

ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA TRIPSINA E QUIMOTRIPSINA DO PÂNCREAS E DO QUIMO DE LEITÕES DO NASCIMENTO AOS 35 DIAS DE IDADE¹

José Maria Soares²

Maria Goreti de Almeida Oliveira³

Juarez Lopes Donzele⁴

George Henrique Kling de Moraes³

1. INTRODUÇÃO

A tripsina (EC 3.4.21.4) e a quimotripsina (EC 3.4.21.1) são enzimas proteolíticas pertencentes ao grupo das serino-proteases, que se caracterizam pela participação de um resíduo de serina no centro ativo. As células exócrinas do pâncreas produzem os zimogênios tripsinogênio e quimotripsinogênio, que são secretados para o lúmen intestinal, onde, por ação enzimática, são transformados em suas formas ativas (8, 14). A família da tripsina e quimotripsina é amplamente difundida na natureza e possui funções diversas na digestão intestinal, lise celular de organismos

¹ Parte da tese do primeiro autor, apresentada à Universidade Federal de Viçosa para obtenção do grau de "Magister Scientiae" em Agroquímica. Aceito para publicação em 03.06.1998.

² Departamento de Química, Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUI), Santa Rosa, RS.

³ Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, 36571-000 Viçosa, MG.

⁴ Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, MG.

invasores, coagulação sanguínea, dissolução de coágulos sanguíneos, fertilização e outros processos fisiológicos (9).

Muitos estudos têm sido realizados com o objetivo de se verificar a atividade de diferentes enzimas e suas especificidades por substratos nutricionais e, também, a presença de enzimas proteolíticas no trato digestivo de animais monogástricos em certas fases de suas vidas. Com isso, pretende-se estabelecer uma relação entre atividade enzimática e desenvolvimento animal (1).

Considerando que uma das prioridades dos nutricionistas que trabalham na suinocultura é o estabelecimento de um programa de alimentação que possibilite o maior desempenho dos leitões durante a fase de aleitamento, torna-se de fundamental importância determinar o perfil das enzimas digestivas dos leitões durante essa fase, não somente visando estabelecer sua capacidade digestiva, mas também definir os tipos de alimentos cuja composição atenda às exigências nutricionais dos leitões.

Conduziu-se este trabalho com o objetivo de adaptar metodologia e determinar as atividades da tripsina e quimotripsina do pâncreas e do quimo de leitões do nascimento aos 35 dias de idade, submetidos a dois sistemas de alimentação, aleitamento natural ou aleitamento natural e ração.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. *Procedimentos gerais*

Um experimento utilizando 30 leitões mestiços de ambos os sexos, do nascimento até os 35 dias de idade, foi conduzido no setor de Suinocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa.

Todos os leitões após o nascimento tiveram acesso ao aleitamento natural. Após uma hora de mamada, três deles foram separados aleatoriamente e submetidos a jejum por 30 minutos e, posteriormente, sacrificados para remoção do pâncreas e do conteúdo (quimo) de 150 cm da primeira porção do intestino delgado que foram imediatamente preparados conforme (item 2.2) para as determinações das atividades da tripsina e quimotripsina (2.3 e 2.4).

Os 27 leitões restantes que continuaram em aleitamento natural, após o sexto dia de idade, foram submetidos a um jejum de aproximadamente 12 horas. Após esse período, os leitões foram aleitados por uma hora e, depois de 30 minutos, três foram separados aleatoriamente, anestesiados, sacrificados e tiveram removidos os pâncreas e os quimos para obtenção das atividades enzimáticas referentes ao 7º dia de idade.

O restante foi dividido, ao acaso, em dois grupos de 12 animais cada. Um grupo passou a receber o aleitamento natural (leite materno) e o outro, aleitamento natural e ração pré-inicial, cuja composição consta do Quadro 1.

QUADRO 1 - Composição centesimal da ração pré-inicial

Ingredientes	Quantidade (%)	Proteína bruta (%)	Proteína digestível (%)	Energia digestível (kcal/kg)	Fósforo digestível (%)	Cálcio (%)	Lisina (%)
Milho	52,60	4,42	3,91	1816,50	0,042	0,021	0,125
Farelo de soja	24,90	11,21	9,69	859,10	0,050	0,062	0,685
Leite em pó	10,00	3,40	3,30	374,00	0,090	0,126	0,245
Soro em pó	10,00	1,33	1,31	320,00	0,105	0,159	0,094
Óleo	0,40	-	-	31,80	-	-	-
Fosfato bicálcio	0,35	-	-	-	0,063	0,081	-
Calcário	1,10	-	-	-	-	0,350	-
Sal comum	0,40	-	-	-	-	-	-
Mistura mineral ¹	0,05	-	-	-	-	-	-
Mistura vitamínica ²	0,20	-	-	-	-	-	-
Total	100,00	20,36	18,21	3401,40	0,350	0,799	1,149

¹ Produto comercial - Cada kg da mistura continha: ferro, 180 g; cobre, 20 g; cobalto, 4 g; manganês, 80 g; zinco, 140 g; iodo, 4 g; e excipiente q.s.p. 1000 g.

² Produto comercial - Cada kg da mistura continha: vit. A, 9.000.000 UI; vit. D₃, 900.000 UI; vit. E, 10.000 UI; vit. K₃, 4 g; vit. B₁, 2 g; vit. B₂, 5 g; vit. B₆, 5 g; vit. B₁₂, 40 mg; ácido nicotínico, 40 g; ácido pantotênico, 25 g; bacitracina de zinco, 10 g; antioxidante, 30 g; selenito de sódio, 50 mg; e excipiente q.s.p. 1000g.

Após seis dias submetidos aos dois tratamentos dietéticos, os leitões permaneceram em jejum por aproximadamente 12 horas e, a seguir, foi-lhes permitido aleitar por uma hora. Trinta minutos depois, três animais de cada tratamento, separados ao acaso, foram submetidos à remoção cirúrgica dos pâncreas e tiveram coletados os quimos para as análises enzimáticas do 14^o dia de vida. Esse mesmo procedimento foi executado para remoção dos pâncreas e coleta dos quimos dos animais aos 21, 28 e 35 dias de idade.

2.2. Coleta e preparo de pâncreas e quimo

Os leitões recém-nascidos e os com 7 e 14 dias de idade foram anestesiados com 5,0 ml de Thionembutal a 2,5%, por injeção direta no coração. Imediatamente após, os leitões foram submetidos à remoção cirúrgica dos pâncreas e quimos. Em razão do peso mais elevado, os leitões aos 21, 28 e 35 dias de idade foram anestesiados com 8,0 ml da solução de Thionembutal antes de serem submetidos à cirurgia.

O preparo das amostras do pâncreas e do quimo, para posterior análise das atividades enzimáticas, foi adaptado do método descrito por VAN BAAK *et al.* (13). Após a remoção, os pâncreas foram limpos de toda gordura periférica, retalhados com bisturi e homogeneizados com HCl,

1,0 mM na proporção 3:1 (p/v). Esses homogenados foram congelados em nitrogênio líquido, liofilizados e armazenados à -20°C. Os quimos foram homogeneizados com HCl, 1,0 mM na proporção 3:1 (p/v), congelados em nitrogênio líquido, liofilizados e armazenados a -20°C.

De cada amostra liofilizada, pâncreas ou quimo, foram retirados 50 mg e solubilizada com 50 ml de água destilada e deionizada. Uma alíquota de 2,5 ml foi centrifugada a 35.000 x g por 20 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para as determinações das atividades da tripsina e quimotripsina.

2.3. Ativação dos zimógenos

A ativação do tripsinogênio e quimotripsinogênio do pâncreas foi feita em uma alíquota de 1,0 ml do sobrenadante. Neste foram adicionados 1,0 ml de tampão Tris-HCl, 0,2 M, pH 8,2 contendo 20 mM de CaCl₂ e 1,0% de dimetilformamida e 100 µl de tripsina bovina, 4,16 x 10⁻⁵ M, HCl, 1,0 mM. Essa solução final foi submetida à agitação branda por duas horas à temperatura ambiente e, imediatamente após, foram determinadas as atividades de tripsina e quimotripsina. A quantidade de tripsina adicionada para ativação dos zimogênios correspondeu a 2,0 % em peso do teor de proteína total contida na alíquota do sobrenadante. Este teor protéico foi determinado pelo método de LOWRY *et al.* (7).

2.4. Determinação das atividades enzimáticas

A atividade amidásica da tripsina foi determinada pelo método descrito por ERLANGER *et al.* (4), utilizando-se N-benzoil-D,L-arginina p-nitroanilida (D,L-BApNA) como substrato. A uma alíquota de 50 µl da solução final, descrita acima, para as amostras oriundas do pâncreas, ou do sobrenadante do quimo, ou de solvente, para os tubos-controle, e foi adicionado 1,0 ml de solução de D,L-BApNA, 6,38 x 10⁻⁴ M, em tampão Tris-HCl, 0,1 M, pH 8,2, contendo 20 mM de CaCl₂ e 1,0% de dimetilformamida, previamente equilibrada a 25° C. As velocidades iniciais foram determinadas pela formação do produto p-nitroanilida. Determinou-se a diferença de absorbância a 410 nm em função do tempo entre os valores obtidos das amostras e dos respectivos controles e utilizando o coeficiente de extinção molar de 8800 x M⁻¹ x cm⁻¹ para o produto.

Determinou-se a atividade esterásica da quimotripsina de acordo com método descrito por HUMMEL (6), utilizando-se N-benzoil-D,L-tirosina etil ester (D,L-BTEE) como substrato. Foram tomados 50 µl da solução final, descrita anteriormente, para as amostras oriundas do pâncreas, ou do

sobrenadante do quimo, ou de solvente, para os tubos controle, e foi adicionado 1,0 ml de D,L-BTEE, $1,7 \times 10^{-4}$ M em tampão Tris-HCl, 0,08 M, pH 7,8, previamente equilibrada à 25° C. As velocidades iniciais foram determinadas pela formação do produto etanol. Estabeleceu-se a diferença de absorvância a 256 nm, em função do tempo entre os valores obtidos das amostras e dos respectivos controles, utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $964 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para o produto.

2.4. Análises estatísticas

Utilizou-se delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 4, tipos de alimentação (aleitamento natural e aleitamento natural mais ração pré-inicial) e idades de abate (14, 21, 28 e 35 dias) com dois tratamentos adicionais correspondentes a duas idades de abate, ao nascimento e aos sete dias de idade, com três repetições, sendo o animal considerado a unidade experimental. Os dados foram submetidos a análise de variância, enquanto as médias foram comparadas pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

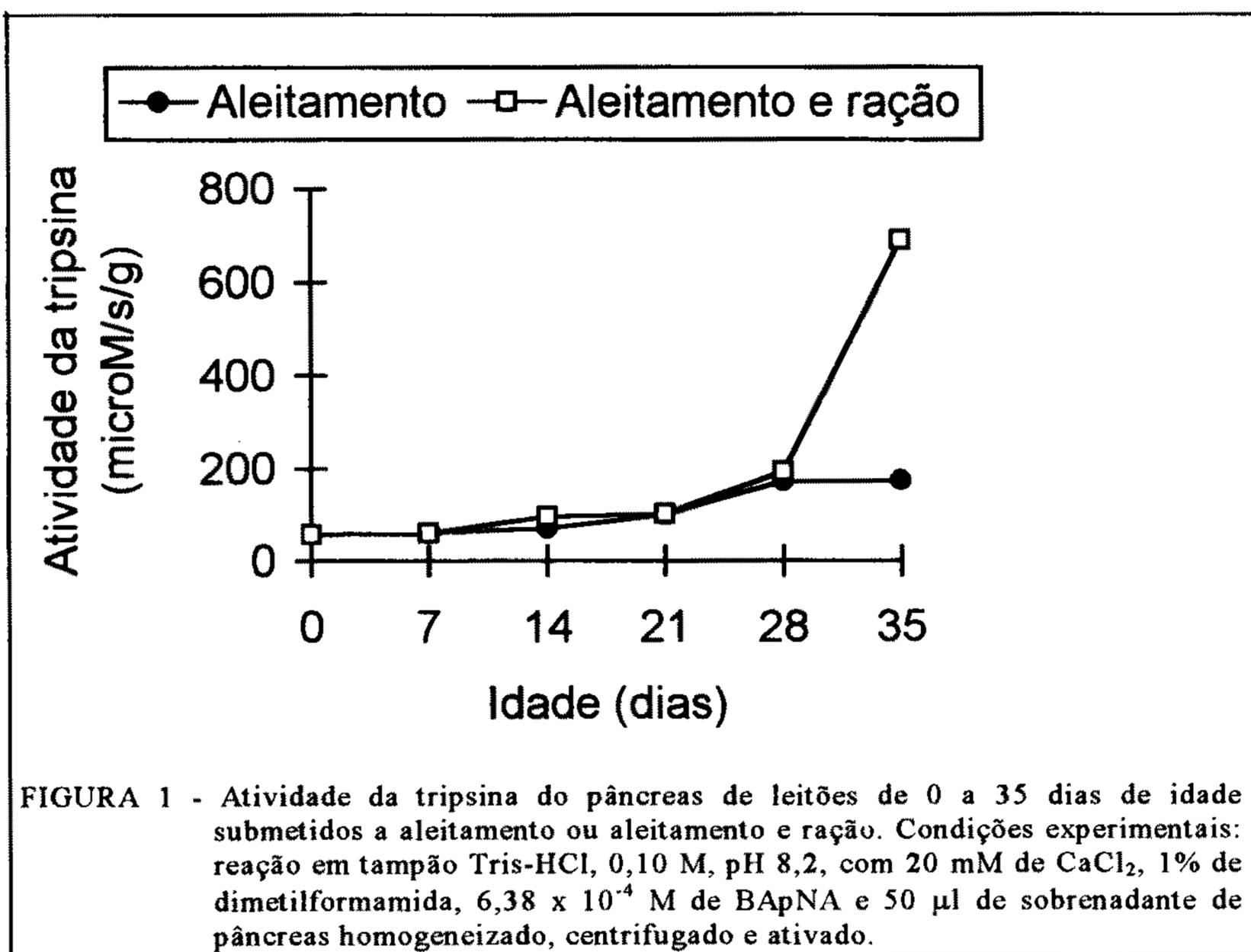
As atividades de tripsina do pâncreas e do quimo de leitões submetidos a aleitamento natural ou aleitamento e ração até os 35 dias de idade constam do Quadro 2.

QUADRO 2 - Atividades médias de tripsina do pâncreas e do quimo de leitões submetidos a aleitamento natural (AN) ou aleitamento natural e ração (ANR) até 35 dias de idade

Idade (Dias)	Pâncreas		Quimo	
	AN	ANR	AN	ANR
($\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$).....	($\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$).....	
Ao nascimento	56,00 ^B	-----	Não-detectada	Não-detectada
7	60,00 ^B	-----	3,06 ^C	-----
14	69,60 ^{AB}	95,90 ^{AC}	11,20 ^{AA}	5,00 ^{BCD}
21	99,00 ^{AB}	100,05 ^{AC}	6,40 ^{BB}	9,00 ^{AB}
28	172,00 ^{AA}	192,50 ^{AB}	4,80 ^{ABC}	5,60 ^{AC}
35	174,20 ^{BA}	690,60 ^{AA}	4,46 ^{BBC}	11,40 ^{AA}

*Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas colunas, e minúsculas, nas linhas, não diferem entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Duncan.

Os animais submetidos ao aleitamento natural, imediatamente após o nascimento e aos 7, 14 e 21 dias de idade, apresentaram atividades da tripsina no pâncreas semelhantes entre si, mas diferiram ($P < 0,05$) daquelas aos 28 e 35 dias de idade, que apresentaram aumentos respectivos de 73,74% e 75,96 % na atividade triptica em relação àquela aos 21 dias de idade e de 207,1 e 211,0% em relação àquela ao nascimento (Figura 1). Embora a atividade triptica do nascimento aos 21 dias de idade não tenha diferido estatisticamente, observou-se que, entre os intervalos de idade avaliados no período do nascimento aos 7 dias, dos 7 aos 14 e dos 14 aos 21 dias de idade, houve aumento na atividade de 7,1; 16,0; e 42,2 %, respectivamente (Figura 1). Desta maneira, verificou-se aumento total de 76,8% no intervalo do nascimento aos 21 dias de idade. Estas observações estão de acordo com OWSLEY *et al.* (10) que estudaram os efeitos da idade e da dieta no desenvolvimento do pâncreas e na síntese e secreção de enzimas pancreáticas em leitões do nascimento aos 56 dias e constataram que a atividade da tripsina aumentou com a idade do animal.



As atividades tripticas do pâncreas nas diferentes idades avaliadas até os 21 dias dos animais submetidos ao aleitamento natural e que passaram a receber ração a partir do 7º dia não foram diferentes ($P > 0,05$) entre si. Todavia, foi observado aumento de 78,66 % na atividade da

tripsina do nascimento aos 21 dias de idade (Figura 1). As atividades aos 28 e 35 dias de idade foram significativamente ($P < 0,05$) diferentes entre si e das demais observadas até aos 21 dias. A atividade triptica aos 35 dias foi 1133,21%, 590,25% e 258,75% (Figura 1) maior que aquelas verificadas ao nascimento e aos 21 e 28 dias de idade, respectivamente. As atividades aos 28 dias foi 243,75% e 92,4% maior que as verificadas ao nascimento e aos 21 dias, respectivamente (Figura 1).

Comparando a atividade triptica de animais que receberam aleitamento natural com aqueles que tiveram aleitamento natural e ração a partir do sétimo dia de idade, verificou-se que as atividades aos 14, 21 e 28 dias, apesar de terem apresentado variação de 37,78%, 1,06% e 11,92% a favor do grupo que recebeu ração, não diferiram ($P > 0,05$) entre si. Por outro lado, aos 35 dias de idade, o grupo de animais que recebeu aleitamento natural e ração apresentou maior ($P < 0,05$) atividade triptica nos pâncreas que foi 296,44 % superior ao que foi somente aleitado (Figura 1).

Esta diferença de valores da atividade triptica entre os dois grupos de leitões aos 35 dias de idade pode estar relacionada ao fato de que os leitões que receberam somente aleitamento provavelmente não tiveram estímulo suficiente para produção enzimática entre o 28º e 35º dia. Considerando que a produção de leite pela porca tende a estabilizar ou mesmo reduzir neste período, os animais que receberam ração além do aleitamento podem ter consumido mais ração nessa época, provocando estímulo à produção de enzimas digestivas pelo pâncreas. Em suporte a essa hipótese, CUNHA (3) observou que a produção de leite pelas porcas atinge o máximo na terceira ou entre a terceira e quarta semanas de lactação e tende a decrescer após este período. Também BABINSZKY *et al.* (2) notaram que o consumo de leite por leitão por dia aumentava consistentemente entre o sexto e 21º dia de lactação e que entre o 21º e 26º dia o aumento era bem menos expressivo, tendendo à estabilização.

A análise desses resultados revela que o fornecimento de ração ao leitão em aleitamento a partir do sétimo dia de idade, apresentou efeito positivo sobre a atividade triptica do pâncreas dos animais, e que este torna-se mais expressivo a partir dos 21 dias de idade. Isso, provavelmente, esteja relacionado ao fato de que a partir dos 21 dias o sistema digestivo dos leitões já está adaptado para a mudança alimentar (11). Avaliando o efeito estimulador da mudança da dieta no desenvolvimento do pâncreas exócrino de leitões, WESTROM *et al.* (15) concluíram que o aumento na secreção do pâncreas durante o desenvolvimento pós-natal está relacionado com a mudança na dieta, ou seja, do aleitamento natural líquido (leite) para a alimentação sólida (ração).

Avaliando as atividades de tripsina e quimotripsina no pâncreas e quimo de leitões do nascimento até cinco semanas de idade, GORRILL e FRIEND (5) relataram que a atividade de tripsina ao nascimento foi muito baixa ou não foi detectada. Esse resultado pode estar relacionado com a presença de substâncias antiproteolíticas inibidoras de tripsina no colostro das porcas. De acordo com Carlsson (1974), citado por TARDIN (12), há no colostro da porca uma substância antiproteolítica inibidora de tripsina que protege a proteína ingerida contra sua digestão.

No grupo de animais que recebeu somente aleitamento natural, constatou-se que as atividades trípticas no quimo de leitões aos 7, 28 e 35 dias, apesar de apresentarem variações de 7,6 a 56,8%, não diferiram significativamente e foram menores ($P < 0,05$) que aquela observada aos 14 dias de idade. Aos 21 dias, os leitões apresentaram atividade tríptica intermediária de $6,4 \mu\text{M/s/g}$, que, apesar de não diferir ($P > 0,05$) daquelas notadas aos 28 e 35 dias, foi 109,1 % superior ($P < 0,05$) àquela aos 7 dias e 42,9 % inferior ($P < 0,05$) àquela ocorrida aos 14 dias de idade. O pico de atividade tríptica ocorrido aos 14 dias não foi um resultado biologicamente consistente.

O grupo de leitões em aleitamento natural e que receberam ração a partir do sétimo dia de idade apresentou, também, variações inconstantes nas atividades trípticas no quimo nas várias idades avaliadas. Não se observou diferença ($P > 0,05$) entre as atividades trípticas no quimo dos leitões aos 7 e 14 dias de idade, embora ela tenha aumentado 63,4% no período (Figura 2). Por outro lado, a atividade tríptica aos 21 dias foi 80 % maior ($P < 0,05$) que aquela determinada aos 14 dias. No período de 7 aos 21 dias de idade foi observado aumento de 194,11% na atividade tríptica do quimo (Figura 2). Aos 28 dias, os leitões apresentaram redução ($P < 0,05$) de 37,8% na atividade tríptica em relação aos 21 dias, sendo esta atividade, no entanto, semelhante àquela ocorrida aos 14 dias. A mais alta atividade tríptica do quimo ocorreu nos leitões aos 35 dias de idade, cujo valor de $11,40 \mu\text{M.s}^{-1}/\text{g}$ de amostra foi maior ($P < 0,05$) que aqueles verificados nas demais idades avaliadas. As atividades trípticas do quimo desse grupo de leitões, com exceção daquela ocorrida aos 28 dias de idade, apresentaram consistente aumento com a idade dos animais.

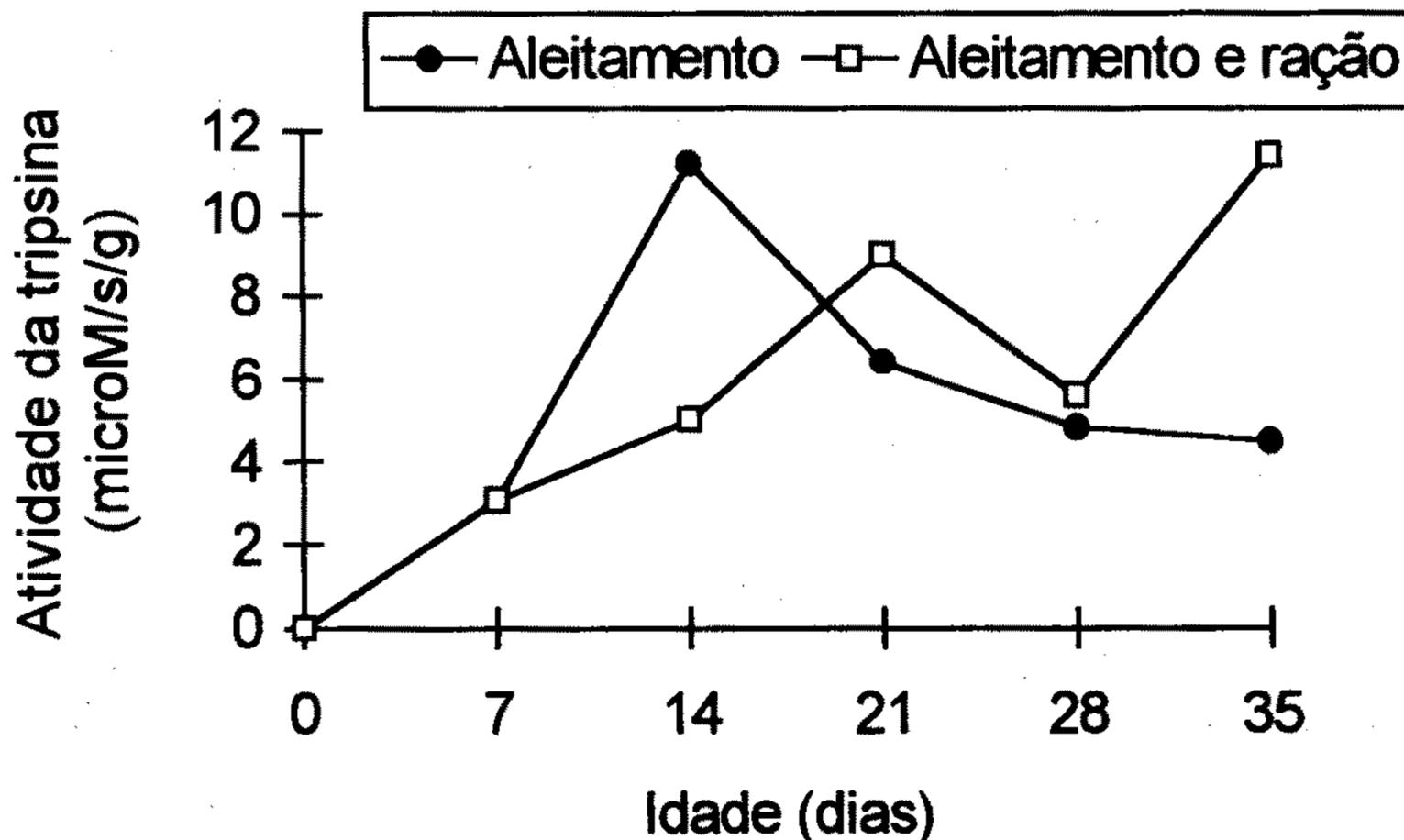


FIGURA 2 - Atividade da tripsina do quimo de leitões de 0 a 35 dias de idade submetidos a aleitamento ou aleitamento e ração. Condições experimentais: reação em tampão Tris-HCl, 0,10 M, pH 8,2, com 20 mM de CaCl_2 , 1% de dimetilformamida, $6,38 \times 10^{-4}$ M de BApNA e 50 μl de sobrenadante de quimo homogeneizado e centrifugado.

Comparando as atividades tripticas do quimo dos dois grupos de animais, constatou-se que aquele que recebeu aleitamento natural e ração apresentou maiores valores de atividade aos 21 dias e aos 35 dias de idade. Aos 28 dias as atividades não variaram ($P > 0,05$), apesar desse mesmo grupo de animais ter mostrado valores de atividade 16,7 % mais elevados.

Analisando os resultados de atividade triptica no pâncreas e quimo, em conjunto, observou-se que a partir dos 21 dias de idade os valores de atividades tripticas dos leitões que receberam ração foram maiores. Entretanto, somente aos 35 dias o aumento foi consistente e significativo ($P < 0,05$), correspondendo a 296,44% e 155,6%, respectivamente (Figuras 1 e 2). Como consequência desses resultados, pode-se inferir que os leitões que receberam ração durante o período de aleitamento, por apresentarem maior capacidade de digestão triptica aos 35 dias de idade (desmama), poderiam mostrar melhor desempenho nos primeiros dias pós-desmame.

As atividades médias da quimotripsina do pâncreas e do quimo de leitões submetidos a aleitamento natural ou aleitamento natural e ração, até os 35 dias de idade, são mostradas no Quadro 3.

QUADRO 3 - Atividades médias de quimotripsina do pâncreas e do quimo de leitões submetidos a aleitamento natural (AN) ou aleitamento natural e ração (ANR) até 35 dias de idade

Idade (Dias)	Pâncreas		Quimo	
	AN	ANR	AN	ANR
($\mu\text{M.s}^{-1}.\text{g}^{-1}$).....	($\mu\text{M.s}^{-1}.\text{g}^{-1}$).....	
Ao nascimento	8.060 ^{BC}	Não-detectada	Não-detectada
7	11.960 ^{AB}	536 ^A
14	12.150 ^{AB}	13.300 ^{ABC}	877 ^{BA}	815 ^{ABC}
21	6.550 ^{BC}	17.130 ^{AB}	581 ^{BA}	1.055 ^{AB}
28	16.130 ^{BA}	16.790 ^{AB}	501 ^{BA}	1.085 ^{AB}
35	12.470 ^{BAB}	23.010 ^{BA}	484 ^{BA}	1.675 ^{BA}

* Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, nas colunas, e minúsculas, nas linhas, não diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Duncan.

Constatou-se no grupo de animais que recebeu somente aleitamento natural que as atividades médias da quimotripsina no pâncreas dos leitões ao nascimento e aos 7, 14 e 35 dias de idade não foram diferentes ($P > 0,05$) entre si, embora nesses intervalos tenham ocorrido aumentos de 48,39%, 1,59% e 2,63%, respectivamente (Figura 3). Aos 21 dias de idade, os leitões apresentaram redução ($P < 0,05$) na atividade quimotriptica, em relação aos 14 dias, sendo esta atividade semelhante àquela obtida ao nascimento e menor ($P < 0,05$) que aquelas verificadas nas demais idades. A maior atividade quimotriptica foi observada aos 28 dias de idade, sendo diferente significativamente ($P < 0,05$) apenas daquelas ao nascimento e aos 21 dias de idade. No período do nascimento aos 28 dias de idade, o aumento da atividade correspondeu a 100,12%. Para a redução da atividade quimotriptica constatada aos 21 dias de idade não se encontrou explicação biológica, mas para aquela observada entre o 28º e 35º dia, o declínio na produção de leite das porcas pode ter resultado em menor estímulo nutricional para secreção enzimática dos leitões.

Em relação ao grupo de animais submetidos a aleitamento natural e ração, observou-se que as atividades quimotripticas aos 14, 21 e 28 dias de idade não diferiram ($P > 0,05$) entre si. A atividade quimotriptica dos leitões aos 7 dias apresentou valor intermediário entre aqueles notados ao nascimento e aos 14 dias, não ocorrendo diferenças ($P > 0,05$) entre eles, porém foi inferior ($P < 0,05$) aos verificados nas demais idades. Aos 28 dias foi observada queda não-significativa ($P > 0,05$) de 1,98% em relação àquela verificada aos 21 dias de idade. O aumento da atividade aos 35 dias, em relação àquelas ao nascimento e aos 7, 14, 21 e 28 dias foi

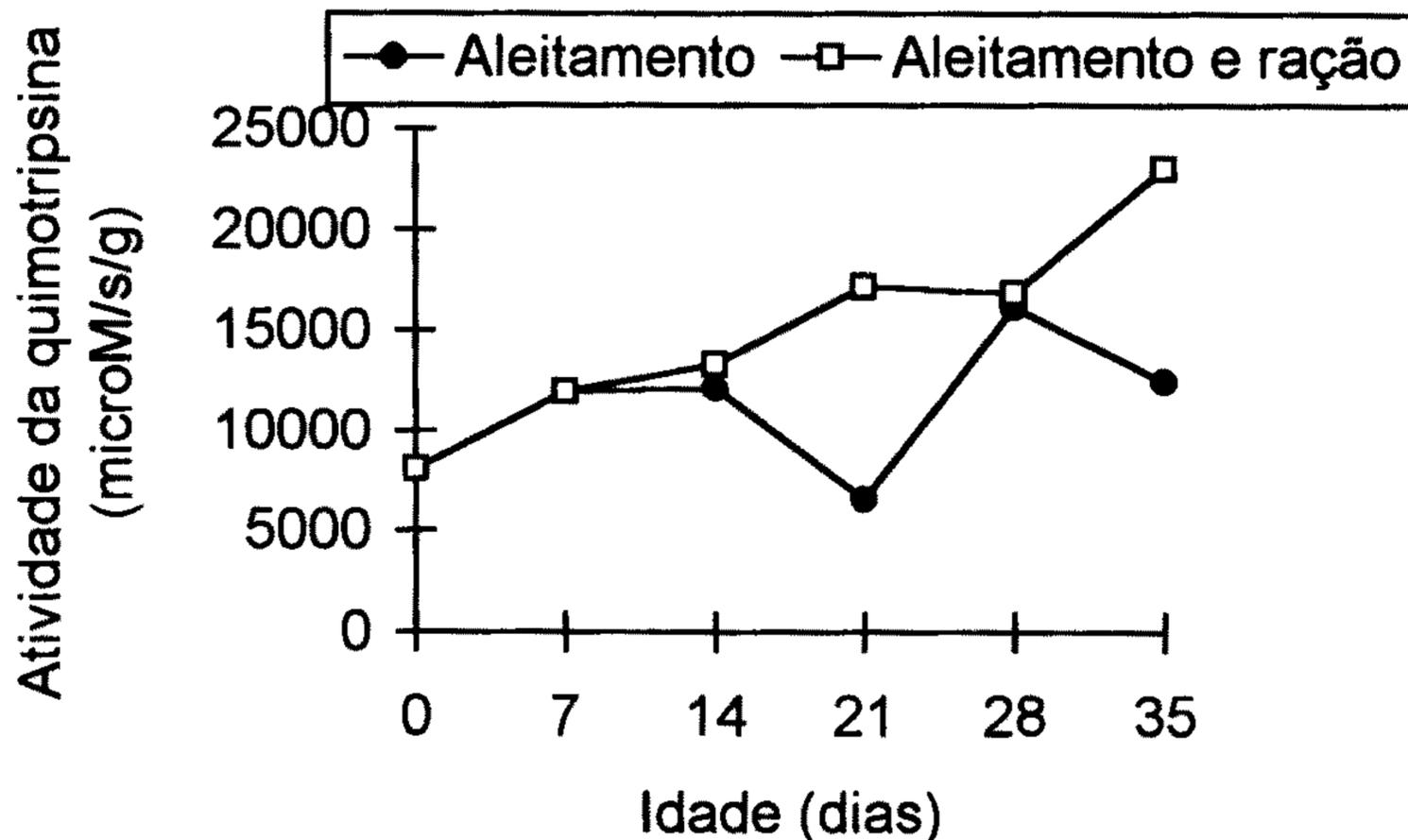


FIGURA 3 - Atividade da quimotripsina do pâncreas de leitões de 0 a 35 dias de idade submetidos a aleitamento ou aleitamento e ração. Condições experimentais: reação em tampão Tris-HCl, 0,08 M, pH 7,8, a 25° C, com $1,7 \times 10^{-4}$ M de BTEE e 50 μ l de sobrenadante de pâncreas homogeneizado, centrifugado e ativado.

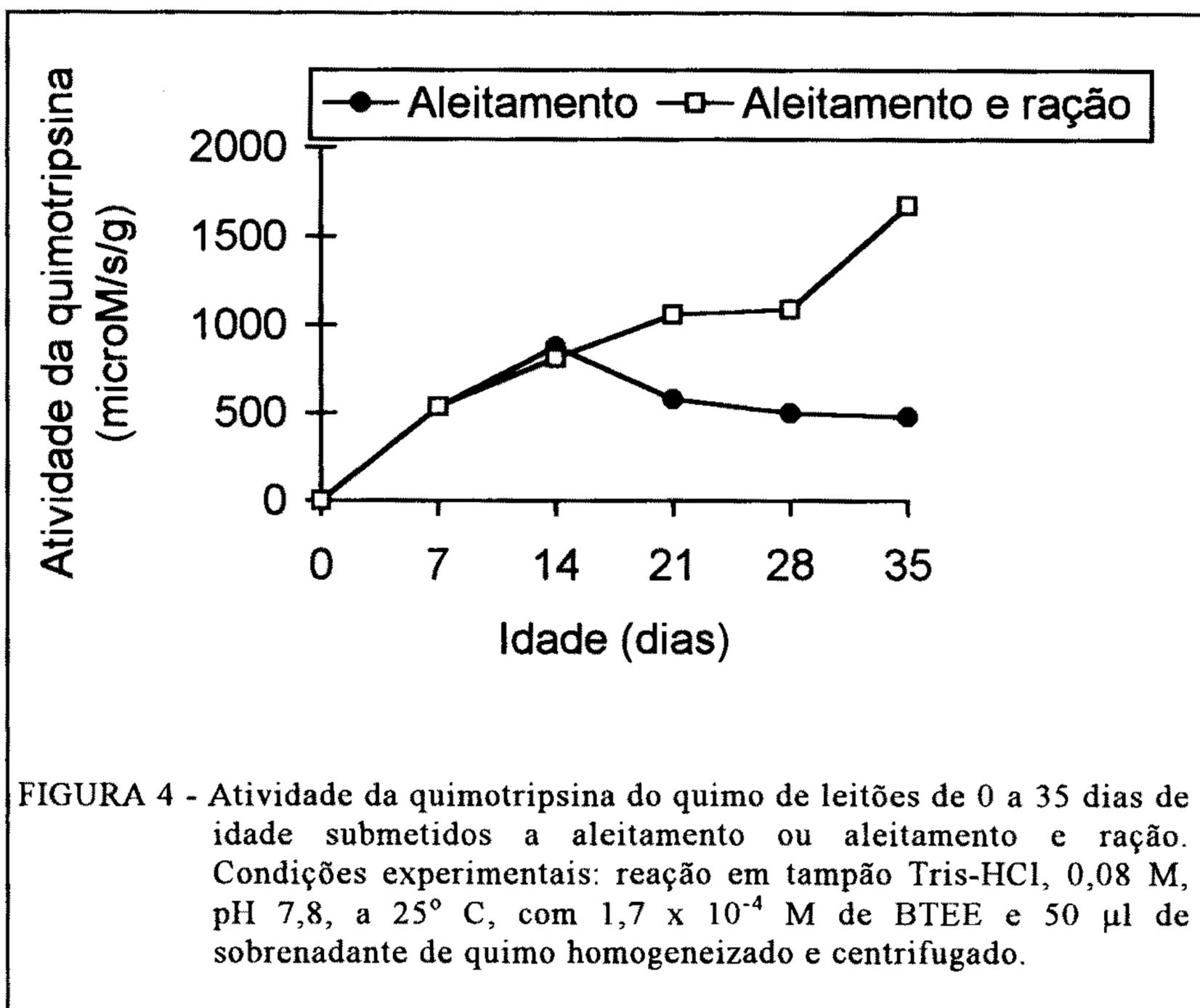
de 185,48%, 92,39%, 73,00%, 34,32% e 37,04% (Figura 3), respectivamente. O aumento total no período, do nascimento aos 35 dias de idade, correspondeu a 185,48%.

Comparando as atividades quimotrípticas no pâncreas dos leitões submetidos somente a aleitamento natural com aquelas dos que receberam aleitamento natural e ração a partir do sétimo dia, observou-se que depois dos 14 dias de idade os leitões que receberam ração apresentaram maiores valores de atividade. Os aumentos nos valores de atividade ocorridos aos 14, 21, 28 e 35 dias de idade, em favor dos leitões que receberam ração, corresponderam a 9,46%, 161,53%, 4,10% e 84,52%, respectivamente (Figura 3), e somente aqueles verificados aos 21 e 35 dias foram significativos ($P < 0,05$). Esses resultados revelaram que o fornecimento de ração aos leitões em aleitamento a partir do sétimo dia de idade teve efeito positivo sobre a atividade quimotríptica do pâncreas.

Não foi detectada atividade quimotríptica no quimo de leitões ao nascimento (Quadro 3). Considerando que a tripsina exerce função importante na ativação das demais proteases produzidas pelo pâncreas, entre elas o quimotripsinogênio, a presença de substâncias antiproteolíticas

inibidoras de tripsina no colostro das porcas, conforme descrito anteriormente, provavelmente seja o fator responsável por esse resultado.

Analisando os resultados da atividade quimotriptica do grupo de animais que recebeu somente o aleitamento natural, verificou-se que as atividades quimotripticas no quimo aos 7, 14, 21, 28 e 35 dias de idade foram semelhantes entre si ($P > 0,05$), apesar de apresentarem variações de 3,51 a 63,62% nesses intervalos. A mais elevada atividade quimotriptica foi observada aos 14 dias, e a diferença entre esta e aquelas ocorridas aos 7, 21, 28 e 35 dias foi de 63,62%, 50,95 %,75,05% e 81,20%, respectivamente (Figura 4). Por outro lado, aos 21 dias, os leitões apresentaram valor de atividade quimotriptica intermediário de 581 $\mu\text{M/s/g}$, que foi inferior em 50,95 % ao observado aos 14 dias e superior em 9,0%, 15,97% e 20,04 % àqueles aos 7, 28 e 35 dias, respectivamente (Figura 4). O pico da atividade quimotriptica, ocorrido aos 14 dias, não está coerente com os demais valores. O normal seria um valor intermediário entre aqueles verificados aos 7 e aos 21 dias de idade.



Comparando as atividades quimotripticas do quimo entre os dois grupos de animais, constatou-se que o grupo que recebeu aleitamento e ração apresentou maiores valores de atividade aos 21, 28 e 35 dias, com

aumentos significativos ($P < 0,05$) de 81,58 %, 116,57 % e 246,07%, respectivamente (Figura 4), em relação ao grupo que recebeu somente o aleitamento.

Esse resultado evidenciou que o fornecimento da ração aumenta a capacidade digestiva desses animais e que o seu efeito foi mais evidenciado a partir dos 21 dias de idade.

Estudando os efeitos da idade e da dieta no desenvolvimento do pâncreas e na síntese e secreção de enzimas pancreáticas em leitões, do nascimento aos 56 dias de idade, OWSLEY *et al.* (10) constataram que as atividades da amilase, tripsina e quimotripsina no pâncreas e no conteúdo intestinal aumentaram com a idade. Esses autores observaram também variações nos valores das atividades dessas enzimas tanto no tecido pancreático quanto no conteúdo intestinal, estando estas variações relacionadas com a composição da dieta.

4. RESUMO E CONCLUSÕES

As atividades das enzimas tripsina e quimotripsina do pâncreas e do conteúdo (quimo) da primeira porção do intestino delgado foram estudadas em 30 leitões mestiços. Eles foram distribuídos em dois tratamentos, que consistiram de aleitamento natural ou aleitamento natural e ração fornecida a partir do sétimo até os 35 dias de idade. As atividades da tripsina e quimotripsina foram determinadas usando-se como substratos N-benzoil-D,L-arginina p-nitroanilida e N-benzoil-D,L-tirosina etil éster, respectivamente. Foi observado que as atividades trípticas e quimotrípticas do pâncreas aumentaram com a idade e que este aumento foi mais expressivo a partir dos 21 dias. O tratamento em que se utilizou o aleitamento natural e a ração proporcionou maiores valores de atividades dessas proteases no pâncreas dos leitões. Não foram detectadas atividades trípticas e quimotrípticas no conteúdo intestinal em leitões com um dia de idade. Porém, dos 7 aos 35 dias observaram-se flutuações das atividades dessas proteases. Todavia, foi verificado que as atividades tenderam a aumentar com a idade do animal. Os leitões que receberam aleitamento natural e ração apresentaram maiores valores de atividade dessas proteases no quimo em relação àqueles que tiveram somente aleitamento natural. De acordo com os resultados, constatou-se que as atividades aumentaram com a idade e que o fornecimento da ração influenciou positivamente nas atividades trípticas e quimotrípticas no pâncreas e no quimo dos leitões,

principalmente a partir dos 21 dias de idade. Concluiu-se, pela análise dos resultados, que as atividades das proteases aumentaram com a idade do animal, o fornecimento de ração, a partir do sétimo dia, teve efeito positivo sobre as atividades enzimáticas e que a metodologia adaptada e utilizada na determinação das atividades tripticas e quimotripticas no pâncreas e no quimo de leitões foi adequada.

5. SUMMARY

(ACTIVITY OF TRYPSIN AND CHYMOTRYPSIN FROM PANCREAS AND CHYMO OF PIGLETS FROM BIRTH TO 35 DAYS OF AGE)

An experiment was conducted using 30 piglets from birth to 35 days of age to study the development of trypsin and chymotrypsin in the pancreas and contents (chymo) of the first portion of the small intestine. The piglets were distributed in two dietary treatments: natural sow milking (M) and M plus a corn-soybean diet (MD), offered from the 7th to the 35th day of age. Enzyme activity was measured applying N-benzoyl-D,L-arginine p-nitroanilide and N-benzoyl-D,L-tyrosine ethyl ester, respectively. It was observed that pancreas enzyme activity (PEA) increased with age and being best expressed after the 21th day of age. Feeding the piglets with MD resulted in higher PEA than when feeding only M. No enzyme activity was detected in the chymo of the piglets at the first day of age. But, from 7th to 35th day of age, chymo enzyme activity (CEA), though exhibiting high fluctuation, had a tendency to increase with age. Also, the piglets fed with MD showed higher CEA than those fed only M. The data obtained showed that the activity of both enzymes from pancreas and chymo increased with age and that a supply of corn-soybean diet positively influenced their activities, mainly after the 21th day of age.

6. LITERATURA CITADA

1. AUMAITRE, A. Development of enzyme activity in the digestive tract of the suckling pig: nutritional significance and implications for weaning. *World Rev. Anim. Produc.*, 8: 54-68, 1972.
2. BABINSZKY, L.; VERSTEGEN, M.W.A.; DEN HARTOG, L.A.; ZANDSTRA, T.; VAN DER TOGT, P.L. & VAN DAM, J.T.P. Effect of dietary fat and α -tocopherol level in the lactation diet and the performance of primiparous sows and their piglets. *Anim. Prod.*, 55:233-240, 1992.
3. CUNHA, T.J. *Swine feeding and nutrition*. New York, Academic Press, 1977. 259p.

4. ERLANGER, B.F.; KOKOWSKY, N. & COHEN, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 95:271-278, 1961.
5. GORRILL, A.D.L. & FRIEND, D.W. Pancreas size and trypsin and chymotrypsin activities in the pancreas and intestinal contents of pigs from birth to 5 weeks of age. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 48:745-750, 1970.
6. HUMMEL, B.C.W. A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin and thrombin. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37:1393-1399, 1959.
7. LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. & RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-275, 1951.
8. MIKES, O.; HOLEYSOVSKY, V.; TOMBASEK, V. & SORM, F. Covalent structure of bovine trypsinogen. The position of the remaining amides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 24:346-352, 1966.
9. OLIVEIRA, M.G.A. *Identificação do sítio de ativação da tripsina através de marcação química com cloreto de p-diazoniobenzamidina e caracterização cinética da enzima modificada: 3'(p-benzamidinodiazó) Tyr (151)- β -Tripsina*. Belo Horizonte, UFMG, 1993. 113p. (Tese D.S.).
10. OWSLEY, W.F.; ORR, D.R. & TRIBBLE, L.F. Effects of age and diet on development of the pancreas and the synthesis and secretion of pancreatic enzymes in the young pig. *J. Anim. Sci.*, 63:497-504, 1986.
11. PETTIGREW, J.E. & JOHNSTON, L.J. Young pig nutrition overview. In: ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF SWINE PRACTITIONERS, 25, Chicago, 1994. Anais, Chicago, Amer. Assoc. Swine Practitioners, 1994. p.212-217.
12. TARDIN, A. C. Fisiologia digestiva e nutrição no desmame precoce de leitões. In: CONGRESSO DA ABRAVES, Rio de Janeiro, 1985. Anais, Rio de Janeiro, ABRAVES, 1985. p.33-57.
13. VAN BAAK, M.J.; RIETVELD, E.C. & MAKKINK, C.A. Determination of trypsin and chymotrypsin activity in pancreatic juice, tissue and chyme: the effect of freeze drying and storage. In: VERTEGEN, M.W.A.; HUISMAN, J. & HARTOG, L.A. den. (eds.) *Digestive Physiology in Pigs*. Wageningen, Pudoc, 1991. p.356-360.
14. WALSH, K.A. & NEURATH, H. Trypsinogen and chymotrypsinogen as homologous proteins. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 52:884-889, 1964.
15. WESTROM, B.R.; PIERZYNOWSKI, S.G.; SVENOSEN, J. & KARLSSON, B.W. Stimulatory effect of dietary changes at weaning on the exocrine pancreas in developing pigs. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF DIGESTIVE PHYSIOLOGY IN PIGS, 5, Wageningen, 1991. Anais, Wageningen, s.ed., 1991. p.55-59.