



Atividade Enzimática Pancreática de Frangos de Corte Alimentados com Dietas Contendo Enzima ou Probiótico

Pancreatic Enzymatic Activity of Broiler Fed with Diets Containing Enzyme or Probiotic

■ Autor(es) / Author(s)

Lima ACF¹
Macari M²
Pizauro Júnior JM¹
Malheiros EB³

1-Depto. de Tecnologia - FCAV/UNESP,
Jaboticabal

2-Depto. de Morfologia e Fisiologia Animal -
FCAV/UNESP, Jaboticabal

3-Depto de Ciências Exatas - FCAV/UNESP,
Jaboticabal

■ Correspondência / Mail Address

João Martins Pizauro Júnior

Depto. de Tecnologia - FCAV / UNESP
Via de Acesso Profº Paulo Donato Castelanne, Km 5
14884-900 - Jaboticabal - SP - Brasil

E-mail: jpizauro@fcav.unesp.br

■ Unitermos / Keywords

enzima, probiótico, frangos de corte, atividade enzimática, estresse calórico

broiler, enzymatic activity, enzyme, heat stress, probiotic

■ Observações / Notes

Projeto financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP – Processo nº 96/2652-8

Agradecimentos à Fátima A. R. Harnich pelo auxílio técnico durante a fase experimental e laboratorial. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq), à FATEC, pela doação do Probiótico, à Hamada Ltda. pela doação da enzima e à FAPESP pela bolsa de pesquisa concedida ao primeiro autor e pelo auxílio financeiro para realização deste projeto.

RESUMO

Este trabalho foi realizado para avaliar o efeito da adição de enzima e/ou probiótico, bem como do estresse calórico sobre a atividade de enzimas digestivas de frangos de corte aos 7, 14, 28 e 42 dias de idade. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em parcelas subdivididas com 6 tratamentos primários, constituindo um esquema fatorial 6x2 (rações x temperatura) e 4 tratamentos secundários (idades de amostragem), com 2 repetições. Não foi verificado efeito significativo dos tratamentos sobre a atividade específica das enzimas, exceto para as atividades de amilase aos 14 dias e tripsina aos 28 dias de idade, nas quais a adição de enzima proporcionou maiores atividades. Já a idade de criação afetou significativamente todas as enzimas quantificadas, sendo que a atividade específica de lipase diminuiu e as atividades específicas de amilase, tripsina e quimotripsina aumentaram com a idade das aves. A temperatura ambiente (calor) também afetou a produção enzimática de acordo com a idade dos frangos de corte, com um aumento na atividade de lipase e redução na tripsina e amilase.

ABSTRACT

This investigation was undertaken to study the effect of enzyme and/or probiotic supplementation in broiler chicken diet, as well as heat stress on pancreatic enzymes activities at 7, 14, 28 and 42 days of age. The experiment was performed at random in a subdivided parcel with 6 primary treatments in a factorial schedule 6 x 2 (diets and temperatures), and 4 secondary treatments (age), with 2 repetitions in each treatment. No significant effect ($p > 0.05$) of treatment was found on the specific enzymes activities, except for amilase activity at 14 days and trypsin at 28 days of life, in which the enzyme addition increased the amilase and trypsin activities. Broiler age affected significantly all studied enzymes, where lipase specific activity decreased and amilase, trypsin and quimotrypsin specific activities increased with broiler chicken age. Ambient temperature (heat) also affected enzymes production according to broiler chicken age, with an increase in lipase activity and reduction in trypsin and amilase.



INTRODUÇÃO

O uso de enzimas e probióticos na alimentação de animais monogástricos tem despertado o interesse de vários pesquisadores nos últimos anos. Entretanto, poucos são os estudos relacionados com o efeito do estresse térmico sobre a atividade de enzimas digestivas de frangos de corte alimentados com dietas suplementadas com probiótico e enzimas exógenas.

A ação dos probióticos está relacionada basicamente à melhoria do estado de saúde do hospedeiro, sendo considerados biorreguladores do trato intestinal, com ação preventiva e curativa. O uso de probióticos permite uma colonização rápida e eficiente de microrganismos da microbiota intestinal. Entretanto, limpeza e técnicas de desinfecção são essenciais para seu sucesso nesse processo, uma vez que qualquer fator que leve ao desequilíbrio da microbiota, seja com o uso indevido de antimicrobianos ou estresse de qualquer natureza, poderá permitir a instalação e multiplicação de microrganismos patogênicos (Miles, 1993). Desta forma, os probióticos tornam-se uma alternativa eficaz e econômica em substituição aos antibióticos, desde que não alterem negativamente o desempenho animal (Vargas *et al.*, 2000).

As enzimas, em geral, são utilizadas na alimentação animal com a finalidade de complementar as enzimas que são produzidas pelo próprio animal em quantidades insuficientes (amilases e proteases) e fornecer enzimas que eles não conseguem sintetizar (celulases). Com isso, se reduz o efeito negativo causado pelos polissacarídeos não-amiláceos (PNA's, principais componentes estruturais das paredes celulares dos cereais) (Fisher, 2002). Segundo Choct (2000), os polissacarídeos não-amiláceos na dieta de não-ruminantes, têm uma atividade anti-nutricional, a qual leva a uma pobre utilização de nutrientes. Além disso, a adição de enzimas reduz o impacto da variabilidade na capacidade digestiva da ave, tanto diretamente (através do aumento da capacidade digestiva com a enzima) ou indiretamente (pela estabilização da microbiota intestinal). Isso reflete o potencial da enzima para maximizar a capacidade digestiva dos frangos de corte e, assim, utilizar de forma eficaz os nutrientes (Pack *et al.*, 1998). É de vital importância a seleção adequada de uma fonte de enzima e/ou probiótico para se obter êxito com determinados tipos de dietas. Entretanto, enzimas específicas são estritamente limitadas a sua capacidade catalítica e às condições ambientais sob as quais elas

funcionam. Conseqüentemente, o sucesso na aplicação de tecnologia enzimática requer o conhecimento dos compostos químicos a serem hidrolisados e as condições sob as quais as reações ocorreram (Classen, 1996).

Dessa forma, o objetivo do trabalho foi verificar se a suplementação da dieta através de enzima ou probiótico, bem como o estresse calórico, interferem na atividade de enzimas digestivas pancreáticas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 720 pintos da linhagem Hubbard, alojados em 24 unidades experimentais, com densidade de 12 aves/m², não sexados. Um grupo de animais (360) foi manejado em condição de estresse calórico (câmara quente), em que a temperatura ficou em torno de 34 ± 1°C desde o primeiro até o 42º dia. Um outro grupo de animais (360) foi criado em condição termoneutra (câmara termoneutra), em que a temperatura foi controlada de acordo com a idade das aves: até 7 dias = 33°C, 7-14 = 29°C, 14-21 = 27°C, 21-28 = 26°C e 28-42 = 25°C. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com esquema em parcelas subdivididas, com 6 tratamentos primários que constituem um esquema fatorial 6 x 2 (rações x temperatura) nas parcelas e 4 tratamentos secundários nas subparcelas (idades de amostragem), e com 2 repetições por tratamento. A ração fornecida foi à base de milho e farelo de soja, com 3.200 kcal de EM/kg, suplementada com 2 níveis de probiótico CALSPORIN-Bs®(Fatec): 30 e 40 mg/kg (10¹⁰ células viáveis esporuladas de *Bacillus Subtilis* por grama do produto, como ingrediente ativo) ou com 3 níveis de suplementação enzimática PANASE®(Hamada Ltda): 100, 300 e 500 mg/kg (combinação de amilase, amiloglicosidase e protease) de ração e uma ração basal (sem suplementação). A alimentação foi fornecida *ad libitum*. O balanceamento da ração utilizada no período de 1 a 28 dias e de 29 a 42 dias de idade foi feito de acordo com as exigências nutricionais das aves em função do período (NRC, 1994). Aos 7, 14, 28 e 42 dias, 4 aves de cada tratamento, tomadas ao acaso, foram abatidas (num total de 192 aves), colhendo-se o pâncreas, que foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -70°C.

Para a obtenção das enzimas e proenzimas estudadas no presente trabalho, o pâncreas foi descongelado e homogeneizado um homogeneizador (marca Omni, modelo GLH) com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 contendo CaCl₂ 50 mM, a proporção de 1:20 (peso:volume). O extrato bruto foi centrifugado a 14.000g por 30 min sob refrigeração a 4°C, filtrado em lâ de vidro,



aliquotado, armazenado à -20°C e utilizado posteriormente para a determinação da atividade enzimática de amilase, lipase, tripsina e quimotripsina. Todas as operações foram realizadas a 4°C .

A atividade da lipase foi determinada por titulometria segundo o método de Sarda & Desnuelle (1958). Foi utilizada emulsão de óleo de oliva (SIGMA 800.1) como substrato, em presença de taurodeoxicolato de sódio 6 mM, NaCl 0,15 M, CaCl_2 1 mM, tampão Tris (hidroximetil) aminometano 0,2 mol/l pH 8,0 e excesso de colipase de frango parcialmente purificada (Brockman, 1981).

A ativação do zimogênio da tripsina foi efetuada em tampão Tris-HCl 50 mM contendo CaCl_2 50 mM e pH 8,0. Em cada dosagem, o extrato de pâncreas da amostra teste foi incubado a 37°C , durante 30 min, com igual volume de enteroquinase. Após a ativação do tripsinogênio, a atividade da tripsina foi determinada descontinuamente a 37°C , de acordo com o procedimento descrito por Kakade *et al.* (1974). A reação foi iniciada pela adição do substrato N-benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (SIGMA®) ao meio de incubação.

A atividade da α -amilase pancreática foi determinada a 37°C (Bernfeld, 1955), através da dosagem da maltose liberada, a partir da hidrólise do amido (substrato), pela enzima presente no extrato pancreático.

O substrato usado na dosagem da atividade da quimotripsina foi o N-glutaril-L-fenilalanina-p-nitroanilida (GAPNA), pelo método segundo Erlanger *et al.* (1966). A reação sempre foi iniciada pela adição do substrato ao meio de reação. Após 10 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 0,2 mL de ácido acético 30% (v/v), centrifugada em uma microcentrifuga SPIN I durante 5 min, e a p-nitroanilida liberada no sobrenadante foi determinada em 410 nm ($\epsilon_{410\text{nm}} = 8.800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Em cada experimento, foram incluídos controles sem adição de enzima para se estimar a hidrólise espontânea do substrato. As determinações foram feitas em triplicatas e as velocidades iniciais permaneceram constantes durante pelo menos 30 minutos, com menos de 5% do substrato sendo hidrolisado. Uma unidade (U) de enzima foi definida como sendo 1 nmol de p-nitroanilida liberada/min nas condições do teste.

A dosagem de proteína foi efetuada de acordo com o método descrito por Hartree (1972).

As análises estatísticas foram realizadas através do procedimento GLM do SAS® (*Statistical Analysis System*, 1998).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os testes F e coeficientes de variação obtidos nas análises estatísticas do experimento são apresentados na Tabela 1, na qual pode-se observar que as atividades de lipase e quimotripsina pancreática não tiveram efeito significativo ($p > 0,05$) para as rações e para temperatura de criação. Para a atividade de tripsina pancreática, houve interação significativa entre RCxTP (Ração x Temperatura), enquanto que para a atividade de amilase pancreática houve efeito significativo para ração (médias controle=0,145b; 30P=0,157ab; 40P=0,149ab; 100E=0,163ab; 300E=0,169a; 500E=0,152ab) e temperatura (médias quente=0,148b; termoneutra=0,164a) separadamente. No entanto, a idade dos animais foi altamente significativa para todas as enzimas analisadas. Apenas para a atividade de quimotripsina pancreática não foi verificada interação entre ração e temperatura *versus* idade de criação.

Na Tabela 2, pode-se verificar o efeito da interação RCxTP para a atividade de tripsina. O efeito da temperatura de criação foi marcante para a atividade de tripsina pancreática, principalmente para o tratamento contendo 100 mg/kg de enzima, ocasionando uma redução da atividade quando os animais foram submetidos ao estresse calórico, exceto para a ração contendo 300 mg/kg de enzima. Já o efeito das rações foi inconsistente em função da temperatura de criação e da dieta controle, ora aumentando, ora diminuindo a produção de tripsina, porém sem efeito significativo ($p > 0,05$).

O desdobramento da interação TPxD (temperatura x idade) para as atividades enzimáticas de amilase, lipase e tripsina pancreáticas está apresentado na Tabela 3.

Com o avanço da idade dos animais, a temperatura teve um efeito significativo sobre a atividade das enzimas pancreáticas. Pode-se observar ainda que as aves criadas em condições termoneutras tiveram uma maior atividade enzimática, principalmente no período final de criação, exceto para lipase aos 28 e 42 dias, em que esse efeito foi inverso. Isso pode ser explicado pelo fato de que, em altas temperaturas ambientais, as aves tendem a perder o apetite e reduzir a ingestão de alimento, o que pode reduzir a taxa de crescimento, a produção de músculo peitoral e aumentar a proporção de gordura abdominal (Temim *et al.* 2000; Geraert *et al.* 1996).

Em frangos de corte expostos ao calor (4 horas diárias à 42°C), Osman & Tanios (1983) observaram que o nível médio de atividade de amilase pancreática aumentou mais de 100%. Entretanto, esse aumento não foi significativo devido à grande variação individual. Essa variação também



foi observada para as dosagens de enzimas no presente estudo. Depois dos primeiros dias, a atividade de amilase aumenta significativamente ($p < 0,05$) para um nível máximo e depois cai a partir do terceiro dia (Osman & Tanios, 1983).

Na Tabela 4, está apresentado o desdobramento da interação RCxID (ração x idade) para as atividades enzimáticas de amilase, lipase e tripsina pancreática.

A atividade de lipase pancreática não foi afetada ($p > 0,05$) pela adição de enzima e/ou probiótico à dieta. No entanto, a atividade de amilase foi afetada significativamente pela adição de probiótico aos 14 dias de idade, levando a uma diminuição da atividade nesse período, o que também foi observado para o controle. O mesmo comportamento foi observado para a atividade de tripsina aos 28 dias de idade, com a dieta contendo 30 mg/kg de probiótico.

Como pode ser observado, a idade interfere significativamente na produção de enzimas digestivas, tanto no que diz respeito à interação com as diferentes rações, como para as temperaturas de criação.

A atividade de lipase diminuiu com a idade das aves. De forma semelhante, Dunnington & Siegel (1995), estudando a atividade de enzimas em frangos selecionados para alto/baixo peso vivo aos 42 dias de idade, observaram que a atividade relativa de lipase atingiu níveis mais elevados aos 8 dias e depois caiu até 15 dias de idade. Ao contrário do obtido nesse estudo, Nir *et al.* (1993) observaram que a atividade de lipase aumentou gradualmente até atingir cerca de 40 vezes seu valor aos 14 dias de idade. Já a atividade específica de lipase no pâncreas de frangos de corte ao nascimento até 20 dias, em estudo realizado por Nitsan *et al.* (1991), diminuiu durante os 3-6 primeiros dias após nascimento e aumentou cerca de 10-20% aos 21 dias.

Ao contrário do ocorrido com a atividade de lipase, a atividade de amilase pancreática aumentou com a idade das aves, até 42 dias de idade. Resultados contraditórios foram observados por Nir *et al.* (1993), que verificaram que a atividade específica de amilase diminuiu com a idade das aves até 15 dias.

Dunnington & Siegel (1995) verificaram que a atividade relativa de amilase em frangos selecionados para alto/baixo peso vivo aos 42 dias de idade teve uma queda no período de 6-8 dias, um pico aos 10 dias e depois caiu até 15 dias de idade.

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

aos 11 dias de idade.

De uma maneira geral, a atividade de tripsina aumentou com a idade, exceto algumas oscilações no controle e com 40 mg/kg de probiótico.

Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Dunnington & Siegel (1995) que verificaram que a atividade relativa de tripsina de frangos selecionados para alto/baixo peso vivo aos 42 dias de idade teve o mesmo comportamento da amilase (níveis mais elevados aos 10 dias), só que continuou aumentando até 15 dias de idade.

Da mesma forma, a atividade específica de tripsina no pâncreas de frangos de corte do nascimento até 20 dias, em estudo realizado por Nitsan *et al.* (1991), diminuiu durante os 6 primeiros dias após nascimento e aumentou cerca de 10-20% aos 14 dias de idade. Já Nir *et al.* (1993) observaram o contrário, ou seja, a atividade de tripsina aumentou gradualmente até atingir um nível mais elevado aos 11 dias, caindo um pouco após isso.

A atividade de quimotripsina aumentou com a idade das aves (médias 7 dias=0,357c; 14 dias=0,456b; 28 dias=0,565a; 42 dias=0,584a), mas não ocorreu interação com os demais fatores. Isso também foi verificado em experimento realizado por Dunnington & Siegel (1995), no qual a atividade relativa de quimotripsina aumentou durante todo o período até 42 dias. Em geral, as atividades foram maiores para frangos selecionados para alto peso. Nesse mesmo estudo, eles verificaram que a administração de uma dieta contendo 20% mais proteína bruta e 20% mais energia metabolizável logo após o nascimento, para aves selecionadas para baixo peso corporal às 8 semanas, resultou num aumento significativo dos níveis de quimotripsina e lipase pancreáticas.

Nir (1998) observou uma diminuição da síntese endógena das enzimas amilase, tripsina e quimotripsina quando pintos de corte, com duas semanas de idade, receberam dietas suplementadas com essas enzimas. O autor admite que a secreção de enzimas pancreáticas seja afetada pela concentração de enzimas no intestino delgado e/ou substratos ou produtos de hidrólise.

CONCLUSÕES

Os resultados desse experimento evidenciaram que o uso de enzima ou probiótico em rações de frangos de corte não tem efeito persistente na atividade das enzimas pancreáticas, não interferindo diretamente na produção das mesmas. Já a temperatura de criação das aves parece interferir de forma aleatória na atividade das enzimas, quando do uso de aditivos na dieta. Com o aumento da



idade, o estresse calórico causou uma diminuição significativa na produção e secreção de amilase e tripsina pancreática, sendo esse efeito mais evidente no período final de criação.

Tabela 1 – Testes F e Coeficientes de variação das análises estatísticas do experimento.

Estatística	Variáveis							
	Amilase		Lípase		Tripsina		Quimotripsina	
F p/ Ração (RC)	3,75	*	0,62	ns	4,64	*	0,36	ns
F p/ Temperatura (TP)	16,08	**	0,17	ns	6,28	*	0,54	ns
F p/ Inter. RCxTP	1,17	ns	0,95	ns	5,10	**	1,52	ns
F p/ Idade (ID)	145,46	**	61,36	**	85,21	**	53,39	**
F p/ Interação RCxID	6,43	**	3,83	**	5,18	**	0,76	ns
F p/ Interação TPxID	9,65	**	25,89	**	12,15	**	1,29	ns
F p/ Interação RCxTPxID	5,75	**	2,71	**	3,46	**	1,36	ns
CV (%) parcelas	12,11		20,27		13,98		13,82	
CV (%) subparcelas	10,46		12,34		13,37		14,41	

ns - não significativo.

* e ** - significativo a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente.

Tabela 2 – Desdobramento da Interação (ração x temperatura), para a atividade de tripsina pancreática (nmoles/minuto/mg de proteína).

Variável	Temperatura	Rações					
		Controle	30P	40P	100E	300E	500E
Tripsina	Quente	50,713	40,513	43,889	47,028B	57,421	51,376
Termoneutra	51,975	53,061	45,001	60,014A	49,583	52,886	

A-B - médias com letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p > 0,05$); na vertical.

P - probiótico mg/kg.

E - enzima mg/kg.

**Tabela 3** – Desdobramento da Interação (temperatura x idade) para as atividades de amilase, lipase e tripsina pancreática.

Variáveis	Temperatura	Idade (dias)			
		7	14	28	42
Amilase μmoles/minuto/mg de proteína	Quente	0,138b	0,129b	0,129b	0,196aB
	Termoneutra	0,128b	0,145b	0,146b	0,236aA
Lipase μmoles/minuto/mg de proteína	Quente	13,14a	10,08bB	10,54bA	9,76bA
	Termoneutra	13,38a	13,62aA	7,91bB	7,87bB
Tripsina Nmoles/minuto/mg de proteína	Quente	42,02b	34,11bB	59,67a	58,17aB
	Termoneutra	42,10bc	41,63cA	51,95b	72,67aA

A-B/a-b - médias com letras iguais, por enzima, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p > 0,05$); minúscula na horizontal e maiúscula na vertical.

Tabela 4 – Desdobramento da Interação (ração x idade), para as atividades de amilase, lipase e tripsina pancreática.

Variáveis	Rações	Idade (dias)			
		7	14	28	42
Amilase μmoles/minuto/ mg de proteína	Controle	0,120bc	0,108cB	0,162ab	0,189 ^a
	30P	0,142b	0,117bB	0,118b	0,251 ^a
	40P	0,129b	0,124bB	0,137b	0,206 ^a
	100E	0,138b	0,148bAB	0,152b	0,215a
	300E	0,140b	0,190abA	0,131b	0,216 ^a
	500E	0,129b	0,134bAB	0,126b	0,218 ^a
Lipase μmoles/minuto/ mg de proteína	Controle	13,270	13,128	9,908	10,020
	30P	12,835	11,163	9,960	8,235
	40P	13,815a	12,930a	7,663b	7,228b
	100E	14,803a	11,895a	7,547b	7,715b
	300E	11,885	10,565	9,973	11,188
	500E	12,975	11,420	10,313	8,495
Tripsina Nmoles/minuto/ mg de proteína	Controle	36,360b	35,998b	74,753aA	58,265a
	30P	37,948b	36,060b	45,700abB	67,440a
	40P	35,323	37,708	52,930AB	51,820
	100E	49,988ab	40,695b	49,878abAB	73,523a
	300E	49,355ab	37,693b	60,195aAB	66,765a
	500E	43,373b	39,048b	51,408bAB	74,698a

A-B/a-b - médias com letras iguais, por enzima, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p > 0,05$); minúscula na horizontal e maiúscula na vertical.

P - probiótico mg/kg.

E - enzima mg/kg.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bernfeld P. Amylases a and b. In: Colowick SB, Kaplan NO, editor. *Methods in Enzymology*. New York: Academic Press; 1955; 1: 149-53.
- Brockman HL. Triglyceride lipase from porcine pancreas. In: Boyer PD, editor. *Methods in enzymology*. New York: Academic Press 1981; 71: 619-27.
- Choct M. Enzymes in animal nutrition: the unseen benefits. On-line. Disponível na Internet <http://www.idrc.ca/books/focus/82/chp5.html>.
- Classen HL. Enzymes in action. *Feed Mix* 1996; 4(2): 22-8.
- Dunnington EA, Siegel PB. Enzyme activity and organ development in newly hatched chicks selected for high or low eight-week body weight. *Poultry Science* 1995; 74: 761-70.
- Erlanger BF, Edel F, Cooper AG. The action of chymotrypsin on two new chomogenic substrates. *Archives Biochemistry Biophysic* 1966; 115: 206-10.
- Fisher G, Maier JC, Rutz F, Bermudez VL. Desempenho de frangos de corte alimentados com dietas à base de milho e farelo de soja, com ou sem adição de enzimas. *Revista Brasileira de Zootecnia* 2002; 31(1): 402-10 (suplemento).
- Geraert PA, Padilha JC, Guillaumin S. Metabolic and endocrine changes induced by chronic heat exposure in broiler chickens: growth performance, body composition and energy retention. *British Journal Nutrition* 1996; 75(2): 195-204.
- Hartree EF. Determination of protein. A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry* 1972; 48: 422-7.
- Kakade ML, Rackis JJ, McGhee JG. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: A collaborative analysis of an improved procedure. *Cereal Chemistry* 1974; 51: 376-82.
- Miles RD. Manipulation of the microflora of the gastrointestinal tract: natural ways to prevent colonization by pathogens. In: *Proceedings of Flórida Altech Biotechnology in the Feed Industry*; 1993. p.133-50.
- Nitsan Z, Bem-Avraham G, Zoref Z, Nir I. Growth and development of the digestive organs and some enzymes after hatching in broiler chickens. *British Poultry Science* 1991; 32: 515-23.
- Nir I, Nitsan Z, Mahagna M. Comparative growth and development of the digestive organs and of some enzymes in broiler and egg type chicks after hatching. *British Poultry Science* 1993; 34: 523-32.
- Nir I. Mecanismos de digestão e absorção de nutrientes durante a primeira semana. In: *Conferência Apinco de Ciência e Tecnologia Avícola*; 1998; Campinas, São Paulo. Brasil. p.81-91.
- National Research Council. *Nutrient requeriments of poultry*. Washington, D.C.: National Academy Press; 1994.
- Osman AM, Tanios NI. The effect of heat on the intestinal and pancreatic levels of amylase and maltase of laying hens and broilers. *Comparative Biochemistry Physiology* 1983; 75a(4): 563-7.
- Pack M, Bedford M, Wyatt C. Enzimas para dietas basadas en maíz-soja. *Indústria Avícola* 1998; p.32-5.
- Sarda L, Desnuelle P. Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion. *Biochemistry Biophysic Acta* 1958; 30: 513-21.
- SAS Institute. SAS® (Statistical Analysis System). User's guide:statistics. Cary, NC:SAS Institute Inc.; 1998.
- Temim S, Chagneau A, Peresson R, Tesseraud S. Chronic heat exposure alters protein turnover of three different skeletal muscles in finishing broiler chickens fed 20 or 25% protein diets. *Journal of Nutrition* 2000; 130: 813-19.
- Vargas Jr JG, Toledo RS, Albino LFT, Rostagno HS, Rocha DP. Uso de probióticos e prebiótico em rações de frangos de corte. In: *Conferência Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas 2000*, Campinas. Suplemento 2. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*. Campinas: Apinco, 2000, p.31.

