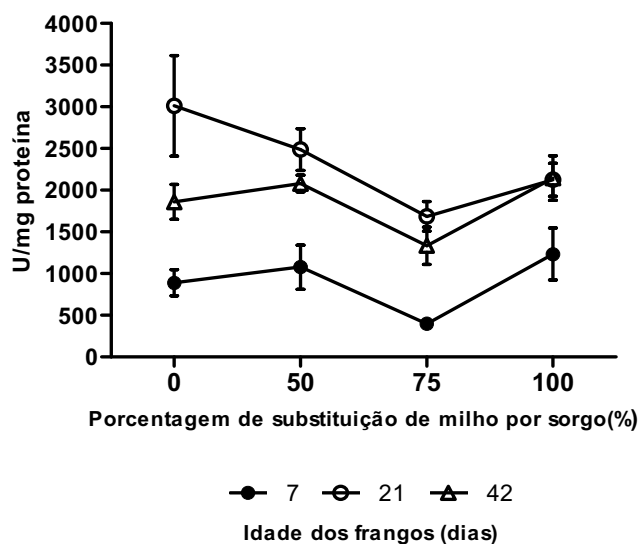


Figura 3. Atividade da fosfatase alcalina intestinal ligada à membrana (U/mg proteína) obtida na mucosa do jejuno de frangos de corte de 7, 21 e 42 dias de idade, os quais foram alimentados com diferentes porcentagens de sorgo (0, 50, 75 e 100%) em substituição ao milho da ração. Valores expressos como a média \pm erro padrão de seis repetições por tratamento.

Análise de variância e coeficientes de variação (CV%) para o efeito do tratamento:
Aos 7 ($p=0,17$; CV= 59,82%), 21 ($p=0,06$; CV=33,63%) e 42 ($p=0,05$; CV=27,76%) dias de idade.

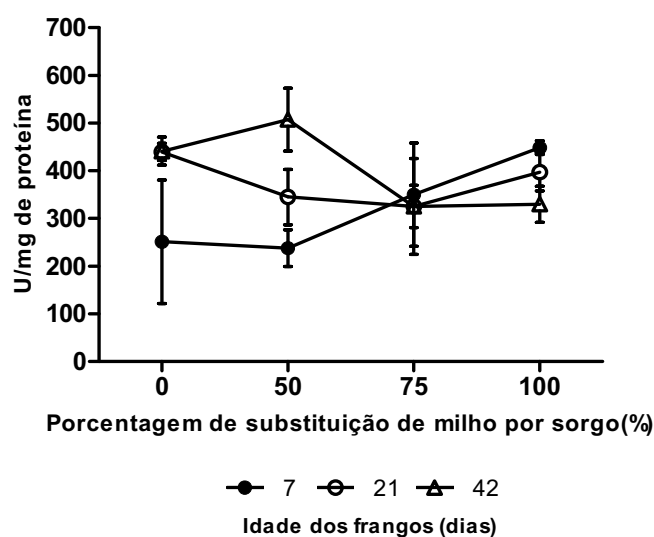


Figura 4. Atividade da enzima Maltase ligada à membrana (U/mg proteína) obtida na mucosa do jejuno de frangos de corte de 7, 21 e 42 dias de idade, os quais foram alimentados com diferentes porcentagens de sorgo (0, 50, 75 e 100%) em substituição ao milho da ração. Valores expressos como a média \pm erro padrão de seis repetições por tratamento.

Análise de variância e coeficientes de variação (CV%) para o efeito do tratamento:
Aos 7 ($p=0,12$; CV= 32,73%), 21 ($p=0,45$; CV=32,61%) e 42 ($p<0,01^*$; CV=20,26%) dias de idade.

* Desdobramento dos graus de liberdade de tratamentos em efeitos:
Linear ($p<0,01$), quadrático ($p=0,08$) e cúbico ($p<0,01$), da atividade da enzima maltase aos 42 dias de idade.

DISCUSSÃO

Fator de purificação das enzimas

No presente trabalho foram obtidas VMBE seguindo o protocolo descrito anteriormente pelo que foi possível obter um fator de purificação da fração utilizada no estudo (Precipitado 2) de 4,7 para aminopeptidase e 10 para fosfatase alcalina. Os valores de atividade enzimática variam com a idade dos frangos e este fracionamento demonstrativo foi realizado com mucosa do jejuno de frangos de 28 dias, o que pode explicar a diferença com as médias dos valores obtidos no experimento. Foi observado que a fração precipitado 1 depois de realizar o tratamento alcalino (para extrair proteínas solúveis presentes dentro das vesículas), apresentou os maiores fatores de purificação para todas as enzimas avaliadas. Em

futuras pesquisas, esta fração poderia ser considerada como amostra. Os fatores de purificação da fosfatase alcalina foram iguais aos obtidos por LOUVARD *et al.* (1973) no sobrenadante obtido depois de realizar o tratamento alcalino e centrifugar a 10000 x g por 5 minutos. RUEDA *et al.* (2007) utilizaram a metodologia de KESSLER *et al.* (1978) para a obtenção das VMBE, e obtiveram fatores de purificação para as enzimas aminopeptidase, fosfatase alcalina e maltase de 11,3, 14,1 e 18,3, respectivamente, em frangos de 3 semanas, e 11, 14,6 e 13,8, respectivamente, em frangos de 6 semanas. Dessa forma, o fator de purificação da enzima pode apresentar variações com a idade dos frangos.

Atividade enzimática

Pelos resultados obtidos no presente trabalho foi observado que a substituição de milho por sorgo na ração nas proporções de 50, 75 ou 100% alterou a atividade das enzimas de membrana da mucosa do jejuno, aminopeptidase e maltase, sendo observada diminuição da atividade da aminopeptidase e da maltase aos 42 dias quando os frangos receberam rações com substituições de 75 ou 100% do milho.

A menor atividade das enzimas pode ser em parte explicada pela maior perda do epitélio e menor densidade de vilos observado na mucosa do jejuno em frangos de 42 dias, quando foram alimentados com ração contendo 100% de substituição do milho pelo sorgo (Tabelas 4 e 5, Figura 6 do Capítulo 3). As enzimas digestivas encontram-se ancoradas à borda em escova de toda a superfície dos vilos de todos os segmentos do intestino delgado, sendo que são sintetizadas como precursores inativos por enterócitos presentes na cripta ou na união entre a cripta e os vilos e, a atividade é adquirida somente nos enterócitos que se encontram progredindo ao longo do vilos, apresentando-se a máxima atividade enzimática na parte média dos vilos. Adicionalmente, a atividade específica é proporcional a área de superfície epitelial da mucosa, sendo maior em áreas com vilos mais compridos, por isso a atividade é maior no duodeno em relação aos outros segmentos do intestino delgado (IJI *et al.*, 2001). Dessa forma, quanto maior o grau de perda epitelial, menor será a atividade das enzimas de membrana no intestino delgado. No

presente trabalho foi determinada a atividade das enzimas em VMBE obtidas da mucosa do jejuno. O efeito observado pela substituição do milho pelo sorgo na ração sobre a atividade das enzimas presentes no jejuno possivelmente refletiu o efeito sobre a atividade das enzimas presentes em todos os segmentos do intestino delgado.

Por sua vez, a alteração na atividade enzimática que comprometem suas funções específicas, possivelmente esteve relacionada com a piora no desempenho (pior conversão alimentar) observada na idade de abate nos frangos alimentados com ração contendo 100% de substituição de milho por sorgo. A atividade da fosfatase alcalina da membrana em escova do intestino delgado é considerada um componente importante da barreira imune da mucosa porque tem a habilidade de diminuir a toxicidade e hidrolisar lipopolisacarídeos, e de prevenir a invasão bacteriana através da mucosa (GEDDES & PHILPOTT, 2008; GOLDBERG *et al.*, 2008). A fosfatase alcalina intestinal também está relacionada com a diminuição da absorção de lipídeos presentes em dietas ricas em gorduras (NARISAWA *et al.*, 2003). Em relação à aminopeptidase, esta enzima considera-se responsável por quase toda a atividade peptidase da membrana em escova isolada a partir da mucosa de jejuno e íleo (MAROUX *et al.*, 1973).

Diminuição da atividade das enzimas de membrana do jejuno de frangos alimentados com sorgo também tem sido observada por outros autores. SHAKOURI *et al.* (2008) observaram maior valor da atividade da maltase na mucosa do jejuno (diferença não significativa) em frangos de 28 dias, alimentados com milho em comparação com a dos frangos alimentados com sorgo. Os autores também observaram que a atividade da sacarase foi significativamente menor nos frangos alimentados com sorgo, em relação aos frangos alimentados com milho ou trigo. No entanto, não acharam diferenças significativas na atividade da fosfatase alcalina em frangos alimentados com diferentes tipos de cereal (milho, sorgo, trigo ou cevada), resultado similar ao obtido no presente trabalho.

Em relação à maltase, IJI *et al.* (2001) observaram que a atividade da maltase reflete a dieta consumida. Dessa forma, o resultado do presente estudo parece indicar que a disponibilidade do amido do sorgo utilizado foi menor à do milho. O amido do sorgo pode estar menos disponível porque a região periférica do

endosperma está constituída por proteínas que formam uma camada resistente a qual prejudica a degradação física e enzimática do amido (ROONEY & PFLUGFELDER, 1986). Nesse sentido, ANTUNES *et al.* (2006) observaram valores menores de energia metabolizável aparente e verdadeira em grãos de sorgo de genótipos que apresentaram endosperma de textura dura comparado com grãos de genótipos com endosperma de textura intermediária ou macia. Dessa forma, a textura do endosperma do sorgo é outra característica importante a ser considerada, além do conteúdo de taninos, para avaliar o sorgo utilizado na formulação das rações de frangos.

Em futuros estudos poderia ser esclarecido o efeito da substituição do milho pelo sorgo (ou outros ingredientes alternativos) na ração de frangos de corte sobre a expressão gênica das enzimas aminopeptidase, fosfatase alcalina e maltase.

CONCLUSÕES

O uso de rações contendo altas porcentagens de substituição de milho pelo sorgo (75 ou 100%) desde o primeiro dia de vida dos frangos diminui a atividade das enzimas aminopeptidase e maltase aos 42 dias de vida. A atividade da fosfatase alcalina intestinal não é afetada pela substituição de milho pelo sorgo na ração.

REFERÊNCIAS

ANTUNES R.C.; RODRIGUEZ, N.M.; GONÇALVES, L.C.; RODRIGUES, J.A.S.; BAIÃO, N.C.; PEREIRA, L.G.R.; LARA, L.J. Valor nutritivo de grãos de sorgo com diferentes texturas do endosperma para frangos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 5, p. 877-883, 2006.

DAHLQVIST, A. Method of assay of intestinal disaccharidases. **Analytical Biochemistry**, v. 7, p. 18-25, 1964.

GEDDES, K.; PHILPOTT D.J. A New Role for Intestinal Alkaline Phosphatase in Gut Barrier Maintenance. **Gastroenterology**, v.135, n.8–12, 2008.

GOLDBERG, R.F.; AUSTEN, JR., W.G.; ZHANG, X.; MUNENE, G.; MOSTAFA G.; BISWAS S.; MCCORMACK, M.; EBERLIN K.R.; NGUYEN J.T.; TATLIDEDE H.S.; WARREN, H.S; NARISAWA S.; MILLA'N J.L.; HODIN R.A. Intestinal alkaline phosphatase is a gut mucosal defense factor maintained by enteral nutrition **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 105, n. 9, p. 3551–3556, 2008.

HARTREE, E.F. Determination of protein: a modification of Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, v.48, p.422-427, 1972.

HENNING, S.J. Ontogeny of enzymes in the small intestine. **Annual Review of Physiology**, v. 47, p. 231-245, 1985.

IJI, P.A.; SAKI, A.; TIVEY, D.R.. Body and intestinal growth of broiler chicks on a commercial starter diet. 2. Development and characteristics of intestinal enzymes **British Poultry Science**, v. 42, p. 514–522, 2001.

KESSLER, M.; ACUTO, O.; STORELLI, C.; MURER, H.; MULLER, M.; SEMENZA, G. A modified procedure for the rapid preparation of efficiently transporting vesicles from small intestinal brush border membranes. Their use in investigating some properties of D-glucose and choline transport systems. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 506, p. 136–154, 1978.

KIDDER, D.E.; MANNERS, M.J. The level and distribution of carbohydrases in the small intestine mucosa of pig from 3 weeks of age to maturity. **The British Journal of Nutrition**, v. 43, n. 2, p.141-153, 1980.

LITTELL, R.C.; STROUP, W.W.; FREUND, R.J. **SAS for linear models**. 4.ed. Cary, NC: SAS Institute, 2002.

LOUVARD, D.; MAROUX, S.; BARATTI, J.; DESNUELLE, P.; MTAFTSCHIEV, S. On the preparation and some properties of closed membrane vesicles from hog duodenal and jejunal brush border. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 291, p.747-763, 1973.

MAROUX S, LOUVARD D, BARATTI J. The aminopeptidase from hog intestinal brush border. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.321, n.1, p. 282-95, 1973.

MELDOLESI, J.; JAMIESON, J. D.; PALADE, G. E. Composition of cellular membranes in the pancreas of the guinea pig I. Isolation of Membrane Fractions **The Journal of Cell Biology** . v.49, p.109-129, 1971.

NARISAWA S.; HUANG, L.; IWASAKI, A.; HASEGAWA, H; ALPERS, DH; MILLA'N J.L. Accelerated Fat Absorption in Intestinal Alkaline Phosphatase Knockout Mice. **Molecular and Cellular Biology**, v.23, n. 21, p. 7525–7530, 2003.

PIZAURO, J.M.; CIANCAGLINI, P.; LEONE, F.A. Characterization of the phosphatidylinositol-specific phospholipase C-released form of rat osseous plate alkaline phosphatase and its possible significance on endochondral ossification. **Molecular and Cellular Biochemistry**. v.152, n.2, p.121-129, 1995.

ROONEY, L.W.; PFLUGFELDER, R.L. Factors affecting starch digestibility with special emphasis on sorghum and corn. **Journal of Animal Science**, v. 63, p. 1607-1623, 1986.

RUEDA, E.; LEÓN, M.; CASTAÑEDA, M.; MENDEZ A.; MICHELANGELI C. Effects of Concanavalin A on intestinal brush border enzyme activity in broiler chickens. **British Poultry Science**, v.48, n.6, p. 696-702, 2007.

SHAKOURI, M.D.; IJI, P.A.; MIKKELSEN L.L.; COWIESON A.J. Intestinal function and gut microflora of broiler chickens as influenced by cereal grains and microbial enzyme supplementation **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 93, n. 5, p. 647-658, 2008.

UNI, Z.; TAKO, E.; GAL-GARBER, O.; SKLAN, D. Morphological, molecular, and functional changes in the chicken small intestine of the late-term embryo. **Poultry Science**, v. 82, p. 1747-1754. 2003.

CAPÍTULO 5 – MICROBIOTA, VISCOSIDADE E pH DO CONTEÚDO ILEAL EM FRANGOS ALIMENTADOS COM SORGO EM SUBSTITUIÇÃO AO MILHO DA RAÇÃO

RESUMO

Um experimento foi conduzido para avaliar o efeito da substituição total do milho pelo sorgo sobre as contagens de populações bacterianas, a viscosidade e o pH do conteúdo ileal. Quarenta e dois pintos de corte de um dia de idade, machos, Cobb-500, distribuídos ao acaso em dois grupos de 21 aves cada, foram alimentados com rações à base de milho e farelo de soja ou de sorgo e farelo de soja, do 1º ao 42º dia de idade. Sete aves por grupo foram abatidas no 7º, 21º e 42º dia e foram obtidas amostras de um grama, compostas por conteúdo e raspagem da mucosa ileal, para cultura de populações bacterianas em ágar específicos para Enterobactérias, *Lactobacillus spp.* e *Clostridium perfringens*. No restante do conteúdo ileal, foi determinado o pH e a viscosidade. Não foram observadas diferenças ($p > 0,05$) nas contagens de unidades formadoras de colônia (Log_{10} UFC/g amostra) de Enterobactérias e *Lactobacillus spp.*, e no pH do conteúdo ileal de frangos de 7, 21 ou 42 dias, alimentados com ração contendo milho ou sorgo. No entanto, houve menor número de amostras com crescimento de colônias de *Clostridium Perfringens* nos frangos de 21 e 42 dias, quando na ração o milho foi substituído pelo sorgo (análise descritiva). A viscosidade do conteúdo ileal foi maior ($p < 0,05$) nos frangos de 21 dias alimentados com ração contendo milho, no entanto, este efeito não foi significativo nas outras idades ($p > 0,05$). Pelos resultados obtidos concluiu-se que a substituição de milho por sorgo na ração não altera as populações de Enterobactérias e *Lactobacillus spp.*, mas parece diminuir a colonização por *Clostridium perfringens* e a viscosidade ileal em frangos de corte.

PALAVRAS-CHAVE: *Clostridium perfringens*, Enterobactérias, *Lactobacillus spp.*

INTRODUÇÃO

A presença de populações bacterianas no trato gastrointestinal representa uma enorme contribuição à fisiologia do animal. Estas populações são reguladas por várias vias, e por sua vez, elas regulam a função intestinal e a nutrição do animal. A presença de populações bacterianas no intestino interfere no “turnover” do epitélio intestinal. As bactérias também secretam nutrientes que são aproveitados pelo hospedeiro como vitaminas (do complexo B e K), aminoácidos, ácidos graxos de cadeia curta, lactato, acetato, propionato e butirato que podem ser aproveitados como energia, e enzimas microbianas, como a fitase microbiana que incrementa a digestibilidade do fósforo e a digestibilidade verdadeira de aminoácidos no íleo. De outro lado, as bactérias no intestino, também podem afetar negativamente a nutrição animal por competir com o hospedeiro por nutrientes e por produzir metabólitos tóxicos (KOUTSOS & ARIAS, 2006).

A escolha de ingredientes da dieta pode afetar o perfil microbiano do intestino devido a que a energia para crescimento e reprodução bacteriana deriva principalmente dos nutrientes fornecidos na dieta, e as preferências por nutrientes são diferentes dependendo da espécie bacteriana (APAJALAHTI, 2004 a). Adicionalmente, as condições físico-químicas do trato gastrointestinal também definem o perfil microbiológico.

Logo depois da eclosão, a densidade bacteriana no íleo e no ceco de frangos de corte chega a 10^8 e 10^{10} UFC por grama de conteúdo, respectivamente. Este número de microorganismos aumenta a 10^9 no íleo e 10^{11} no ceco durante os primeiros três dias de vida e, posteriormente, permanece relativamente estável durante os seguintes 30 dias (APAJALAHTI *et al.*, 2004 b).

Frangos de corte foram criados com dietas à base de milho, sorgo, cevada, aveia ou centeio e na idade de abate foram obtidas amostras do conteúdo cecal. O DNA bacteriano foi isolado e as comunidades foram analisadas pelo seqüenciamento de 16S rRNA. Os resultados do estudo mostraram que os frangos alimentados com milho e com sorgo apresentaram menor abundância de bifidobactérias em relação aos que consumiram as outras dietas. Milho e sorgo

foram similares também porque ambos estimularam a comunidade de enterococos (APAJALAHTI, 2004 a).

SHAKOURI *et al.* (2008) não observaram diferenças nas contagens de unidades formadoras de colônia (UFC/g amostra) de bactérias anaeróbias totais, lactobacilos, bactérias coliformes, e *Clostridium perfringens* no conteúdo ileal de frangos de 28 dias, alimentados com rações à base de cevada, milho, sorgo ou trigo, com ou sem suplementação de enzimas (endo-1, 4-beta-glucanase, endo-1, 4-beta-xylanase). Nesse trabalho também foram avaliados o pH do conteúdo da moela, íleo e cecos e a viscosidade do conteúdo ileal. Os autores observaram que o pH do conteúdo da moela e dos cecos foi similar nos frangos alimentados com sorgo e milho, com valores superiores aos dos frangos alimentados com dietas à base de trigo e cevada. Adicionalmente, os autores observaram maior viscosidade ileal nos frangos alimentados com ração à base de trigo, no entanto, a suplementação com enzimas exógenas diminuiu a viscosidade independente do tipo de cereal na dieta (SHAKOURI *et al.*, 2008).

O uso de aditivos também influencia o crescimento bacteriano no trato gastrointestinal dos frangos. SANTOS (2003) comparou o uso de dietas com aditivos (antibiótico, mananoligossacarídeo, frutoligossacarídeo, ácido fumárico, cogumelo desidratado e probiótico) e observou que os frangos que receberam antibiótico ou ácido fumárico apresentaram as menores contagens de bactérias totais no intestino delgado (duodeno-jejuno) e no ceco. As maiores contagens no intestino delgado foram observadas pela adição de prebióticos ou probióticos, e no ceco pela adição de probióticos. O pH também foi modificado pela adição de aditivos, sendo que o pH do intestino delgado aumentou pela adição de probióticos ou mananoligossacarídeo, em relação ao uso de outros aditivos ou ração sem aditivos SANTOS (2003). Da mesma forma, LI *et al.* (2009) observaram que o efeito sinérgico da suplementação com probiótico (*Lactobacillus* e *Bacillus cereus*) e prebiótico (polissacarídeos de *Astragalus membranaceus*) aumentou as contagens de Lactobacilos e Bifidobactérias e diminuiu a população de *Escherichia coli* no íleo e no ceco de frangos de 21 e de 42 dias.

A interação entre bactérias e a mucosa intestinal é crítica para manter o desenvolvimento normal do sistema imune. A microflora intestinal está envolvida na indução de imunidade da mucosa e há evidências que indicam que a microflora é requerida para a sobrevivência de células B na bursa depois da eclosão (KOUTSOS & ARIAS, 2006).

Para o crescimento bacteriano no intestino, as complexas comunidades dependem de fatores de crescimento provenientes de outras comunidades residentes ou de fatores provenientes do hospede. Por isso, dificulta-se o estudo do perfil bacteriano do trato gastrointestinal utilizando unicamente técnicas de cultura, que dificilmente conseguem simular as condições naturais de crescimento bacteriano. Considera-se que menos de 10% das bactérias que habitam o trato gastrointestinal podem ser cultivadas sob condições laboratoriais. Métodos utilizando enriquecimento sob condições seletivas ou plaqueamento seletivo direto são muito eficientes para o estudo de algumas poucas populações de bactérias de interesse para pesquisa e diagnóstico, como algumas espécies patogênicas, ainda que estas técnicas detectem populações bacterianas em menor abundância relativa aos métodos baseados em DNA ribossomal. Dessa forma, estas técnicas não podem ser subestimadas quando usadas e interpretadas corretamente. Adicionalmente, estas técnicas apresentam alta especificidade a diferença dos métodos usando DNA (APAJALAHTI *et al.*, 2004 a).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a possível variação nas contagens de Enterobactérias, *Lactobacillus spp.*, e *Clostridium perfringens*, no pH e na viscosidade do conteúdo ileal de frangos de corte quando da substituição total do milho da ração por sorgo.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no setor de Avicultura do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal-SP. Foi utilizada uma câmara climática com 16 unidades experimentais com 2,5 x 1,6m.

Foram utilizados 42 frangos machos Cobb-500, distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado com dois tratamentos de 21 frangos. Cada frango foi considerado uma repetição. Os tratamentos consistiram na administração *ad libitum* de uma dieta a base de milho e farelo de soja e outra dieta com substituição total do milho pelo sorgo. As rações experimentais foram isonutrientes dentro de cada fase de criação: inicial (1-21 dias de idade) e crescimento (22-42 dias de vida) e foram formuladas seguindo a composição nutricional dos ingredientes e os níveis nutricionais de acordo com ROSTAGNO *et al.* (2005) (Tabela1). As aves foram vacinadas no quarto dia de idade contra a Doença Infecciosa da Bursa pela via ocular, no sétimo dia contra a Doença de Newcastle na água de bebida e no 18º dia foram re-vacinadas contras as duas doenças na água de bebida. Foi realizado jejum hídrico de uma hora antes da vacinação na água. As aves foram criadas sob temperatura termoneutra de acordo com a guia de manejo de frango de corte da linhagem Cobb (2008), e a câmara foi mantida com iluminação contínua.

Tabela 1. Composição centesimal, conteúdo de nutrientes e valor energético das rações experimentais para as fases inicial de 1 a 21 dias, e de crescimento de 21 a 42 dias.

Ingredientes %	INICIAL		CRESCIMENTO	
	0%	100%	0%	100%
Milho	51,333	-	58,666	-
Sorgo ¹	-	51,333	-	58,666
Farelo de soja, 45	40,276	38,937	32,211	30,689
Óleo de soja	3,839	5,222	5,078	6,656
Fosfato bicálcico	1,873	1,858	1,606	1,589
Calcário calcítico	0,912	0,930	0,827	0,848
Sal comum	0,511	0,511	0,466	0,466
DL-metionina*	0,295	0,342	0,226	0,280
L-lisina*	0,180	0,249	0,165	0,244
Premix ²	0,100	0,100	0,100	0,100
Cloreto de colina	0,070	0,070	0,070	0,070
L-treonina	0,061	0,088	0,035	0,066
Coxistac	0,050	0,050	0,050	0,050
Caulim	0,500	0,310	0,500	0,277
Total	100	100	100	100
Energia e Nutrientes	Composição Calculada			
Energia metabolizável(Kcal/Kg)	3005	3005	3175	3175
Proteína bruta (%)	22,87	22,87	19,75	19,75
Cálcio (%)	0,92	0,92	0,81	0,81
Fósforo disponível (%)	0,46	0,46	0,40	0,40
Sódio (%)	0,22	0,22	0,20	0,20
Lisina digestível (%)	1,28	1,28	1,07	1,07
Metionina+cistina digestível (%)	0,91	0,91	0,77	0,77
Treonina digestível (%)	0,83	0,83	0,70	0,70

* Suplementadas a fim de alcançar os níveis nutricionais de ROSTAGNO *et al.* (2005).

¹ Determinação de tanino condensado: 5,64 mg de catequina por grama de sorgo.

² Níveis de garantia por Kg do produto: Vitamina A 7000000 UI; vitamina D 3000000 UI; vitamina E 25000 mg; vitamina K 980 mg; vitamina B₁ 1780 mg; vitamina B₂ 9600 mg; vitamina B₆ 3465 mg; vitamina B₁₂ 10000 mcg; biotina 160 mg; pantotenato de cálcio 9500 mg; niacina 34650 mg; manganês 76260 mg; zinco 91250 mg; cobre 10000 mg; antioxidante 100 mg.

Contagem bacteriana

Nos dias 7, 21 e 42, sete aves por tratamento foram abatidas por deslocamento cervical e, imediatamente, o íleo foi isolado, separado por ligaduras, removido e acondicionado em sacos plásticos para o transporte ao Laboratório de Microbiologia do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV/UNESP.

Amostras de um grama constituídas de conteúdo ileal e raspado da mucosa do íleo foram obtidas e transferidas para tubos contendo 9 mL de solução salina estéril, sendo a primeira diluição da amostra, 10^{-1} . A partir dessa amostra, foram obtidas diluições seriadas, 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} . Das diluições 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , foi feito plaqueamento de 1 ml de cada diluição em duplicata, em ágar MacConkey¹⁵ para contagem total de Enterobactérias (Coliformes e enterobactérias lactose-negativas) e em ágar MRS¹⁶ seletivo para *Lactobacillus spp.* As diluições foram plaqueadas pela técnica de “pour plate” que consiste em colocar 1 ml de amostra na placa, cobrir com o ágar e homogeneizar. As placas com ágar MacConkey foram incubadas por 24 horas a 37°C em aerobiose e as placas com ágar seletivo para *Lactobacillus* (MRS) foram incubadas por 48 horas, a 37°C em jarras de anaerobiose com mistura gasosa contendo 10% de hidrogênio, 10% de dióxido de carbono e 80% de nitrogênio. Após a incubação foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC/g de amostra), e os dados foram transformados pela função $y = \text{Log}_{10} x$, sendo x o número de UFC/g.

Contagem de colônias de Clostridium perfringens

As amostras do conteúdo ileal e das quatro rações utilizadas no experimento (rações para a fase inicial e de crescimento contendo milho ou sorgo), em diluição 10^{-1} , foram submetidas a choque térmico, deixando-as a 80°C durante 10 minutos seguidos de resfriamento rápido, para permitir esporulação. Posteriormente, foi realizado plaqueamento de 1 ml de cada amostra, em duplicata, pela técnica de “pour plate”, utilizando meio seletivo para

¹⁵ Marca Acumédia

¹⁶ Marca Himédia

Clostridium perfringens sulfito-polimixina-sulfodiazina (SPS¹⁷). O material foi incubado a 37°C por 48 horas em anaerobiose. Após a incubação, foi realizada a contagem de UFC/g de amostra considerando-se somente as colônias de cor preta (sulfito-redutoras). Foram realizados esfregaços que foram corados pelo método de Gram. Com a observação de bastonetes Gram positivos foi verificada a presença de *Clostridium perfringens*. Devido a que algumas das amostras não apresentaram crescimento de colônias sulfito-redutoras foi apresentado o resultado de forma descritiva, indicando o número de amostras com presença de colônias sulfito-redutoras em relação ao total de amostras por cada tratamento.

Viscosidade e pH do conteúdo ileal

Nas mesmas aves abatidas aos 21 e 42 dias, para avaliação da microbiota, foram obtidas amostras do conteúdo ileal para mensuração da viscosidade e o pH. O material foi coletado em recipiente plástico e mensurado o pH, em seguida, foi centrifugado a 12000 x g durante seis minutos. Posteriormente, 0,5 ml do sobrenadante foram transferidos para o viscosímetro digital¹⁸ operando a uma rotação de 60 s⁻¹. A viscosidade determinada pelo aparelho foi expressa em unidades centipoises (cPs). Aos sete dias, de idade não foi possível determinar a viscosidade e o pH porque o conteúdo ileal foi insuficiente.

Análise estatística

Antes das análises, foi verificada a presença de dados discrepantes (*Box-&-Whisker plot*), a distribuição normal dos erros estudentizados (teste de Cramer-Von-Mises) e a homogeneidade das variâncias (teste de Brown-Forsythe) (LITTELL *et al.*, 2002). Sendo que tais pressuposições foram atendidas, o efeito do tratamento sobre as variáveis foi avaliado pelo Valor de *p* (*one-way-ANOVA*) com nível de significância de 0,05, usando o procedimento *General Linear Model* do programa

¹⁷ Marca Himédia

¹⁸ Brookfield DV-III.

SAS. Os dados de contagem de *Clostridium perfringens* foram analisados de forma descritiva.

RESULTADOS

As contagens de enterobactérias e *Lactobacillus sp.* no conteúdo ileal não diferiram ($p > 0,05$) entre as aves alimentadas com rações à base de milho em comparação com os alimentados com ração à base de sorgo, em nenhuma das idades avaliadas, sete, 21 e 42 dias (Tabela 2). A população de Enterobactérias teve um aparente aumento gradual desde os sete até os 42 dias. Aos sete dias a população de *Lactobacillus* predominou sobre a população de enterobactérias, aos 21 dias teve uma diminuição na contagem de UFC/g e aos 42 dias a contagem de *Lactobacillus* foi levemente menor em relação à contagem de Enterobactérias.

Tabela 2. Média \pm erro padrão e resultados da análise de variância da contagem de enterobactérias e *Lactobacillus sp.* (\log_{10} UFC/g do conteúdo ileal) aos 7, 21 e 42 dias de idade dos frangos alimentados com rações contendo sorgo ou milho.

	7 dias		21 dias		42 dias	
	<i>Enterobacteria</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Enterobacteria</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Enterobacteria</i>	<i>Lactobacillus</i>
Sorgo	5,91 \pm 0,34	9,06 \pm 0,08	6,90 \pm 0,26	7,15 \pm 0,18	8,09 \pm 0,34	7,59 \pm 0,50
Milho	6,82 \pm 0,41	8,71 \pm 0,28	6,56 \pm 0,20	7,13 \pm 0,29	8,09 \pm 0,35	7,84 \pm 0,34
Valor de p	0,1293	0,2689	0,3238	0,9429	0,9945	0,7055
CV (%)	13,15	6,23	9,18	8,40	11,18	11,54

Valor de p, resultados da análise de variância (5%). CV(%) = Coeficiente de variação.
n= sete repetições por tratamento.

Não houve crescimento de *Clostridium perfringens* nas amostras de rações à base de milho e sorgo utilizadas nas fases inicial e de crescimento. Os resultados da análise descritiva do crescimento de colônias de *Clostridium perfringens* em amostras de conteúdo ileal são apresentados na Tabela 4. Observou-se crescimento de colônias sulfito-redutoras em menor número de amostras quando os frangos foram alimentados com ração à base de sorgo comparado com os alimentados com ração à base de milho, tanto aos 21 quanto aos 42 dias de idade. O valor médio da contagem de UFC por grama de conteúdo ileal foi maior nos frangos com 42 dias de idade alimentados com

ração contendo milho, sendo que neste grupo todas as amostras tiveram crescimento de colônias de *Clostridium perfringens* (Tabela 3).

Tabela 3. Relação entre o número de amostras com crescimento de colônias sulfito-redutoras (*Clostridium perfringens* +) e o número total de amostras de conteúdo ileal de frangos de corte, alimentados com ração à base de milho ou sorgo, que foram analisadas aos 21 e 42 dias de idade dos frangos. Também, apresenta-se a média \pm erro padrão do Log_{10} UFC por grama de conteúdo ileal.

	7 dias		21 dias		42 dias	
	amostras +/- amostras total		amostras +/- amostras total	Log_{10} UFC/g	amostras +/- amostras total	Log_{10} UFC/g
Sorgo	0/7		2/7	0,29 \pm 0,11	3/7	1,06 \pm 0,08
Milho	0/7		4/7	0,37 \pm 0,11	7/7	1,73 \pm 0,39

O pH do conteúdo ileal não diferiu ($p > 0,05$) nos frangos alimentados com ração à base de milho comparado com os que receberam ração à base de sorgo. Em relação à viscosidade do conteúdo ileal, foi observado que aos 21 dias os frangos alimentados com ração contendo milho apresentaram viscosidade ileal maior ($p < 0,0001$) quando comparados com os frangos alimentados com ração contendo sorgo. Aos 42 dias apesar que o valor médio da viscosidade continuou maior nos frangos alimentados com milho, a diferença do efeito do tipo de cereal sobre a viscosidade não foi significativa ($p > 0,05$) nessa idade (Tabela 4).

Tabela 4. Média \pm erro padrão e resultados da análise de variância do pH e viscosidade do conteúdo ileal aos 21 e 42 dias de idade dos frangos alimentados com rações contendo sorgo ou milho.

	21 dias		42 dias	
	pH	Viscosidade (cPs)	pH	Viscosidade (cPs)
Sorgo	6,66 \pm 0,25	1,91 \pm 0,09	6,11 \pm 0,19	1,44 \pm 0,14
Milho	6,26 \pm 0,22	3,98 \pm 0,29	5,83 \pm 0,40	1,69 \pm 0,08
Valor de p	0,2657	< 0,0001	0,5341	0,1391
CV (%)	9,71	18,06	13,92	19,16

Valor de p, resultados da análise de variância (5%). CV(%) = Coeficiente de variação.
n= sete repetições por tratamento.

DISCUSSÃO

A composição da dieta pode ter um impacto sobre o crescimento das populações bacterianas do intestino basicamente por duas vias: mudando as

características físico-químicas do lúmen (como o pH e a viscosidade luminal) ou fornecendo os nutrientes específicos para o crescimento bacteriano.

Os resultados obtidos no presente trabalho indicaram que apesar da viscosidade ileal ter sido maior aos 21 dias nos frangos alimentados com ração à base de milho comparados com os alimentados com ração à base de sorgo, não houve alteração nas populações de Enterobactérias e *Lactobacillus* no íleo ao longo dos 42 dias de criação dos frangos. No entanto, houve maior número de amostras com crescimento de colônias de *Clostridium perfringens* aos 21 e aos 42 dias de vida quando os frangos foram alimentados com ração à base de milho. Foi verificada a ausência de contaminação por *Clostridium perfringens* das rações utilizadas no experimento, que poderia ser considerada uma fonte de contaminação para os frangos. O *Clostridium perfringens* é o agente causal da enterite necrótica, doença que ocasiona diminuição do desempenho e aumento na mortalidade dos frangos. SHAKOURI *et al.* (2008) não observaram diferenças nas contagens de bactérias anaeróbias totais, lactobacilos, bactérias coliformes, e *Clostridium Perfringens* no conteúdo ileal de frangos de 28 dias quando alimentados com rações à base de cevada, milho, sorgo ou trigo, com ou sem suplementação de enzimas (endo-1, 4-beta-glucanase, endo-1, 4-beta-xylanase).

A ocorrência de maior contagem de *Clostridium perfringens* e maior viscosidade do conteúdo ileal nos frangos alimentados com rações à base de milho, não são variáveis que possam ser relacionadas, por duas razões: 1) A viscosidade luminal pode aumentar pelo maior teor de polissacarídeos não amiláceos (NSP) na ração que geralmente aumentam a produção de mucinas pelas células caliciformes para proteger a mucosa contra o dano mecânico pelo material fibroso; e 2) a colonização por bactérias patogênicas relaciona-se com a diminuição na produção de mucinas e formação de camadas muito finas de muco e não com o aumento na sua produção (KOUTSOS & ARIAS, 2006). O anterior foi verificado no trabalho de SHAKOURI *et al.* (2008), que observaram aumento na contagem de *Clostridium perfringens* quando a viscosidade ileal de frangos alimentados com cevada foi diminuída pela suplementação da ração

com enzimas exógenas. Os mesmos autores observaram que o número de bactérias lactosa-negativas (entre as quais podem ser incluídas bactérias patogênicas como a *Salmonella*) foi maior quando os frangos foram alimentados com ração à base de milho sem suplemento enzimático quando comparados com os que receberam as outras dietas ou dieta à base de milho com suplemento enzimático. No entanto, esta alteração não esteve relacionada com variações no pH ou na viscosidade ileal (SHAKOURI *et al.*, 2008). Pela inclusão de tanino hidrolizável em baixas doses (250 ou 500 mg de por kg de alimento) também tem sido observada redução no número de *Escherichia coli* no intestino delgado (JAMROZ *et al.*, 2009).

De outro lado, a menor colonização por *Clostridium perfringens* nos frangos alimentados com sorgo poderia ser explicada porque os taninos podem formar uma fina camada de proteínas insolúveis e desnaturadas que cobrem a superfície da mucosa intestinal e a superfície da membrana celular bacteriana. A formação dessa camada pode ter função protetora e inibitória da colonização da mucosa intestinal por bactérias patogênicas, quando da presença de quantidades controladas de taninos na dieta (JAMROZ, *et.al.*, 2009).

CONCLUSÕES

A substituição de milho por sorgo na ração não altera as populações de enterobactérias e *Lactobacillus sp*, no entanto, diminui a colonização por *Clostridium perfringens* e a viscosidade do conteúdo ileal (aos 21 dias) de frangos de corte.

REFERÊNCIAS

APAJALAHTI, J. Structure and dietary modulation of intestinal microbial communities. **Proceedings of the 2nd mid-atlantic nutrition conference**, Timonium, Maryland, 2004 a.

Acesso 20/01/2010 http://manc.umd.edu/2006_Complete_Proceedings.pdf

APAJALAHTI, J.; KETTUNEN, K.; GRAHAM, H. Characteristics of the gastrointestinal microbial communities, with special reference to the chicken **World's Poultry Science Journal**, v. 60, p. 223-232, 2004 b.

Broiler management guide, Cobb. Revised 2008. www.cobb-vantress.com

JAMROZ, D.; WILICZKIEWICZ, A.; SKORUPIŃSKA, J.; ORDA, J.; KURYSZKO, J.; TSCHIRCH, H. Effect of sweet chestnut tannin (SCT) on the performance, microbial status of intestine and histological characteristics of intestine wall in chickens. **British Poultry Science** v. 50, n. 6, p. 687-699, 2009.

KOUTSOS, E.A.; ARIAS, V.J. Intestinal ecology: interactions among the gastrointestinal tract, nutrition, and the microflora. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 15, p. 161-173, 2006.

LI, S.P.; ZHAO, X.J.; WANG J.Y. Synergy of *Astragalus* polysaccharides and probiotics (*Lactobacillus* and *Bacillus cereus*) on immunity and intestinal microbiota in chicks. **Poultry Science**, v. 88, p. 519–525, 2009.

LITTELL, R.C.; STROUP, W.W.; FREUND, R.J. **SAS for linear models**. 4.ed. Cary, NC: SAS Institute, 2002.

ROSTAGNO H.S.; ALBINO, L.F.T; DONZELE, J.L.; GOMES, P.C.; OLIVEIRA R.F.; LOPES D.C.; FERREIRA A.S.; BARRETO, S.L.T. **Tabelas brasileiras para aves e suínos. Composição de alimentos e exigências nutricionais**. 2ª edição. Ed: Rostagno H.S. UFV-Departamento de Zootecnia, Viçosa-MG, 2005.

SHAKOURI, M.D.; IJI, P.A.; MIKKELSEN L.L.; COWIESON A.J. Intestinal function and gut microflora of broiler chickens as influenced by cereal grains and microbial enzyme supplementation **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 93, n. 5, p. 647-658, 2008.

SANTOS, E.C. **Aditivos alternativos ao uso de antibiótico na alimentação de frangos de corte.** Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 2003.