

RODRIGO KNOP GUAZZI MESSIAS

**AVALIAÇÃO NUTRICIONAL DE ENZIMAS EXÓGENAS EM DIETAS PARA
FRANGOS DE CORTE**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2014

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

M585u
2014
Messias, Rodrigo Knop Guazzi, 1984-
Avaliação nutricional de enzimas exógenas em dietas para
frangos de corte / Rodrigo Knop Guazzi Messias. – Viçosa, MG,
2014.
ix, 76f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Luiz Fernando Teixeira Albino.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Frangos de corte - Alimentação e rações. 2. Frangos de
corte - Nutrição. 3. Nutrição animal. 4. Digestão. 5. Enzimas.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Zootecnia.
Programa de Pós-graduação em Zootecnia. II. Título.

CDD 22. ed. 636.085

RODRIGO KNOP GUAZZI MESSIAS

**AVALIAÇÃO NUTRICIONAL DE ENZIMAS EXÓGENAS EM DIETAS PARA
FRANGOS DE CORTE**

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

APROVADA: 15 DE JULHO DE 2014

Dr Nei André Arruda Barbosa

Dr Gladstone Brumano

Dr^a Melissa Izabel Hannas
(Coorientadora)

Dr Horácio Santiago Rostagno
(Coorientador)

Dr Luiz Fernando Teixeira Albino
(Orientador)

"A mente que se abre para uma nova ideia jamais volta a seu tamanho original."

(Albert Einstein)

"Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível."

(Charles Chaplin)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por iluminar meus caminhos e colocar em minha vida pessoas que sempre me ajudaram e me puxaram para cima (dentre elas, as citadas nesta página).

A Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Zootecnia por serem capazes de me propiciar toda estrutura necessária para que eu fizesse minha graduação, mestrado e agora doutorado.

A CAPES por conceder a bolsa sem a qual seria impossível estar aqui.

A empresa DSM Nutricional Products em especial a José Otavio Sorbara e Rafael Hermes por todo apoio nos experimentos.

Ao meu Orientador desde a iniciação científica, professor Luiz Fernando Teixeira Albino, por todas as oportunidades que me foram dadas, toda a paciência (e precisou de muita), conselhos e também amizade.

Ao Professor Horácio Santiago Rostagno por estar sempre disposto a ajudar, dando valiosos conselhos não só na parte acadêmica, mas também para a vida. E também a professora Melissa Izabel Hannas que desde que chegou demonstrou boa vontade em auxiliar no que fosse necessário.

Aos demais membros da banca Dr Nei André Arruda Barbosa e Dr Gladstone Brumano pela disponibilidade e importantes sugestões na correção da tese.

A Illinois University, em especial Dr Ryan N. Dilger e a sua equipe, por abrirem a mim as portas para que durante algum tempo eu pudesse ter uma vivência de valor incontestável para minha vida pessoal e acadêmica.

Aos Funcionários do Setor de Avicultura, Fábrica de Ração e Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa em especial Adriano, Elísio, José Lino, Mauro e Venâncio.

A Mariana por todo amor e carinho dedicados a mim.

Aos meus pais Marcus Messias Filho e Rita de Cássia Knop Guazzi Messias, irmãos Marcus Daniel (Dé) e Luiz Henrique (Rique), minhas avós Maria Ignez e Diva, aos tios Ana Elisa (Dindinha), Alberto (Bebé), Helena (Nena), José Américo (Zezé) e Maria Cristina (Tina), aos primos Marcus (Marquinhos), Aline (Nine) e Carlo Luigi (Calu), por todo afeto, apoio, confiança, conselhos, incentivos e ajuda.

Aos companheiros de batalha Sandra, Rodolfo, Valdir, Bruno C. Bruno D. Diego, Hélivio, Leandro, Neto, Rosana, Victor, Gabriel, Thony, Luana, Matheus F., Matheus S., Bruna, Maurílio Vinícius e a todos que passaram pelo aviário e me ajudaram de alguma forma desde que cheguei como estagiário.

Aos amigos de república desde o 38tão até hoje pela boa convivência, amizade, bons papos e apoio nos momentos de desabafo. Em especial Pacote, Queque, Smeagle e Passarinho.

BIOGRAFIA

Rodrigo Knop Guazzi Messias filho de Marcus Messias Filho e Rita de Cássia Knop Guazzi Messias, nasceu em Ponte Nova MG, em 23 de abril de 1984.

Em 2003 ingressou no curso de Zootecnia na Universidade Federal de Viçosa, tendo colado grau em 26 de janeiro de 2008.

Em agosto de 2008 iniciou o curso de Mestrado em Zootecnia na área de Nutrição e Produção de Monogástricos submetendo-se a defesa em 22 de julho de 2010.

Em agosto de 2010 iniciou o curso de Doutorado em Zootecnia na área de Nutrição e Produção de Monogástricos submetendo-se a defesa em 15 de julho de 2014.

SUMARIO

Resumo	vii
Abstract	ix
Referencial Teórico	1
Carboidratos	3
Polissacarídeos não-amiláceos	3
Proteína	7
Fitato	9
Utilização de enzimas exógenas	12
Carboidrase	13
Proteases	15
Fitases	16
Referencias Bibliográficas	19
Artigo 1 – AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE ENZIMAS EXÓGENAS EM DIETAS PARA FRANGOS DE CORTE	27
Resumo	28
Abstract	29
Introdução	30
Metodologia	30
Resultados	34
Discussão	35
Referencias Bibliográficas	37
Artigo 2 -Uso de enzimas exógenas sobre a digestibilidade ileal verdadeira de aminoácidos e as perdas endógenas em um farelo de soja e uma dieta basal.	41
Resumo	42
Abstract	43
Introdução	44
Material e Métodos	46
Resultados	48
Discussão	52
Referencias Bibliográficas	56
Artigo 3 -Digestibilidade ileal verdadeira de aminoácidos em dietas com diferentes níveis de proteína bruta, suplementadas com enzimas.	59
Resumo	60
Abstract	61
Introdução	62
Material e Métodos	63
Resultados	66
Discussão	71
Referencias Bibliográficas	74
Conclusão Geral	76

RESUMO

MESSIAS, Rodrigo Knop Guazzi, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2014. **AVALIAÇÃO NUTRICIONAL DE ENZIMAS EXÓGENAS EM DIETAS PARA FRANGOS DE CORTE**. Orientador: Luiz Fernando Teixeira Albino. Coorientadores: Horacio Santiago Rostagno, Melissa Izabel Hannas e Sergio Luiz de Toledo Barreto.

Foram realizados três experimentos para avaliar os efeitos da utilização de enzimas sobre a digestibilidade de aminoácidos e desempenho de frangos de corte. O primeiro experimento foi um ensaio de desempenho utilizando 2000 animais de 14 a 28 dias de idade dividido em três grupos cuja as dietas tiveram reduções conforme as recomendações das enzimas (Fitase, Protease, Fitase + Protease), cada grupo possuía três tratamentos Controle Negativo (CN), Controle Negativo + Enzima (CNE) Controle Positivo (CP), foi ainda adicionado um tratamento utilizando os níveis das Tabelas Brasileiras 2011 (Rostagno et. al 2011), totalizando 10 tratamentos com 10 repetições e 20 animais por unidade experimental montados em blocos casualizados e avaliados por meio de contrastes ortogonais. Os tratamentos que receberam Fitase apresentaram maior ($P < 0,05$) ganho de peso e conversão alimentar comparado aos que não receberam a enzima. Não houve diferença ($P > 0,05$) para ganho de peso nos tratamentos que receberam a protease. A associação das enzimas promoveu melhora de todos os parâmetros de desempenho comparados quando comparados ao controle negativo. No segundo experimento foram realizados 3 ensaios com o objetivo de avaliar a perda endógena de aminoácidos, a digestibilidade verdadeira de aminoácidos em um farelo de soja e de uma dieta completa. Cada ensaio utilizou 168 animais divididos em quatro tratamentos: Tratamento controle (sem adição de enzimas), Adição de protease, adição de carbohidrase, Associação entre as duas enzimas. cada tratamento possuía 6 repetições e 7 aves por unidade experimental distribuídas em um delineamento inteiramente ao acaso. as enzimas influenciaram a perda endógena de aminoácido pelas aves, além de aumentar a digestibilidade ileal dos aminoácidos do farelo de soja e da dieta basal. Houve também, efeito mais pronunciado da protease em relação à carbohidrase, além disso, a associação das enzimas proporcionou efeito semelhante à protease usada isoladamente. Não foi observado efeito aditivo das enzimas. O terceiro experimento foi realizado com o objetivo de

determinar a digestibilidade ileal de aminoácidos de dietas com diferentes níveis de proteína bruta suplementadas com enzimas. Foram utilizados 504 pintos de corte durante o período experimental de 14 a 24 dias de idade. Os animais foram distribuídos em gaiolas metabólicas em esquema fatorial 4 x 2 (enzimas e níveis de proteína bruta) resultando em 8 tratamentos com 6 repetições e 7 aves por unidade experimental. As enzimas usadas foram: uma protease, uma carboidrase e a associação de ambas, para determinação da digestibilidade verdadeira, foram utilizados os valores de excreção do experimento 2. Os níveis de proteína bruta utilizados foram 21,0% e 14,7%. A suplementação das dietas com enzimas isoladas ou em associação proporcionou aumento ($P < 0,05$) na digestibilidade da maioria dos aminoácidos. A dieta com menor teor de proteína bruta apresentou maior digestibilidade verdadeira dos aminoácidos. Houve interação significativa ($P < 0,05$) para alguns aminoácidos.

ABSTRACT

MESSIAS, Rodrigo Knop Guazzi, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July de 2014. **Nutritional Evaluation of Exogenous Enzymes in Diets For Broilers Chicks.** Advisor: Luiz Fernando Teixeira Albino. Co-advisors: Horacio Santiago Rostagno, Melissa Izabel Hannas and Sergio Luiz de Toledo Barreto.

Three experiments were conducted to evaluate the effects of enzymes on the amino acid digestibility and performance of broiler chickens. The first experiment was a performance trial using 2000 animals from 14 to 28 days of age divided in three groups whose diets had reductions according to the recommendations of the enzyme (Phytase, Protease, Phytase +Protease), each group had three treatments Negative Control (CN), Cotrole Negative + Enzyme (CNE) Positive Control (CP), was also added using a treatment levels of the Brazilian Tables 2011 (Rostagno et. al 2011), totaling 10 treatments with 10 replications and 20 animals per experimental unit distributed on randomized blocks and evaluated by orthogonal contrasts. The treatments with phytase had higher ($P < 0.05$) weight gain and feed conversion compared to those not receiving enzyme. There was no difference ($P > 0.05$) for weight gain in treatments with protease. The association of enzymes promoted improvement in all parameters compared performance when compared to the negative control. In the second experiment was performed with 3 trials to evaluate the loss of endogenous amino acids, the true digestibility of amino acids in soybean meal and also in a complete diet. Each trial used 168 animals divided into four treatments: control (no enzyme addition) Addition of protease, carbohydrase addition, association between the two enzymes. Each treatment had 6 replicates and 7 birds per pen, distributed in a completely randomized design. Enzymes influenced the birds' endogenous amino acid loss, besides increasing the ileal digestibility of amino acids in soybean meal and the basal diet. There was also more pronounced effect compared to protease carbohydrase addition, the combination of the protease enzymes used yielded similar isolation effect. No additive effect of the enzymes was observed. The third experiment was conducted to determine the ileal amino acid digestibility of diets with different levels of crude protein supplemented with enzymes 504 broiler chicks were used during the experimental period of

14 to 24 days old. The animals were distributed in metabolic cages in 4 x 2 factorial (enzymes and protein levels) resulting in 8 treatments with 6 replicates of 7 birds per experimental unit. The enzymes used were: a protease, carbohydrase and one a combination of both, to determine the true digestibility values of excretion of the experiment 2. Protein levels used were 21.0% and 14.7% were used. The supplementation of diets with isolated enzymes or in combination resulted in an increase ($P < 0.05$) in digestibility of most amino acids. A diet with lower crude protein showed higher true digestibility of amino acids. There was a significant interaction ($P < 0.05$) for some amino acids.

REFERENCIAL TEÓRICO

Digestão de carboidratos

A disponibilidade dos carboidratos para os animais é dependente de três fatores básicos: digestibilidade, absorção dos produtos finais da digestão e metabolismo dos produtos da absorção. A digestibilidade é o fator que representa a maior contribuição na eficiência total de utilização, sendo diretamente relacionada ao tipo de alimento e suas características intrínsecas (Vieira, 2002).

A capacidade digestiva das aves está intimamente relacionada a sua idade (Longo, 2003). Durante as primeiras semanas de vida, a atividade enzimática e do desenvolvimento fisiológico não estão consolidados. A digestibilidade da energia é significativamente inferior nas aves nas primeiras semanas de vida, elevando-se a partir da terceira semana. O segmento do intestino delgado que propicia maior crescimento inicial é o duodeno (Olukosi *et al.*, 2007). Além disso, a digestibilidade do amido também pode ser afetada por diversos fatores, como a composição e forma física do amido, interações entre proteína – amido, integridade celular e forma física do alimento, que são diferentes entre as diversas fontes empregadas (Murray *et al.*, 1999; Wolover; Bolognesi, 1996).

A digestão de alimento pelas aves tem seu início no proventrículo, onde ocorre a digestão gástrica e na moela, onde ocorre a digestão física ou mecânica. Na moela, a ação de abrasão promovida por sua extensa musculatura, junto com o HCl e pepsina liberadas pelo proventrículo, promovem o rompimento físico das paredes celulares vegetais. A maximização desse processo pelas aves está diretamente relacionada ao grau de processamento físico sofrido pelo alimento antes da ingestão. Nesse processo ainda não há qualquer ação de enzimas endógenas sobre o alimento, há apenas a trituração, o que nos sistemas de criação de hoje tem pouco importância, já que as aves recebem o alimento em tamanho reduzido.

Após a trituração, o alimento segue ao intestino delgado. No duodeno

ocorre a mistura de alimento com as secreções digestivas e alcalinas e no jejuno a maior parte da digestão e absorção. As vilosidades presentes na mucosa intestinal são muito longas no jejuno e diminuem progressivamente até o final do íleo apresentando-se cobertas por células epiteliais, predominantemente enterócitos, que formam as microvilosidades. Os enterócitos participam efetivamente do processo de digestão.

A ação das enzimas pancreáticas nesse local auxilia na digestão dos carboidratos, mas ainda não a ponto de passar pela membrana do enterócito. O enterócito, através de suas enzimas associadas ao glicocálix como maltase, sucrase e a isomaltase são responsáveis pela redução dos carboidratos à unidades de nutrientes capazes de serem absorvidas (glicose, frutose, etc). O glicocálix determina a imobilização parcial de várias enzimas digestivas, permitindo que haja tempo suficiente para a completa digestão de carboidratos.

O pâncreas é o maior responsável pela digestão dos carboidratos, proteínas e lipídeos. A enzima alfa-amilase age sobre o amido, hidrolisando as ligações alfa- 1,4 da amilose, gerando maltose e maltotriose. Age também sobre a amilopectina, levando a produção de dextrina – limite em adição às ligações alfa-1,4. A dextrina – limite é composta de oito a dez moléculas de glicose com uma ramificação alfa-1,6.

As enzimas pancreáticas são dependentes do pH intestinal, sendo de 7,1 o pH ótimo para alfa-amilase. A regulação do pH intestinal é dependente da secreção intestinal do hormônio secretina. Essa secreção é liberada do duodeno em resposta a entrada de alimento com secreções gástricas do proventrículo e moela. A secretina estimula o pâncreas a liberar, principalmente bicarbonatos, aumentando o pH do meio.

Finalizado o processo de digestão de moléculas maiores, os monossacarídeos são os carboidratos passíveis de serem absorvidos. A absorção de dissacarídeos pode ser considerada como um indicador de injúria da mucosa intestinal. Os monossacarídeos são absorvidos por processo de transporte ativo dependente de sódio, casos da glicose e

galactose, ou então por difusão facilitada, casos da frutose e pentose. Em ambos os casos, jejuno e íleo são mais importantes do que duodeno. A frutose é parcialmente convertida em glicose durante a sua passagem da célula absorviva para a corrente sanguínea (Vieira, 2002).

Todo esse processo de absorção é dependente de alguns fatores, considerados extrínsecos, como: taxa de passagem/tempo de trânsito intestinal, concentração de substrato disponível para ação enzimática e a presença de outros componentes da dieta que retardam a hidrólise enzimática (Chapman *et al.*, 1985; Cummings & Englyst, 1995).

Os carboidratos absorvidos podem seguir a rota da glicólise com posterior entrada no ciclo dos ácidos tricarbóxicos e cadeia respiratória, produzindo 38 ATPs, dióxido de carbono e água ou então, dependendo do estado nutricional do animal, seguir o fluxo de armazenamento de energia, tendo a glicose desviada para a síntese de glicogênio. A glicose circulante em excesso também pode formar ácidos graxos de no máximo 16 carbonos que são posteriormente esterificados à triglicerídeos ou participar da síntese de outros compostos como fosfolípidos, glicolípidos, etc.

Polissacarídeos não-amiláceos

A porção de fibra das plantas e vegetais engloba uma diversidade de polímeros com grandes diferenças nas propriedades físico-químicas, as quais influenciam de maneiras distintas a viscosidade e o pH da digesta, capacidade de troca de íons, taxa de passagem, capacidade de fermentação e aumento do volume do conteúdo dentro do TGI (Davidson & McDonald, 1998; Mateos *et al.*, 2012). De acordo com Šramková *et al.* (2009), Căpriță *et al.* (2011) e Slominski, (2011) a fibra presente nos cereais pode ser classificada como lignina, celulose e polissacarídeos não-celulolíticos, sendo os dois últimos generalizados como polissacarídeos não-amiláceos (PNA).

Os PNA são polímeros de açúcares simples, normalmente pentoses e hexoses, unidos por ligações resistentes a hidrólise no TGI de animais monogástricos (Brito *et al.*, 2008; Căpriță *et al.*, 2011). Segundo Choct &

Kocher (2000), a nomenclatura dos PNA é confusa na literatura, mas estas estruturas podem ser divididas em celulose, polímeros não-celulosídicos e polissacarídeos pécticos. Os PNA ainda podem ser subdivididos em solúveis (PNAs) e insolúveis (PNAi), tal subdivisão é baseada se há solubilização quando misturados à água (Choct & Annison, 1990; Annison, 1993; Căpriță et al., 2011; Elleuch et al., 2011). A solubilidade em água é uma propriedade importante, pois determina sua atividade anti-nutricional e a maneira como o PNA influencia a digestão e absorção quando ingerido (Annison, 1993; Elleuch et al., 2011).

Os PNA solúveis incluem substâncias pécticas, gomas, mucilagens e algumas hemiceluloses (arabinoxilanos, β -glucanos, D-xilanos, D-mananos e xiloglucanos, entre outros). Já nos PNA insolúveis são englobadas a celulose e algumas hemiceluloses (Davidson & McDonald, 1998; Šramková et al., 2009; Căpriță et al., 2011). A capacidade dos cereais em formar ambientes viscosos é dependente da concentração de PNA solúveis na dieta. Choct (2010) classifica o trigo, a cevada, o triticale, o centeio e a aveia como ingredientes viscosos e o milho e o sorgo como ingredientes não viscosos.

Os cereais contêm entre 10-30% de PNA, dos quais em sua grande maioria são compostos predominantemente por arabinoxilanas (pentosanas), β -glucanas e celulose (Choct, 1997; Choct, 2010). Cada tipo de PNA é caracterizado pelo tipo de resíduo de açúcar e natureza das ligações entre eles (Davidson & McDonald, 1998).

A celulose é um polímero composto por moléculas de glicose unidas por ligações glicosídicas do tipo β -(1-4), sendo o composto orgânico encontrado em maior concentração na natureza e representa cerca de 50% do carbono nos vegetais (Choct, 1997; Davidson & McDonald, 1998; Fireman & Fireman, 1998). A celulose presente nos farelos encontra-se complexada com ligninas e hemiceluloses (principalmente arabinoxilanas) (Biely et al., 1986). A celulose e a maioria das arabinoxilanas dos cereais são insolúveis em água. No entanto, as arabinoxilanas que não estão

ligadas à parede celular podem formar soluções altamente viscosas e absorver água cerca de 10 vezes o seu peso (Choct, 1997).

Normalmente a fibra insolúvel é considerada como diluente de nutrientes na dieta e não é fermentada pela micorbiota do TGI em frangos, portanto, não altera a composição e quantidade da microbiota de maneira significativa (Choct et al., 1996; Hetland et al., 2004). Embora seja considerada como diluente, não deve ser considerada como substância inerte pois apresentam propriedades funcionais que não podem ser negligenciadas na nutrição de animais monogástricos (Choct, 1997; Davidson & McDonald, 1998). Foi relatado por Hetland & Svihus, (2001) que sua inclusão na dieta de frangos geralmente aumenta a capacidade de ingestão do TGI e/ou promove redução no tempo de trânsito ao longo do TGI, resultando normalmente em aumento na ingestão de ração.

A redução no tempo de retenção da dieta no TGI geralmente está associado com digestibilidade dos nutrientes mais baixas, pois sugere-se que a exposição dos nutrientes às enzimas digestivas é menor. Entretanto, segundo Choct (1997) tal teoria não é válida sob determinadas circunstâncias. Quando os PNAi são adicionados a dieta acredita-se que não há alteração na viscosidade da digesta e conseqüentemente a digestibilidade dos nutrientes é aumentada, o material não digerido passa pelo intestino rapidamente não havendo tempo suficiente para a microbiota anaeróbica se estabelecer na porção distal do intestino delgado (Choct, 1997).

As fibras insolúveis geralmente são pouco fermentáveis, não viscosas e excretadas de forma intacta. Uma das características mais importante dos PNAi está atribuída a capacidade destes absorver grandes quantidades de água e manter a motilidade normal do TGI (Stephen & Cummings 1979). Característica essa essencial para a consistência das excretas em animais monogástricos (Choct, 1997). Amerah et al. (2009) observaram que o escore da excreta foi significativamente reduzido nas dietas contendo serragem.

Acredita-se que a grande maioria, senão todos, os PNA que apresentam atividade anti-nutritiva são solúveis em água (Căpriță et al., 2011), embora o inverso não seja necessariamente verdadeiro (Annison, 1993). As ramificações presentes nos PNAs conferem irregularidade à estrutura dos polissacarídeos, impedindo interação entre as cadeias e permitindo que a água penetre facilmente e, desse modo torna os PNA solúveis. No geral, quanto maior o número de ramificações, maior é a solubilidade da molécula (Annison, 1993). No entanto, a solubilidade não é determinada apenas pela sua estrutura primária, mas também pelas ligações entre os PNA e outros componentes, presença de grupos carregados e pelo tipo de ligação (pontes de hidrogênio, ligações iônicas ou covalentes) entre as moléculas da parede celular (Smits & Annison, 1996).

O aumento na viscosidade do conteúdo intestinal está associado principalmente à capacidade dos PNAs absorver água. A formação de um ambiente gelatinoso, causado pelo aumento na viscosidade retém os nutrientes, dificultando o contato das enzimas de mucosa e pancreáticas com seu substrato, condição denominada como “efeito jaula”, a viscosidade ainda reduz a taxa de esvaziamento gástrico e aumenta o tempo de trânsito (Annison, 1993; Classen, 1996; Iji, 1999; Bedford, 2000; Mello et al., 2009; Hartini & Choct, 2010; Aftab, 2012). A viscosidade da dieta aumenta do duodeno para o íleo, assim como a estrutura e a função intestinal no íleo é mais afetada em relação aos demais segmentos intestinais (Iji et al., 2001a,b).

Não existem evidências claras de que o aumento na viscosidade *per se* seja responsável pela inibição da digestão associado ao menor desempenho em aves. Annison (1993) afirma que atribuir os efeitos anti-nutritivos dos PNA somente ao aumento da viscosidade da digesta é uma visão muito simplista. É possível que uma ou mais propriedades dos PNA estejam envolvidas na atividade anti-nutritiva da molécula. Por exemplo, alguns polissacarídeos exibem maior potencial de adsorver partículas e interagir com outras moléculas. As interações entre proteína e polissacarídeos são comuns por ambos apresentarem superfícies

hidrofóbicas e hidrofílicas, assim, as enzimas podem ser inativadas pela formação destes complexos.

O metabolismo lipídico no intestino pode ser alterado pela presença de PNA, pois pode reduzir a capacidade de emulsificação da gordura ou a formação das micelas (Smits & Annison, 1996). Muitos polissacarídeos têm a capacidade de estabilizar emulsões óleo/água pela interação entre estes compostos, sendo possível que a presença de PNA interfira na interface entre as lipases pancreáticas com o substrato, inibindo o mecanismo de digestão e absorção de lipídios (Annison, 1993). Ainda, os PNA podem estar envolvidos com o aumento na excreção de ácidos biliares e o aumento da atividade bacteriana no intestino grosso, causando aumento na desconjugação de ácidos biliares, prejudicando o retorno desses compostos ao fígado (Smits & Annison, 1996). Para restabelecer o conteúdo destes componentes e compensar sua redução na circulação entero-hepática, o fígado aumenta a síntese hepática de ácidos biliares (Choct, 1997; Choct & Kocher, 2000). Se essa afirmação for assumida como verdade, presumidamente a absorção de vitaminas lipossolúveis também são prejudicadas na presença de PNA. O aumento na quantidade de excretas úmidas e/ou pegajosas também pode ser atribuído a elevada concentração de PNA nas dietas, especialmente arabinosilanas e β -glucanas, resultado da menor absorção de água, minerais e elementos traços (Choct & Annison, 1992a; Annison, 1993; Classen, 1996; Brito et al., 2008; Slominski, 2011).

O estudo das frações fibrosas se faz necessário para a elucidação dos mecanismos de ação destes importantes constituintes dos alimentos. Pesquisas sobre o uso de enzimas que "quebrem" estes constituintes têm sido feitas em larga escala, já obtendo importantes resultados.

Proteínas.

As aves apresentam um trato digestório relativamente curto, em comparação aos mamíferos, assim sendo, o processo de trituração do alimento e desnaturação das proteínas precisa ser consideravelmente eficiente para uma adequada digestão protéica.

A digestão protéica em frangos de corte tem seu início no proventrículo, este órgão é responsável pela secreção de ácido clorídrico e pepsinogênio pelas células principais. O ácido ou a pepsina transformam o pepsinogênio em pepsina, sua forma ativa, e o pH ácido é o ideal para as enzimas digestivas funcionarem. O resultado deste processo é a desnaturação das proteínas dietéticas com a abertura destes compostos e a eliminação da estrutura terciária o que facilita a ação das enzimas proteolíticas na moela e intestino delgado (Rutz, 2002). Concluída a digestão gástrica o conteúdo, agora denominado quimo, é liberado para o intestino delgado em pequenas quantidades. A chegada desta pasta semi-líquida ácida no duodeno vai estimular a produção de hormônios e estes a liberação da bile e do suco pancreático (rico em proteases, carboidrases, lípases e bicarbonato de sódio), pelo fígado e pelo pâncreas, respectivamente (Argenzio, 1993).

A digestão protéica no intestino delgado é muito mais rápida e intensa devido à ação das enzimas pancreáticas responsáveis pela digestão no lúmen intestinal e pelas enzimas presentes na mucosa intestinal. As proteases que agem no intestino delgado podem ser divididas em três grupos endopeptidases e exopeptidases secretadas pelo pâncreas, e aminopeptidases secretadas pela mucosa intestinal (Champe & Harvey, 2006).

As endopeptidases e exopeptidases no lúmen intestinal realizam hidrólise da maior porção do quimo. Porém há evidências que pequenas porções peptídicas são resistentes a hidrólise luminal. A digestão dos peptídeos provenientes da ação das enzimas gástricas e pancreáticas até aminoácidos são completadas pelas múltiplas peptidases produzidas pelas células das vilosidades das porções iniciais do intestino delgado. As peptidases mais importantes são as aminopolipeptidases e as dipeptidases, que desdobram os peptídeos remanescentes em tripeptídeos e dipeptídeos e alguns aminoácidos (Peluzio & Batista, 2008).

Uma pequena parte da proteína dietética não é digerida e quando essa porção atinge o intestino grosso sofre hidrólise e ressintese pelas

bactérias presentes neste local. Por essa razão, o íleo terminal é o local mais indicado para determinação de digestibilidade de aminoácidos de uma dieta ou ingrediente, por haver pequena influência da microbiota e não haver a presença de ácido úrico nesta porção do trato digestivo (Zanella et al., 1999).

Fitato

A literatura apresenta três nomenclaturas distintas para definir o P complexado ao anel de *myo*-inositol: fitato, fitina e ácido fítico. O ácido fítico é a forma livre do anel de *myo*-inositol hexafosfato (IP6), ou seja, é um éster de álcool cíclico de inositol com seis grupamentos fosfato (Onyango et al., 2005). O fitato, termo mais difundido na literatura, refere-se ao ácido fítico na forma de sal e a fitina é a forma comumente encontrada nas plantas que remete ao complexo formado entre o *myo*-inositol hexafosfato com o potássio, magnésio e cálcio (Angel et al., 2002; Selle & Ravindran, 2007). A fitina está presente em todos os ingredientes de origem vegetal como forma de reserva do P, necessário ao processo de germinação dos vegetais (Lima et al., 2007).

Os fitatos além de tornar o fósforo indisponível, tem a capacidade de formar quelatos com cátions bivalentes (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+}), reduzir a disponibilidade de alguns carboidratos e aminoácidos da dieta e ainda interagir com enzimas digestivas (Angel et al., 2002; Pirgozliev et al., 2007; Singh, 2008). Onyango et al. (2005) demonstraram a partir de eletromicrografias feitas da digesta que as moléculas de fitato estavam presentes no papo (pH 4-5), não sendo visualizadas sua presença no estômago (pH 2,5), reaparecendo no jejuno e íleo (pH 6-7). O fitato se torna solúvel em ambientes de pH ácido e o aumento no pH da digesta, conforme esta se move distalmente no TGI, aumenta a formação de complexos entre cátions e o fitato com conseqüente redução na sua solubilidade (Angel et al., 2002; Onyango et al., 2005). De acordo com Cowieson et al. (2011), se a única conseqüência da presença de fitato na dieta fosse a diluição do Pd seria uma questão relativamente simples para se resolver por meio da formulação.

A concentração de Ca na dieta, bem como a relação com o P, tem sido apontado como responsável pela redução na hidrólise da molécula de fitato no TGI (Nelson, 1967; Cowieson et al., 2009). Shafey et al. (1991), observaram que o incremento no nível de Ca da dieta de 1,07% para 2,53% resultou em aumento no pH da moela de 4,89 para 5,32 e no íleo de 6,62 para 7,39. A solubilidade do Ca foi de 16,9% em dietas contendo relação de Ca:P de 3,56 (1,53:0,43), entretanto quando esta relação foi alterada para 2,72 (2,26:0,83) a solubilidade do Ca caiu para 8,3%. A maioria dos complexos formados entre o ácido fítico e os minerais são precipitados no pH encontrado no ambiente intestinal, aumentando a proporção destes complexos conforme a relação Ca:P aumenta (Angel et al., 2002).

O impacto do Ca quando comparado a outros cátions se deve ao fato deste estar presente em níveis de 8-40 vezes mais elevados que os níveis de Zn por exemplo, considerando sua elevada concentração na dieta muito mais expressiva que sua afinidade com a molécula de ácido fítico. Tamim & Angel (2003) e Tamim et al. (2004), verificaram que a redução de 5 g/kg nas concentrações de Ca pode resultar em aumento de >70% na digestibilidade no íleo terminal de frangos. A formação de sabões insolúveis no lúmen intestinal é outro ponto negativo da presença de fitato na dieta. Segundo Nunes (2001) o complexo cálcio-fitato pode interagir com ácidos graxo e formar sabões, reduzindo a metabolizabilidade da energia e a digestibilidade de aminoácidos. Além do nível de Ca, variáveis como vitamina D3 e seus metabólicos, tamanho de partícula do ingrediente e processamento da ração também podem influenciar a quebra do fitato no TGI do animal (Angel et al., 2002).

Os fitatos são conhecidos também por formarem complexos com as proteínas sob condições de pH ácido ou alcalino (Yao et al., 2011). Segundo Cowieson et al. (2009), a formação de complexos fitato:proteína está relacionado a natureza do fitato e a agregação eletrostática da proteína na fase gástrica de digestão. Em ambientes de pH ácido, várias proteínas estão abaixo do seu ponto isoelétrico e se tornam positivamente carregadas, desta maneira interagem com as cargas negativas dos

grupos fosfatos formando ligações eletrostáticas com a molécula de fitato. Estes complexos são precipitados quando presentes em pH alcalino, reduzindo a solubilidade da proteína.

A redução na solubilidade da proteína pode ser responsável por inúmeros efeitos do fitato sobre o metabolismo. Dentre estes, o fluxo de Ca, Na, redução da digestibilidade dos aminoácidos e energia, bem como resultar em hipersecreção de HCl, mucina, pepsina, bile, bicarbonato de sódio e aumentar o fluxo de Na para o lúmen intestinal. Além de reduzirem a solubilidade das proteínas, o fitato ainda pode interagir com as enzimas digestivas e afetar de maneira negativa a ação destas sobre seu substrato (Cowieson et al., 2009; Cowieson et al., 2011). Todos esses fatores atuando de maneira conjunta desencadeiam uma cascata de reações que alteram completamente a dinâmica de digestão e absorção dos nutrientes e o custo de manutenção do TGI.

O ácido fítico foi considerado por Cowieson et al. (2004b) como fator antinutritivo mais irritante para mucosa. Sua presença na dieta de frangos resultou em perdas significativas de nutrientes endógenos e energia na forma de mucina, células intestinais, ácido siálico e enzimas pancreáticas (Cowieson et al., 2004b). No entanto, de acordo com Cowieson et al. (2004a) e Cowieson & Ravindran (2008), a maior consequência fisiológica da ingestão de fitato é a hiper-secreção de mucina gástrica e intestinal. A maneira como o fitato irrita a parede intestinal, segundo McKay & Baird (1999) pode estar associada à microbiota intestinal, por esta causar inflamação e desencadear respostas imunológicas com aumento da produção de citocininas. Outro mecanismo de ação dos fitatos com relação microbiota é a alta concentração de peptídeos na parte distal do intestino, resultando em um ambiente favorável ao crescimento e proliferação de certas bactérias patogênicas (ex.: *Clostridium perfringens*) com alteração no estado imunológico das aves e possível desenvolvimento de casos de enterite necrótica (Cowieson et al., 2009).

Estas perdas têm implicações significativas em termo de custo energético associados com a síntese proteica e de mucina e com a

renovação da mucosa. Resumidamente, o esvaziamento gástrico resulta na presença de excesso de íons H⁺ no intestino, o qual é desafiado a manter as condições luminiais favoráveis para que as enzimas do pâncreas e da borda em escova possam atuar. A hiper-secreção de mucina e de bicarbonato de sódio, proporcional à variação na presença de proteína e íons H⁺, se torna responsável pelo aumento na presença de aminoácidos endógenos e sódio (Na) no lúmen e, presumivelmente, alterando as necessidades de manutenção e a capacidade do intestino para o transporte de nutrientes Na-dependente, incluindo glicose e peptídeos (Cowieson et al., 2009).

Uso de enzimas

A utilização comercial de enzimas como aditivo na a limentação animal tem uma história de menos de 30 anos, porém, sempre evoluindo. Em 2012, o valor de mercado global de enzimas foi de cerca de 3,7 bilhões de dólares, representando as enzimas destinadas à alimentação a nimal uma quota de 13%. O alto crescimento nas vendas de enzimas para indústria de ração animal teve resultado devido ao contínuo aumento nas vendas de protease e fitases para a America Latina, Ásia e Europa (Novozymes Sales and Markets, 2013).

As enzimas utilizadas na alimentação animal são produzidas industrialmente por laboratórios especializados, po r meio da seleção de cultura de microrganismos favoráveis, cultivados em sistema de fermentação avançados, de onde é feita a extração e purificação das enzimas. Os microrganismos que, geralmente são envolvidos na produção de enzimas são as bactérias *Bacillus subtilis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus amyloliquifaciens* e *Bacillus stearothermophils*, os fungos *Trichoderma longibrachiatum*, *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger* e a levedura *S.cerevisiae* (Khattak et al., 2006).

Segundo Tejedor et al. (2001), para a adição de enzimas em rações, é importante conhecer a composição dos ingredientes utilizados nas formulações e a especificidade da enzima com relação ao substrato . Por

isso, algumas considerações devem ser feitas quando se utiliza a suplementação específica de enzimas para dietas a base de milho, sorgo e farelo de soja. Nesse caso, quatro aspectos devem ser abordados. O primeiro seria o fato dos PNAs solúveis não estarem presentes em grandes quantidades nesses ingredientes; segundo seria a presença de grânulos de amido resistente, onde o amido não estaria completamente disponível; terceiro seria as altas concentrações de oligossacarídeos, principalmente no farelo de soja, no qual poderiam ser mais eficientemente aproveitados e utilizados como fonte de energia, enquanto o último seria a presença de frações de PNAs, incluindo os arabinoxilanos, glucanos, celulose, mananos, galactomananos e pectinas que poderiam servir como fonte de energia (Slominsk, 2011).

De acordo com Dourado (2008), há duas abordagens econômicas quando se incorpora enzimas exógenas nas formulações de rações. A primeira seria a aplicação chamada de “on top”, que consiste em suplementar as enzimas em uma dieta padrão, sem alterar os níveis nutricionais, com o objetivo de melhorar o desempenho. Entretanto, a adição de enzimas em dietas com níveis normais das matrizes nutricionais, produzirá uma liberação de nutrientes dos quais os animais não necessitam. Neste caso, a adição de enzimas estará aumentando o custo da ração e o excesso de nutrientes será convertido em gordura ou simplesmente serão excretados pelo animal (Bertechini; Brito, 2007; Lecznieski, 2006). A segunda seria alterar a formulação da ração, reduzindo os valores nutricionais e adicionando enzimas para restaurar o valor nutricional da dieta padrão, visando o mesmo desempenho de uma dieta com os níveis nutricionais normais, porém, de forma mais econômica.

Carboidrases

No ovo, a maioria da energia advém de fontes lipídicas e, logo que os pintainhos eclodem os carboidratos passam a ser sua principal fonte de energia. Porém aos 18 dias de idade no interior do ovo já é observado atividade de α -amilase no pintinho (Moran, 1985; Sklan, 2001). Entretanto a

atividade enzimática é muita baixa (Nir et al., 1993) e o aumento da secreção de amilase está ligado ao aumento da ingestão de alimento (Moran, 1985). Portanto há deficiência de aparato enzimático para digestão de carboidratos nessa fase.

A mistura de amilase, protease e xilanase em dietas a base de milho e farelo de soja, pode beneficiar o desempenho zootécnico de frangos e isso pode indicar que esses animais têm deficiências na produção enzimática endógena em algumas fases da vida (Zanella et al., 1999).

Outra forma de atuação das carboidrases está no rompimento da parede celular dos ingredientes de origem vegetal, principalmente os compostos insolúveis, facilitando a atuação de enzimas endógenas sobre substrato (Choct et al, 2004). Segundo Cowieson (2005), a utilização de carboidrases aumenta o acesso de enzimas pela hidrólise do arabinoxilano da parede celular. Isso pode justificar o aumento da energia metabolizável das dietas a base de milho e farelo de soja com a utilização de complexos enzimáticos, composto basicamente formado por amilases, proteases e xilanases. Desta forma uma enzima libera compostos do interior das paredes vegetais e as outras atuam complementando a atuação das endógenas.

Entretanto, mesmo com presença de substrato, algumas enzimas como xilanases, pentosanases, glucanases e fitases não são secretadas pela ave, pois o código genético das aves não tem a expressão para a síntese dessas enzimas (Penz Jr., 1998). Portanto por mais que esses compostos estejam na dieta, a digestão enzimática deles não será realizada sem auxílio de enzimas exógenas.

As xilanases são produzidas por microrganismos livres, fungos, algas, protozoários e sementes de plantas (Paloheimo et al, 2011) e são adicionadas a dietas com o objetivo de diminuir a viscosidade da dieta e aumentar a digestão de compostos como xilanos e principalmente de arabinoxilanos. Embora carboidrases proporcionem melhoria na digestibilidade dos nutrientes, segundo Carré (2004), esse efeito não pode

ser somente atribuído à queda na viscosidade da dieta, mas também a melhora na disponibilidade dos nutrientes que estão aprisionados nos PNA.

Proteases

As proteases são classificadas em exopeptidases ou endopeptidases, de acordo com a posição da ligação peptídica a ser quebrada na cadeia polipeptídica. A diferença entre elas é que as exopeptidases quebram as ligações peptídicas próximas ao grupamento amino terminal. Já as endopeptidases quebram as ligações peptídicas dentro da molécula, ou seja, distantes do grupo terminal do substrato, podendo ainda ser subdivididas em serina proteases, cisteína protease, aspártico protease ou metaloprotease (Moreira; Scapinello; Sakamoto, 2004).

Não existe ainda um consenso sobre o modo de ação das proteases, elas podem aumentar a produção endógena de peptidases, reduzirem as exigências de aminoácidos e energia, além de melhorar a digestibilidade da proteína dietética. Como um efeito adicional, as proteases podem hidrolisar as proteínas base dos anti-nutrientes como as lectinas ou inibidores de tripsina, melhorando a eficiência com a qual as aves utilizam os aminoácidos e reduzindo o turnover proteico (Ghazi et al., 2002; Marsman et al., 1997).

A grande variedade de proteases endógenas produzidas no trato gastrointestinal (TGI) das aves geralmente é suficiente para uma adequada utilização de proteínas (Nir; et al, 1993). No entanto, os resultados de digestibilidade indicam que consideráveis quantidades de aminoácidos e proteína passam pelo TGI sem serem aproveitados e completamente digeridos (Lemme; et al, 2004). A utilização de proteases exógenas pode maximizar a disponibilidade de aminoácidos e direcioná-los para manutenção e crescimento dos animais, contribuindo também com a EMA das rações e conseqüentemente, melhorando o desempenho e/ou diminuindo o custo de alimentação.

As dietas de frangos de corte no Brasil são compostas principalmente de milho e farelo de soja, podendo ter o sorgo com um ingrediente

energético viável na entressafra do milho. Porém, esses ingredientes possuem alguns componentes que podem prejudicar ou dificultar a digestão de suas proteínas, comprometendo a liberação de nutrientes no trato gastrointestinal, bem como a sua integridade.

Atualmente a suplementação de proteases nas dietas raramente é feita de forma isolada e são comumente encontradas fazendo parte de complexos multienzimáticos ou blends, envolvendo xilanases, glucanases, amilases e fitases. A eficácia desses blends com esta enzima está diretamente ligada a digestibilidade da dieta onde elas são adicionadas (Cowieson, 2010; Cowieson & Bedford, 2009).

Para que a suplementação enzimática obtenha efeito, dependerá do substrato e das características dos ingredientes utilizados nas dietas, ou seja, o sítio de ação desse composto (Olukosi; et al, 2007). Ou seja, para que o efeito da enzima possa aparecer, é necessário que haja substrato para que a enzima atue sobre ele.

Fitase

A fitase tem sido usada nas rações aproximadamente há duas décadas, sendo empregada, principalmente, com o objetivo de melhorar a biodisponibilidade do fósforo e reduzir sua excreção pelas aves, e continuar em crescimento a sua utilização. A eficácia da fitase para liberar o fósforo fítico e aumentar a utilização de fontes vegetais para aves ainda não está bem documentada (Selle et al., 2007). Atualmente, o uso de enzimas em rações para aves tem aumentado devido ao custo, cada vez mais elevado, das matérias-primas tradicionais e a busca por outros ingredientes alternativos. Elas, também são consideradas como uma forma de reduzir a contaminação ambiental com nutrientes nas excretas, tais como o fósforo, nitrogênio, cobre e zinco. Além disso, existe uma grande preocupação com a adição de aditivos antimicrobianos nas rações. Sua utilização, portanto, é uma alternativa para o uso de promotores antibióticos, com o objetivo de aumentar a digestibilidade dos alimentos e o desempenho das aves (Singh, 2008).

Na literatura há relatos que a partir dos estudos de Nelson et al. (1967), houve evolução biotecnológica para a produção dessa enzima e atualmente se conhece os efeitos na liberação de P fítico para diversas espécies (Cowieson et al., 2009). As pesquisas evidenciaram que nem todo o P é liberado e que a eficiência de liberação é decrescente à medida que se eleva o nível de atividade da enzima na ração. Pôde-se concluir nesses trabalhos que a utilização de 500, 300 e 600 FTU/kg de fitase, conseguem liberar 1,19; 1,14 e 1,16 g de P/kg em rações de suínos, poedeiras comerciais e frangos de corte, respectivamente. Considerando uma margem de segurança de 10%, estes valores correspondem a 5,5 kg de fosfato bicálcico (18% de P) por tonelada de ração ou 0,1 % de P disponível.

O estudo de Choct (2006) demonstrou que a fitase aumenta a disponibilidade do fósforo fítico entre 25 a 50 -70%. Além do fósforo, pesquisas recentes vêm mostrando efeito positivo da fitase em disponibilizar outros minerais, como cálcio, cobre e zinco, além de aminoácidos e também uma maior disponibilização de energia. Para Lecznieski (2006), o uso da fitase em dietas pode resultar em melhora dos resultados zootécnicos, tais como: melhor formação da estrutura óssea, menor incidência de problemas locomotores e, conseqüentemente, melhor uniformidade dos lotes. Isso é possível pelo fato de, aproximadamente, 30% do requerimento de fósforo dos animais serem garantidos pela fitase.

Vários estudos têm demonstrado que o aproveitamento do fósforo fítico pode ser melhorado com a utilização de enzimas exógenas, como a fitase, que é capaz de hidrolisar o fósforo fítico (Augspurger and Baker, 2004), liberando outros nutrientes além do fósforo e outros minerais (Cromwell & Coffey, 1991; Lan et al., 2002; Laurentiz, 2005; Rutherford et al., 2004; Selle et al., 2007). A utilização de enzimas para melhorar a digestibilidade e utilização de ingredientes como farelo de soja, soja integral, farelo de girassol e farelo de colza podem assumir grande importância econômica quando for capaz de reduzir o custo/tonelada da ração produzida ou com o objetivo de melhorar o desempenho zootécnico

dos animais. Além disso, a melhor digestibilidade tem efeito sobre a redução de nitrogênio e fósforo fecais (Fernandes & Malaguido, 2004).

Trabalhos recentes mostraram ser possível reduzir os níveis de nutrientes nas rações, mantendo satisfatoriamente o desempenho das aves e minimizando a excreção de alguns elementos minerais (Gomide et al, 2011; Nagata, 2009; Nahm, 2007; Silva et al., 2008), quando as rações são suplementadas com fitase nota-se uma melhora no aproveitamento dos nutrientes dos alimentos e implica na possibilidade de formulação de rações com menores quantidades de fontes inorgânicas de fósforo e também de outros nutrientes.

Trabalhos realizados por Meneghetti et al. (2011), avaliando efeito do de altos níveis de fitase em rações para frangos de corte nas fases inicial (1-21 dias), crescimento (22-35 dias) e final (36-42 dias), com níveis de fitase de 1.500; 3.000; 4.500; 6.000; 8.000 e 10.000 FTU/kg de ração mostraram que a utilização de altos níveis de fitase nas dietas tiveram aumento de forma quadrática, sendo que o valor de 5.500 FTU/Kg proporcionou a maior retenção de cálcio. Observaram, também, que houve uma retenção aparente linear crescente de fósforo e redução na excreção destes minerais.

Dozier, et al (2008), estudando a redução na densidade de aminoácidos, potencial inter-relação de aminoácidos e fitase sobre o desempenho, excreção de nitrogênio e fósforo de frangos de corte, observaram que é necessário determinar uma densidade ótima de aminoácidos para reduzir a excreção de nitrogênio, sem afetar a conversão alimentar. A suplementação com fitase não reduz a excreção de nitrogênio quando as dietas são formuladas com baixa densidade de aminoácidos.

Referências

- ACAMOVIC, T. Comercial application of enzyme technology for poultry production. *World's Poultry Science Journal*, Beekbergen, v. 57, n. 3, p. 225-242, sept. 2001.
- AFTAB, U. Exogenous carbohydrase in corn-soy diets for broilers. *World's Poultry Science Journal*, 68(03), 447-464. 2012.
- AMERAH, A. M., RAVINDRAN, V., LENTLE, R. G. Influence of insoluble fibre and whole wheat inclusion on the performance, digestive tract development and ileal microbiota profile of broiler chickens. *British Poultry Science*, 50(3), 366-75. 2009.
- ANGEL, R., TAMIM, N. M., APPEGATE, T. J., DHANDU, A. S., ELLESTAD, L. E. Phytic acid chemistry: Influence on phytin-phosphorus availability and phytase efficacy. *Journal Applied of Poultry Research*, 11, 471-480. 2002.
- ANNISON, G., HUGHES, R. J., CHOCT, M. Effects of enzyme supplementation on the nutritive value of dehulled lupins. *British Poultry Science*, 37, 157-172. 1996.
- ANNISON, G. The role of wheat non-starch polysaccharides in broiler nutrition. *Australian Journal of Agricultural Research*, 44, 405-422. 1993.
- ARGENZIO, R.A. Funções Secretórias do Trato Gastrointestinal. In: SWENSON, M.J.; REECE, W.O. *Dukes: Fisiologia dos Animais Domésticos*. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.319-329. 1993.
- BEDFORD, M. R. Exogenous enzymes in monogastric nutrition - their current value and future benefits. *Animal Feed Science and Technology*, 86, 1-13. 2000.
- BERTECHINI, A. G.; BRITO, J. A. G. Utilização correta de enzimas em rações de aves. In: FÓRUM INTERNACIONAL DE AVICULTURA, 2., 2007, Curitiba. Anais... Curitiba: Animal World, 2007. 1 CD-ROM.
- BIELY, P., MACKENZIE, C. R., PULS, J. SCHNEIDER, H. Co-operativity of esterases and xylanases in the enzymatic degradation of acetyl xylan. *Biotechnology*, 4, 731-743. 1986.
- BRITO, M. S., FRANKLIN, C., OLIVEIRA, S., ROCHA, T. Polissacarídeos não amiláceos na nutrição de monogástricos - Revisão. *Acta Veterinária Brasileira*, 2(4), 111-117. (2008).

CĂPRIȚĂ, A., CĂPRIȚĂ, R., SIMULESCU, V. O., DREHE, R. M. (2011). Water Extract Viscosities Correlated with Soluble Dietary Fiber Molecular Weight in Cereals. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, 17(3), 242–245.

CARRÉ, B. Causes for variation in digestibility of starch among feedstuffs. *Poultry Science*. v.60 p. 76-89, 2004.

CHAMPE, PAMELA C., RICHARD A. HARVEY, AND DENISE R. FERRIER. *Bioquímica ilustrada*. Editora Artmed, 2006.

CHAPMAN, R. W. et al. Absorption of starch by healthy ileostomates: effect of transit time and of carbohydrate load. *American Journal of Clinical Nutrition*, New York, v. 41, n. 6, p. 1244-1248, jun. 1985.

CHOCT, M. Feed Non-Starch Polysaccharides: Chemical Structures and Nutritional Significance. *Feed Milling International*, 13, 1–10. 1997.

CHOCT, M., ANNISON, G. Anti-nutritive activity of wheat pentosans in broiler diets. *British Poultry Science*, 31(4), 811–821. 1990.

CHOCT, M., ANNISON, G. Anti-nutritive effect of wheat pentosans in broiler chickens: roles of viscosity and gut microflora. *British Poultry Science*, 33(4), 821–834. 1992.

CHOCT, M., KOCHER, A. Non-starch carbohydrates: Digestion and its secondary effects in monogastrics. In *Proceedings of the Nutrition Society of Australia* (pp. 31–38). 2000.

CHOCT, M. Enzymes for the feed industry: past, present and future. *Word's Poultry Science Journal*, Wageningen, v. 62, n. 1, p. 5-15, Mar. 2006.

CHOCT, M. Feed polysaccharides: nutritional roles and effect of enzymes. In: *IV Congresso Latino Americano de Nutrição Animal - IV CLANA*. Estância de São Pedro, SP, 65-78. 2010.

CLASSEN, H. L. Cereal grain starch and exogenous enzymes in poultry diets. *Animal Feed Science and Technology*, 62(1), 21–27. 1996.

COWIESON, A. J., ACAMOVIC, T., BEDFORD, M. R.. The effects of phytase and phytic acid on the loss of endogenous amino acids and minerals from broiler chickens. *British Poultry Science*, 45(1), 101–108. 2004a

COWIESON, A. J., ACAMOVIC, T., BEDFORD, M. R. The effect of phytic acid and phytase on the digestibility of maize starch for growing broiler chickens. *Poultry Science*, 45(1), 101–108. 2004b.

COWIESON, A.J., Factors that affect the nutritional value of maize for broilers. *Anim. Feed Sci. Technol.* 119, 293–305.2005.

COWIESON, A. J., RAVINDRAN, V. Effect of exogenous enzymes in maize-based diets varying in nutrient density for young broilers: growth performance and digestibility of energy, minerals and amino acids. *British Poultry Science*, 49(1), 37–44. 2008.

COWIESON, A. J., BEDFORD, M. R., SELLE, P. H., RAVINDRAN, V. Phytate and microbial phytase: implications for endogenous nitrogen losses and nutrient availability. *World's Poultry Science Journal*, 65(03), 401-418. 2009.

COWIESON, A. J. Strategic Selection of Exogenous Enzymes for corn/soybased Poultry Diets. *Poultry Science*, Champaign, v. 47, p. 1-7. 2010.

COWIESON, A. J., WILCOCK, P., BEDFORD, M. R. Super-dosing effects of phytase in poultry and other monogastrics. *World's Poultry Science Journal*, 67(02), 225–236. 2011.

CROMWELL, G. L.; COFFEY, R. D. Phosphorus: a key essential nutrient, yet a possible major pollutant: its central role in animal nutrition. In: ALLTECH'S ANNUAL SYMPOSIUM OF BIOTECHNOLOGY IN THE FEED INDUSTRY, 7., 1991, Nicholasville. Proceedings... Nicholasville: Alltech Technical, 1991. p. 133-145.

CUMMINGS, J. H.; ENGLYST, H. N. Gastrointestinal effects of food carbohydrate. *American Journal of Clinical Nutrition*, New York, v. 61, n. 4, p. 938-945, apr. 1995.

DAVIDSON, M. H., MCDONALD, A. Fibers: Forms and functions. *Nutrition Research*, 18(4), 617–624. 1998.

DOURADO, L. R. B. Enzimas exógenas em dietas para frangos de corte . 2008. 80 f. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) Universidade- Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

DOZIER, W. A.; KIDD, M. T.; CORZO, A. Dietary amino acid responses of broiler chickens. *Journal Applied Poultry Research*, Athens, v. 17, n. 1, p. 157-167, 2008.

ELLEUCH, M., BEDIGIAN, D., ROISEUX, O., et al. Dietary fibre and fibre-rich by-products of food processing: Characterisation, technological functionality and commercial applications: A review. *Food Chemistry*, 124(2), 411–421. 2011.

FERNANDES, P. C. C.; MALAGUIDO, A. Uso de enzimas em dietas de frangos de corte. In: CONFERÊNCIA APINCO, 11., 2004, São Paulo. Anais... São Paulo: APINCO, 2004. p. 117-129

FIREMAN, F. A. T., FIREMAN, A. K. B. A. T. (1998). Enzimas na alimentação de suínos. *Ciência Rural*, 28(1), 173–178.

GHAZI, S.; ROOKE, J. A.; GALBRAITH, H. Improvement of the nutritive value of soybean meal by protease and α – galactosidase treatment in broiler cockerels and chicks. *British Poultry Science*, London, v. 44, p. 410-418, 2003.

GOMIDE, E. M.; RODRIGUES, P. B.; BERTECHINI, A. G. Rações com níveis reduzidos de proteína bruta, cálcio e fósforo com fitase e aminoácidos para frangos de corte. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, MG, v. 37, n. 3, p. 450-457, maio/jun. 2011.

HARTINI, S., CHOCT, M. The effect of non-starch polysaccharides derived from different grains on performance and digestive activity in laying hens. *Journal of Indonesian Tropical Agriculture*, 35(2), 95-100. 2010.

IJI, P. A. The impact of cereal non-starch polysaccharides on intestinal development and function in broiler chickens. *World's Poultry Science Journal*, 55, 375-387. 1999.

KHATTAK, F. M. et al. Enzymes in poultry nutrition. *Journal of Animal Poultry Science*, Champaign, v. 16, n. 1/2, p. 1-2, 2006.

LAN, G. Q. et al. Efficacy of supplementation of a phytase-producing bacterial culture on the performance and nutrient use of broiler chickens fed corn-soybean meal diets. *Poultry Science*, Champaign, v. 81, n. 10, p. 1522-1532, Oct. 2002.

LAURENTIZ, A. C. de. Manejo nutricional das dietas de frangos de corte na tentativa de reduzir a excreção de alguns minerais de importância ambiental. 2005. 131 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005.

LECZNIESKI, J. L. Considerações práticas do uso de enzimas. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE AVES E SUÍNOS, 5., 2006, Florianópolis. Anais... Florianópolis: AveSui, 2006. 1 CD-ROM.

LEMME, A.; RAVINDRAN, V.; BRYDEN, W. L. Ileal digestibility of amino acids in feed ingredients for broilers. *World's Poultry Science Journal*, Ithaca, v. 60, p. 423-437, 2004.

LIMA, M. R., SILVA, J. H. V., ARAÚJO, J. A., LIMA, C. B., OLIVEIRA, E. R. A. Enzimas exógenas na alimentação de aves. *Acta Veterinaria Brasilica*, 1(4), 99-110. 2007.

LONGO, F. A. Avaliação de fontes de carboidrato e proteína e sua utilização na dieta pré-inicial de frangos de corte. 2003. 98 f. Tese (Doutorado em Agronomia)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2003.

MACKAY, D. M., BAIRD, A. W. Cytokine regulation of epithelial permeability and ion transport. *Gut*, 44, 283-289. 1999.

MARSMAN, G. J., H. GRUPPEN, A. F. VAN DER POEL, R. P. et al. "The effect of thermal processing and enzyme treatments of soybean meal on growth performance, ileal nutrient digestibilities, and chyme characteristics in broiler chicks." *Poultry science* 76, no. 6: 864-872. 1997

MATEOS, G. G., JIMÉNEZ-MORENO, E., SERRANO, M. P., LÁZARO, R. P. Poultry response to high levels of dietary fiber sources varying in physical and chemical characteristics. *Journal Applied of Poultry Research*, 21, 156–174. 2012.

MENEGHETTI, C. et al. Altos níveis de fitase em rações para frangos de corte. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 63, n. 3, p. 624-632, 2011.

MELLO, H. H. C., GOMES, P. C., ROSTAGNO, H. S., ALBINO, L. F. T., SOUZA, R. M., CALDERANO, A. A. Valores de energia metabolizável de alguns alimentos obtidos com aves de diferentes idades. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 38(5), 863–868. 2009.

MORAN, E.T. Digestion and absorption of carbohydrates in fowl and events through perinataldevelopment. *Journal of Nutrition*. v.115, p.665-674, 1985.

MOREIRA, I.; SCAPINELLO, C.; SAKAMOTO, M. U. Fisiologia da digestão e absorção de proteínas em aves. In: SAKOMURA, N. K. et al. *Curso de fisiologia da digestão e metabolismodos nutrientes em aves*. Jaboticabal: UNESP, 2004.

MURRAY, S. M. et al. Evaluation of selected high-starch flours as ingredients in canine diets. *Journal of Animal Science*, Champaign, v. 77, n. 8, p. 2180-2186, aug. 1999.

NAGATA, A. K. Uso do conceito de proteína ideal em r rações com diferentes níveis energéticos, suplementadas com fitase para frangos de corte de 1 a 21 dias de idade. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 33, n. 2, p. 599-605, mar./abr. 2009.

NAHN, K. H. Efficient phosphorus in poultry feeding to lessen the enviromental impact of excreta. *World's Poultry Science Journal*, Ithaca, v. 63, n. 5, p. 625-645, Sept. 2007.

NIR, I. Comparative growth and developmentof the digestive organs and some enzymes in the broiler chicks and egg typechicks after hatching. *British Poultry Science*, Oxford, v. 34, n. 3, p.523-532, 1993.

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*, London, v. 34, p.523–532, 1993.

NELSON, T. S. The utilization of phytate phosphorus by poultry-A review.*Poultry Science*, 46(4), 862–71. 1967.

NOVOZYMES SALES AND MARKETS. Report. Disponível em: <<http://report2012.novozymes.com/Service/Download+report/The-Novozymes-Report-2012.pdf>>. Acesso em: 15 ago. 2014.

NUNES, R. V, ROSTAGNO, H. S., ALBINO, L. F. T., GOMES, P. C., TOLEDO, R. S. Composição bromatológica, energia metabolizável e equações de predição da Energia do grão e de subprodutos do trigo para pintos de corte. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 30(3), 785–793. 2001.

OLUKOSI, O. A.; COWIESON, A. J.; ADEOLA, O. Age-related influence of a cocktail of xylanase, amylase, and protease or phytase individually or in combination in broilers. *Poultry Science*, v. 86, n. 1, p. 77-86, jan. 2007.

ONYANGO, E. M., BEDFORD, M. R., ADEOLA, O. Phytase activity along the digestive tract of the broiler chick: A comparative study of an *Escherichia coli*-derived and *Peniophora lycii* phytase. *Canadian Journal of Animal Science*, 85, 61–68. 2005.

PALOHEIMO, M. et al. Xylanases and Cellulases as Feed Additives. In: BEDFORD, M.R.; PARTRIDGE, G.G. *Enzymes in Farm Animal Nutrition*. 2.ed. 2011. Cap.2, p.12-53.

PELUZIO, M.C.G.; BATISTA, E.S. Proteínas. In: COSTA, N.M.B.; PELUZIO, M.C.G. *Nutrição Básica e Metabolismo*. Viçosa : Editora UFV, p. 120- 154. 2008

PENZ JÚNIOR, A.M. Enzimas em rações para aves e suínos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA Anais...Botucatu-SP, , p.165-178. 1998

PIRGOZLIEV, V., ODUGUWA, O., ACAMOVIC, T., BEDFORD, M. R. Diets containing *Escherichia coli*-derived phytase on young chickens and turkeys: effects on performance, metabolizable energy, endogenous secretions, and intestinal morphology. *Poultry Science*,86(4), 705–13. 2007.

RUTHERFURD, S. M. et al. Effect of microbial phytase on ileal digestibility of phytase phosphorus, total phosphorus, and amino acids in a low-phosphorus diet for broilers. *Poultry Science*, Champaign, v. 83, n. 1, p. 61-68, Jan. 2004.

RUTZ, F. Proteínas: Digestão e Absorção – In: *FISIOLOGIA Aviária Aplicada à Frangos de Corte*. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, p. 135-140, 2002

SELLE, P., RAVINDRAN, V. Microbial phytase in poultry nutrition. *Animal Feed Science and Technology*, 135, 1–41. 2007.

SHAFEY, T. M., MACDONALD, M. W., DINGLE, J. G. Effect of dietary calcium and available phosphorus concentration on intestinal pH on the availability of calcium, iron, magnesium, and zinc from the intestinal contents of meat chickens. *British Poultry Science*, 32, 185-194. 1991.

SILVA, Y. L. et al. Níveis de proteína bruta e fósforo em rações com fitase para frangos de corte, na fase de 14 a 21 dias de idade: 2., valores energéticos e digestibilidade de nutrientes. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, MG, v. 37, n. 3, p. 469-477, maio/jun. 2008.

SINGH, P. K. Significance of phytic acid and supplemental phytase in chickennutrition: a review. *World's Poultry Science Journal*, 64(04), 553-580. 2008.

SKLAN, D. Development of the digestive tract of poultry. *World's Poultry Science Journal* v.57, p.415-428, 2001.

SMITS, C., ANNISON, G. Non-starch plant polysaccharides in broiler nutrition towards a physiologically valid approach to their determination. *World's Poultry Science Journal* 52(2), 203-221. 1996.

ŠRAMKOVÁ, Z., GREGOVÁ, E., ŠTURDÍK, E. Chemical composition and nutritional quality of wheat grain. *Acta Chimica Slovaca*, 2(1), 115-138. 2009.

SLOMINSKI, B. A. Recent advances in research on enzymes for poultry diets. *Poultry Science*, 90(9), 2013-2023. 2011.

STEPHEN, A. M., CUMMINGS, J. H. Water-holding by dietary fibre in vitro and its relationship to faecal output in man. *Gut*, 20(8), 722-729. 1979.

TAMIM, N. M., ANGEL, R., CHRISTMAN, M. Influence of dietary calcium and phytase on phytate phosphorus hydrolysis in broiler chickens. *Poultry Science*, 83(8), 1358-67. 2004.

TEJEDOR, A. A. et al. Efeito da adição de enzimas e m dietas de frangos de corte à base de milho e farelo de soja sobre a digestibilidade ileal de nutrientes. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, MG, v. 30, n. 3, p. 809-816, maio/jun. 2001.

VIEIRA, S. L. Carboidratos: digestão e absorção. In: MACARI, M.; FURLAN, R. L.; GONZALES, E. *Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte*. 2. ed. Jaboticabal: Funep, 2002. p. 279-298.

WOLOVER, T. M. S.; BOLOGNESI, C. Source and amount of carbohydrate affect pós-prandial glucose and insulin in normal subjects. *Journal of Nutrition*, Philadelphia, v. 126, p. 2798-2806, 1996.

YAO, M. Z., ZHANG, Y. H., LU, W. L., HU, M. Q., WANG, W., LIANG, A. H. Phytases: crystal structures, protein engineering and potential biotechnological applications. *Journal of Applied Microbiology*, 112(1), 1-14. 2011.

ZANELLA, I. et al. Effect of enzyme supplementation of broiler diets based on corn and soybean. Poultry Science, Champaign, v. 78, n. 4, p. 561-568, Apr. 1999.

Capítulo 1

AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE ENZIMAS EXÓGENAS EM DIETAS PARA FRANGOS DE CORTE

AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE ENZIMAS EXÓGENAS EM DIETAS PARA FRANGOS DE CORTE

EVALUATION OF THE ASSOCIATION BETWEEN EXOGENOUS ENZYMES IN BROILER DIETS

Resumo

Foi realizado um experimento no Setor de Avicultura da Universidade Federal de Viçosa com o objetivo de avaliar duas enzimas isoladamente e em conjunto sobre o desempenho de frangos de corte. Foram utilizados 2000 animais dos 14 aos 28 dias de idade distribuídos em delineamento experimental em blocos casualizados. As enzimas utilizadas foram uma fitase e uma protease e a associação das duas. As dietas foram divididas em 3 grupos (Grupo da Fitase, Grupo da Protease e o Grupo da associação das duas enzimas), cada grupo possuía um tratamento controle negativo (CN) que foi formulado fazendo-se a redução dos níveis nutricionais de acordo com a matriz da enzima referente ao grupo, uma dieta onde a enzima era adicionada a este controle negativo em substituição ao amido e uma dieta onde era adicionado ao controle negativo calcário, fosfato, óleo e aminoácidos em substituição à areia e amido para que esta tivesse os mesmos níveis nutricionais preditos pelas matrizes das enzimas (CP). E ainda um tratamento com os níveis preditos por Rostagno et al. (2011). Com isso os tratamentos eram: T1: Controle Negativo Fitase (CNF), T2: Controle Negativo Fitase + Enzima Fitase (CNFF), T3: Controle Negativo Fitase Corrigido (CNPF), T4: Controle Negativo Protease (CNP), T5: Controle Negativo Protease + Enzima Protease (CNPP), T6: Controle Negativo Protease Corrigido (CPP), T7: Controle Negativo Fitase Protease (CNFP), T8: Controle Negativo Fitase Protease + Enzima Fitase + Enzima Protease (CNAA), T9: Controle Positivo Fitase Protease (CPA) e T10: Tabelas Brasileiras. Ao adicionar a fitase houve melhora ($P < 0,05$) no ganho de peso e na conversão alimentar dos frangos, em comparação aos submetidos ao tratamento CNF. Não houve efeito ($P < 0,05$) da protease sobre o ganho de peso, porém ela proporcionou

redução do consumo. Ao associar as duas enzimas houve melhora significativa no desempenho das aves em relação ao CNA igualando ao CPA. A utilização da associação das matrizes nutricionais da protease e da fitase podem ser aplicadas, na formulação de dietas, quando há a associação das duas.

Palavras-chave: protease, fitase, frangos de corte.

Abstract

An experiment was conducted at the Poultry Farm of the Federal University of Viçosa in order to evaluate two enzymes alone and in association on the performance of broilers. 2000 from 14 to 28 days allotted in a randomized block design were used. Enzymes used were a phytase, protease and the association of both. The diets were divided into three groups (Group of Phytase, Protease Group and the Group of association of the two enzymes), each group had a negative control (CN), which was formulated by making the reduction of nutrient levels according to enzyme related to the group, a diet in which the enzyme was added to this negative control replacing starch and a diet which was added to the negative control limestone, phosphate, oil and amino acid substitution in the sand and starch matrix so that it had the same nutritional levels predicted by arrays of enzymes (CP). And a treatment levels predicted by Rostagno et al. (2011). Thus the treatments were: T1: Negative Control Phytase (CNF), T2: Negative Control + Phytase Phytase Enzyme (CNFF), T3: Negative Control Fixed Phytase (CNPF), T4: Negative Control Protease (CNP), T5: Negative Control + protease protease Enzyme (CNPP), T6: Negative Control protease Fixed (CPP), T7: Negative Control Phytase protease (HFFS), T8: Negative Control protease Phytase Phytase Enzyme + + protease Enzyme (CNAA), T9: Positive Control Phytase protease (CPA) and T10: Brazilian tables. By adding phytase was improved ($P < 0.05$) in weight gain and feed conversion of broilers compared to submetidoa treatment CNF. There was no effect ($P < 0.05$) protease on the weight gain, but she provided a reduction in consumption. By combining the two enzymes was no significant improvement in the performance of birds in relation to CNA equaling the CPA.

The use of the association of nutritional matrix protease and phytase can be applied in the formulation of diets, when there is a combination of the two.

Key words: protease, phytase, broilers.

Introdução

O custo de produção é uma das grandes preocupações, não só na avicultura, mas em qualquer atividade agropecuária, já que sempre se trabalha com baixa lucratividade e o preço do produto é determinado pelo mercado. Assim, quanto menor o custo de produção, maior o lucro da atividade. Considerando que cerca de 75% do custo de produção é determinado pela alimentação, é necessário que se desenvolvam pesquisas visando soluções para que haja maior aproveitamento dos alimentos pelos animais.

Outra grande preocupação é a poluição ambiental causada pela atividade, pois muitas vezes os resíduos da produção contêm agentes contaminantes da água, do ar e do solo. Sabe-se, por exemplo, que dietas com grandes quantidades de proteína bruta podem aumentar a excreção de nitrogênio pelos animais, o que confirma a necessidade do estudo constante do manejo e da alimentação em busca de soluções para redução desses contaminantes. Uma solução para esse problema seria o uso de enzimas exógenas, que podem ser usadas individualmente ou em conjunto para melhorar a digestibilidade dos alimentos e permitir a inclusão de menor quantidade de nutrientes, como proteína e fósforo, nas dietas.

Foi realizado um experimento com objetivo de avaliar o efeito das enzimas monocomponentes fitase e protease, separadamente ou em conjunto, sobre o desempenho de frangos de corte.

Materiais e Métodos.

O experimento foi conduzido no Setor de Avicultura do Departamento de Zootecnia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Viçosa. As aves foram alojadas em galpão de alvenaria com pé direito de 3,0 metros de altura com as laterais abertas equipado com cortinas de lona,

sistema de aquecimento por lâmpadas infravermelho, comedouros tubulares e bebedouros automáticos do tipo nipple, dividido em boxes de 1,5 x 2,0 metros. Foram utilizados 2000 pintos de corte macho, da linhagem COBB 500, de 14 a 28 dias de idade, alojados em galpão dividido em boxes.

Do primeiro ao 13º dia de vida os animais foram criados em galpão de alvenaria, o manejo aplicado de acordo com o manual da linhagem recebendo ração e água a vontade, a ração fornecida seguia as recomendações de Rostagno et. al. (2011).

No 14º dia de vida os animais foram pesados e distribuídos em delineamento experimental em blocos casualizados (fileiras do galpão) com 10 tratamentos, 10 repetições e 20 aves por unidade experimental.

As dietas (Tabela 1) foram divididas em 3 grupos (Grupo da Fitase, Grupo da Protease e o Grupo da associação das duas enzimas) , cada grupo possuía um tratamento controle negativo que foi formulado fazendo-se a redução dos níveis nutricionais de acordo com a matriz da enzima referente ao grupo, uma dieta onde a enzima era adicionada a este controle negativo em substituição ao amido e uma dieta onde era adicionado ao controle negativo calcário, fosfato, óleo e aminoácidos em substituição à areia e amido para que esta tivesse os mesmos níveis nutricionais preditos pelas matrizes das enzimas. E ainda um tratamento com os níveis preditos por Rostagno et al. (2011).

Tabela 1 Tratamentos experimentais

1	Controle Negativo Fitase (CNF)
2	T1 + Fitase (CNFF)
3	Controle Positivo Fitase (CPF)
4	Controle Negativo Protease (CNP)
5	T4 + Protease (CNPP)
6	Controle Positivo Protease (CPP)
7	Controle Negativo Associação (CNA)
8	T7 + Associação (CNAA)
9	Controle Positivo Associação (CPA)
10	Tabelas Brasileiras

Tabela 2- Composição centesimal e nutricional das dietas experimentais

	CNF	CNFF	CPF	CNP	CNPP	CPP	CNA	CNAA	CPA	TB
Milho	63,85	63,85	63,85	63,47	63,47	63,47	65,69	65,69	65,69	59,52
F. Soja	29,27	29,27	29,27	28,04	28,04	28,04	27,81	27,81	27,81	33,62
Óleo de Soja	1,68	1,68	2,20	2,65	2,65	2,65	1,40	1,40	1,95	2,86
Fosfato Bicácio	0,80	0,80	1,50	1,52	1,52	1,52	0,81	0,81	1,51	1,52
Areia	1,50	1,50	0,36	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	0,33	0,00
Amido	0,50	0,49	0,40	0,50	0,48	0,18	0,50	0,47	0,08	0,00
Calcário	0,99	0,99	0,91	0,91	0,91	0,91	0,99	0,99	0,91	0,92
Sal	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48
DL-Metionina	0,22	0,22	0,25	0,22	0,22	0,27	0,18	0,18	0,26	0,30
L-Lisina	0,22	0,22	0,24	0,23	0,23	0,28	0,22	0,22	0,28	0,25
L-Treonina	0,03	0,03	0,06	0,03	0,03	0,08	-	-	0,08	0,08
L-Valina	0,01	0,01	0,03	0,02	0,02	0,06	-	-	0,05	0,05
L-Arginina	-	-	-	-	-	0,04	-	-	0,04	-
Glicina	0,08	0,08	0,08	0,05	0,05	0,13	0,04	0,04	0,12	0,04
Isoleucina	-	-	-	-	-	0,03	-	-	0,03	-
Minerais ¹	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11
Vitamina ²	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21
Salinomicina 60%	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,06
BHT	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Protease	-	-	-	-	0,02	-	-	0,02	-	-
Fitase	-	0,01	-	-	-	-	-	0,01	-	-
Soma	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Energia met Kcal/Kg	3005	3050	3050	3050	3050	3050	3005	3050	3050	3049
Prot Brut %	18,62	18,76	18,69	18,05	18,81	18,19	18,05	18,8	18,25	20,38
Calcio%	0,66	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,66	0,8	0,8	0,82
Fosforo Disp%	0,25	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38	0,25	0,38	0,38	0,39
Sodio%	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21
Lisina Dig%	1,05	1,06	1,06	1,02	1,06	1,06	1,01	1,06	1,06	1,17
Metionina Dig%	0,47	0,47	0,51	0,47	0,47	0,51	0,43	0,43	0,51	0,57
Met + Cis Dig%	0,73	0,76	0,76	0,72	0,76	0,76	0,68	0,76	0,76	0,84
Treonina Dig%	0,66	0,69	0,69	0,64	0,69	0,69	0,61	0,69	0,69	0,76
Triptofano Dig%	0,2	0,22	0,2	0,19	0,2	0,19	0,19	0,21	0,19	0,23
Arginina%	1,15	1,15	1,15	1,11	1,15	1,15	1,11	1,15	1,15	1,27
Gli + Ser Dig%	1,62	1,62	1,62	1,54	1,62	1,62	1,54	1,62	1,62	1,73
Valina Dig%	0,8	0,82	0,82	0,78	0,82	0,82	0,77	0,82	0,82	0,9
Isoleucina Dig%	0,72	0,72	0,72	0,69	0,72	0,72	0,69	0,72	0,72	0,79
Leucina Dig%	1,09	1,09	1,09	1,05	1,05	1,05	1,05	1,05	1,05	1,22
Histidina Dig%	0,46	0,46	0,46	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,5
Fenilalanina Dig%	0,87	0,87	0,87	0,85	0,85	0,85	0,85	0,85	0,85	0,95
Fen + Tir Dig%	1,46	1,46	1,46	1,41	1,41	1,41	1,42	1,42	1,42	1,6

¹Manganês 77,0 mg ; Ferro - 55,0 mg; Zinco - 71,5 mg; Cobre - 11,0 mg ; Cobalto - 1,0 mg ; Iodo - 1,1 mg; Selênio - 0,33 mg.

²Vitamina A - 8250 UI; Vitamina D3 - 2090 UI; Vitamina E - 31 UI; Vitamina B1 - 2,2 mg ; Vitamina B6 - 3,08 mg; Ac Pantotênico - 11,0 mg; Biotina - 0,077 mg; Vitamina K3 - 1,65 mg ; Ácido fólico - 0,770 mg ; Ácido nicotínico- 33,0 mg ; Vitamina B12 - 0,013 mg.

Com isso os tratamentos foram: T1: Controle Negativo Fitase, T2: T1 + Fitase, T3: Controle Positivo Fitase, T4: Controle Negativo Protease, T5: T4 + Protease, T6: Controle Positivo Protease, T7: Controle Negativo Associação, T8: T7 + Associação, T9: Controle Positivo Associação e T10: Tabelas Brasileiras.

As enzimas utilizadas foram uma fitase monocomponente derivada de culturas de *E. coli* na concentração de 5000 FTU (Quantum®) e com a inclusão de 100g/t de ração e uma protease monocomponente I, na concentração de 75000 PROT/g derivada a partir de *Bacillus licheniformis* e com a inclusão de 200 g/t de ração (Proact®). Uma unidade de atividade da enzima (PROT) é a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol por minuto de p-nitroanilina a partir do substrato (Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA) em pH 9.0 e temperatura de 37°C. As matrizes adotadas nos presente trabalho estão apresentadas na Tabela 3

Tabela 3: Valor de nutrientes considerados fornecidos as dietas pelas enzimas.

	Fitase	Protease	Associação
Energia met Kcal/Kg	45,00	0,00	45,00
Calcio%	0,14	0,00	0,14
Fosforo Disp%	0,13	0,00	0,13
Lisina Dig%	0,01	0,04	0,05
Met + Cis Dig%	0,03	0,04	0,08
Treonina Dig%	0,03	0,05	0,08
Triptofano Dig%	0,02	0,01	0,02
Arginina%	0,00	0,04	0,04
Gli + Ser Dig%	0,00	0,08	0,08
Valina Dig%	0,02	0,04	0,05
Isoleucina Dig%	0,00	0,03	0,03

A avaliação estatística dos dados foi feita utilizando software de avaliação estatística SAS utilizando análise de variância e comparação por contrastes ortogonais 5% de probabilidade (P<0.05).

Os contrastes avaliados foram: T2 x T1; T2 x T3; T5 x T4; T5 x T6; T8 x T7; T8 x T9; T8 x T5; T8 x T2; T10 x (T2 + T3 + T5 + T6 + T8 + T9)/6.

Aos 28 dias de idade, os animais e as sobras de ração foram pesados e os parâmetros avaliados foram: ganho de peso, consumo de ração, conversão alimentar.

Resultados

Tabela 4: Médias dos tratamentos para as variáveis respostas avaliadas Peso final (g), Ganho de peso (g), Consumo (g) e Conversão alimentar.

Tratamento	Dieta	Peso Final	Ganho	Consumo	Ca
1	Controle Negativo Fitase	1493,2	1026,3	1631,8	1,590
2	T1 + Fitase	1521,0	1053,2	1626,5	1,545
3	Controle Positivo Fitase	1499,1	1032,8	1607,5	1,557
P Valor	1 vs 2	0,032	0,031	0,758	0,001
	2 vs 3	0,090	0,100	0,273	0,157
4	Controle Negativo Protease	1494,7	1027,5	1596,1	1,555
5	T4 + Protease	1516,7	1049,6	1631,0	1,554
6	Controle Positivo Protease	1535,9	1068,7	1633,5	1,529
P Valor	4 vs 5	0,084	0,078	0,044	0,849
	5 vs 6	0,135	0,122	0,884	0,020
7	Controle Negativo Associação	1445,7	977,9	1599,7	1,639
8	T7 + Associação	1502,6	1034,4	1642,8	1,589
9	Controle Positivo Associação	1511,0	1043,9	1606,5	1,540
P Valor	7 vs 8	0,001	0,001	0,013	0,001
	8 vs 9	0,505	0,444	0,038	0,001
	8 vs 2	0,153	0,128	0,341	0,001
	8 vs 5	0,270	0,222	0,489	0,001
10	Tabelas Brasileiras	1545,1	1077,2	1600,5	1,486
P Valor	TB vs Ezimas; CPs	0,002	0,002	0,070	0,001
DMS a 5%		25,9	25,3	34,9	0,022
Desvio Padrão da Média		0,049	0,044	0,043	0,056

O Contraste utilizado para avaliar o tratamento Tabelas brasileiras em relação aos tratamentos que receberam enzimas e controles positivos foi significativo para todas as variáveis avaliadas.

A adição de fitase promoveu maior ($P < 0,05$) ganho de peso e peso final aos animais que receberam o tratamento controle negativo e semelhante ($P > 0,05$) aos que receberam o tratamento de controle positivo. O consumo de ração não foi estatisticamente diferente ($P > 0,05$) em nenhum dos contrastes dentro do grupo da fitase. A conversão alimentar foi melhor ($P < 0,05$) para os animais que receberam dietas com adição de fitase em relação aos animais que receberam dieta controle negativo e semelhante ($P > 0,05$) aos animais que receberam o tratamento controle positivo.

Os tratamentos que receberam a protease apresentaram ganho de peso semelhante ($P > 0,05$) aos animais que receberam controle negativo e foi menor ($P < 0,05$) que o dos animais que receberam o controle positivo. A adição de protease promoveu maior ($P < 0,05$) consumo em relação ao controle negativo e semelhante ($P > 0,05$) ao controle positivo. Porém, a conversão alimentar dos animais que receberam protease foi estatisticamente igual ($P > 0,05$) aos animais do controle negativo e pior ($P < 0,05$) em relação aos animais do controle positivo.

Quando se utilizaram as duas enzimas em conjunto, as obtiveram ganho de peso maior ($P < 0,05$) em relação as do controle negativo e igual estatisticamente ($P > 0,05$) ao controle positivo. O consumo de ração foi maior ($P < 0,05$) para as ves que receberam a associação das enzimas em relação as aves do tratamento controle negativo deste grupo e semelhante ($P > 0,05$) ao seu controle positivo.

Ao comparar as enzimas entre si, foi possível verificar que as aves que receberam as enzimas em associação apresentaram mesmo ($P > 0,05$) ganho de peso e consumo de ração aos animais que receberam quaisquer das enzimas individualmente. Porém, a associação de enzimas promoveu uma piora na conversão alimentar em relação aos animais que receberam apenas fitase ou apenas protease.

Discussão

A adição de fitase não alterou o consumo, porém aumentou o ganho de peso e melhorou a conversão alimentar dos frangos, quando comparado aos do

tratamento controle negativo, entretanto, não foi encontrada nenhuma diferença quando se comparou com o tratamento controle positivo, validando assim a matriz nutricional utilizada para esta Fitase. Vários outros autores (Cowieson et al., 2005; Olukosi et al., 2007; Rutherford et al., 2012) também encontraram melhora no desempenho dos animais ao adicionar fitase à dieta com baixo nível de fósforo, devido a liberação de fósforo, de energia, de aminoácidos e de minerais por parte da fitase (Gomes 2010) .

Os animais que receberam as dietas dos tratamentos que continham protease, não apresentaram diferenças em relação ao ganho de peso e a conversão alimentar comparados aos que não receberam o tratamento com a enzima (controle negativo) e tiveram pior desempenho quando comparados aos animais do controle positivo em relação a estes mesmos parâmetros, porém, a adição de protease aumentou o consumo em relação ao seu controle positivo, mas não diferiu da dieta que recebeu os aminoácidos. Angel et al. (2011) relataram efeito benéfico da protease em relação ao ganho de peso e a conversão alimentar, porém, os autores afirmaram que os resultados são inconsistentes, devido a diferenças nos tipos de enzima utilizados (muitos autores usam complexos enzimáticos) e as diferentes dietas controle. Segundo Oxenboll et al. (2011) o uso de protease em dietas para frango de corte reduz a emissão de nitrogênio no ambiente.

Freitas et al. (2011) não encontram efeito da protease sobre o ganho de peso e o consumo de ração, relatando melhora na conversão alimentar. No caso da protease, a matriz nutricional pode não ter sido aplicada de forma correta neste trabalho, com isso a enzima não disponibilizou o aporte de aminoácidos que era esperado.

A utilização das matrizes enzimáticas em conjunto se apresentou numericamente o menor ganho de peso quando comparado as dietas que receberam cada enzima individualmente apresentando piora na conversão alimentar. Segundo Bedford et al. (2010) uma enzima pode limitar o efeito da outra, quando as duas atuam sobre o mesmo substrato. Apesar de atuarem sobre substratos diferentes, foi possível observar que a protease não foi eficiente em manter o desempenho sobre as condições experimentais

utilizadas, levando a crer que a fitase fez com que os animais que receberam a associação das enzimas mantivessem resultados de ganho e consumo semelhante aos que receberam as enzimas isoladamente.

O efeito das enzimas exógenas sobre o desempenho dos animais não necessariamente á refletem nos resultados obtidos em análises in vitro, uma vez que o a bioeficácia destes produtos é dependente de vários fatores (Romero et al. 2013). Dentre os fatores pode-se citar interações entre o alimento e o trato intestinal e outros fatores fisiológicos do animal.

Referências.

ANGEL C. R., SAYLOR W., VIEIRA S. L. Effects of a monocomponent protease on performance and protein utilization in 7- to 22-day-old broiler chickens. Poultry Science 90:2281–2286 2011

BEDFORD M. R.; COWIESON A. J., Aditividade da resposta a diferentes enzimas para suínos e aves. AB Vista Enzyme Summit Brasil 2010

BEDFORD, M.R. Efeito del uso de enzimas digestivas en la alimentación de aves. Avicultura Profesional, v.14, n.4, p.24-29, 1996.

BÜHLER, M.; LIMPER, J.; MÜLLER, A. et al. Las enzimas en la nutrición animal. 1.ed. Bonn: AWT, 47p. 1998.

CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A. Enzimas. In: __. Bioquímica ilustrada. 2.ed. São Paulo: Artes Médicas, p.53-66. 1989.

COWIESON, A. J. AND ADEOLA, O. Carbohydrases, protease, and phytase have an additive beneficial effect in nutritionally marginal diets for broiler chicks. Poultry Science 84:1860–1867, 2005

COWIESON, A.J. SINGH, D.N. ADEOLA, O. Prediction of ingredient quality and the effect of a combination of xylanase, amylase, protease and phytase in the diets of broiler chicks. Growth performance and digestible nutrient intake, British Poultry Science, 47:4, 477-489 2006

DARI, R.L. Utilização de fitase na alimentação de aves. Anais da Conferência APINCO Ciência e Tecnologia Avícolas, Santos, SP, p.127. 2004.

FIREMAN, F.A.T.; FIREMAN, A.K.B.A.T. Enzimas na alimentação de suínos. *Ciência Rural*, v.28, n.1, p.173-178, 1998.

FREITAS D. M., VIEIRA S. L., ANGEL C. R., et al. Performance and nutrient utilization of broilers fed diets supplemented with a novel mono-component protease. *J. Appl. Poult. Res.* 20:322–334 2011

GHAZI, S.; ROOKE, J.A.; GALBRAITH, H. et al. The potential for the improvement in the nutritive value of soybean meal by different proteases in broiler chicks and broiler cockerels. *Brasilian Poultry. Science*, v.43, p.70-77, 2002.

GHAZI, S.; ROOKE, J.A.; GALBRAITH, H. et al. Effect of adding protease and alphagalactosidase enzyme to soybean meal on nitrogen retention and true metabolisable energy in broilers. *British Poultry Science*, v.38, p.528-531, 1997.

HARLAND, F. B. AND E. R. MORRIS,. Phytin: A good or a bad food component. *Nutr. Res.* 15:733- 754. 1995.

KALMENDAL, R. AND TAUSON, R. Effects of a xylanase and protease, individually or in combination, and an ionophore coccidiostat on performance, nutrient utilization, and intestinal morphology in broiler chickens fed a wheat-soybean meal-based diet. *2012 Poultry Science* 91:1387–1393

JARONI, D.; SCHEIDELER, E.S.; BECK, M. et al. The effect of diet wheat middlings and enzyme supplementation II : apparent nutrient digestibility, digestive tract size, gut viscosity, and gut morphology in two strains of leghorn hens. *Poultry Science*, v.78, p.1664-1674, 1999.

E, T.T.; CHIOU, P.W.S.; HSU, J.C. et al. Evaluation of protease digestion on various feed proteins by chemical assay. *Journal of Chinese Society of Animal Science*, v.29, p.21-28, 2000.

NAYINI, N. R. AND P. MARKAKIS, Phytases. In: Graf, E. (Ed.), *Phytic Acid: Chemistry and Applications*, Pilatus Press, Minneapolis, Minnesota, pp. 101-118. 1986.

OLUKOSI, O.A.; COWIESON, A.J.; ADEOLA, O. Age-related influence of a cocktail of xylanases, amylase, and protease or phytase individually or in combination in broilers. *Poultry Science*, v.86, p.77-86, 2007.

OXENBOLL, K. M., PONTOPPIDAN, K., & FRU-NJI, F. 2011. Use of a protease in poultry feed offers promising environmental benefits. *International Journal of Poultry Science*, 10(11), 842-848.

PETTERSSON, D.; AMAN, P. Enzyme supplementation of a poultry diet containing rye and wheat. *British Journal Nutrition* , v.62, p.139-149, 1989.

PENZ JR., A.M. Enzimas em rações para aves e suínos. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 35., 1998, Botucatu. Simpósio Sobre Aditivos Na Produção De Ruminantes E Não ruminantes. Anais. Botucatu: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 398p. p.165-178. 1998.

RODRIGUES, P.B.; ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T. et al. Desempenho de frangos de corte, digestibilidade de nutrientes e valores energéticos de rações formuladas com vários milhos, suplementadas com enzimas. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.32, n.1, p.171-182, 2003.

REDDY, N. R., S. K. SATHE AND D.K. SAUNKHE, Phytates in legumes and cereals. *Adv. Food Res.* 28: 1-92. 1982.

RUTHERFURD, S. M. CHUNG, T. K. THOMAS, D. V. et al., Effect of a novel phytase on growth performance, apparent metabolizable energy, and the availability of minerals and amino acids in a low-phosphorus corn-soybean meal diet for broilers. *2012 Poultry Science* 91 :1118–1127

SAEG - Sistema de análises estatísticas e genéticas. Universidade Federal de Viçosa - UFV. Versão 8.0. Viçosa, MG: 2000. 59p. (Manual do usuário).

SELLE, P.H.; RAVIDRAN, V. Microbial phytase in poultry nutrition: Review. *Animal Feed Science Technology* . , 2007.

SHEPPY, C. The current feed enzyme market and likely trends. *Enzyme In: Farm Animal Nutrition*, CABI, New York, p.1-10, 2001.

TORRES, D.M.; TEIXEIRA, A.S.; RODRIGUES, P.B. et al. Eficiência das enzimas amilase, protease e xilanase sobre o desempenho de frangos de corte. *Ciência Agrotécnica*, v.27, n.6, p.1401-1408, 2003.

VIEIRA S. L., ANGEL C. R. Utilização de fitases na nutrição animal: da teoria à prática. AB Vista Enzyme Summit Brasil 2010

WODZINSKI, R. J. AND A.H.J. ULLAH,. PHYTASE. In: *Advances in Applied Microbiology*, vol. 42, Academic Press, Inc., pp. 263-302. 1996.

YU, B.; WU, S.T.; LIU, C.C. et al. Effects of enzyme inclusion in a maize-soybean diet on broiler performance. *Animal Feed Science and Technology*, v.134, p.14-16, 2005.

Artigo 2

Uso de enzimas exógenas sobre a digestibilidade ileal verdadeira de aminoácidos e as perdas endógenas em um farelo de soja e uma dieta basal.

Uso de enzimas exógenas sobre a digestibilidade ileal verdadeira de aminoácidos e as perdas endógenas em um farelo de soja e uma dieta basal.

Use of a exogenous enzyme on true ileal digestibility of amino acids and endogenous flow in soybean meal and a basal diet.

Resumo

Foi realizado um estudo com o intuito de avaliar a digestibilidade ileal verdadeira de aminoácidos em um farelo de soja e em uma dieta basal e também a perda endógena de aminoácidos, utilizando uma protease monocomponente e uma carboidrase isoladamente, ou em conjunto. Foram realizados três ensaios de digestibilidade simultaneamente, utilizando 504 animais. Em cada ensaio utilizou-se 168 animais em um total de 4 tratamentos: tratamento controle (sem a adição de nenhuma enzima), utilização de protease, utilização de carboidrase e a associação das duas enzimas, com 6 repetições e 7 aves por unidade experimental, distribuídos em delineamento inteiramente ao acaso em baterias metálicas. Uma dieta isenta em proteína (DIP) foi usada para determinar a excreção endógena, (ensaio 1), DIP + Farelo de soja (DIP+ FS) foi usada para determinar a digestibilidade de aminoácidos da soja (ensaio 2) e uma dieta basal(DB), formulada à base de milho e farelo de soja (ensaio 3). Todas as dietas com e sem a adição das enzimas. Em todas as dietas foram adicionadas CeliteTM como indicador de indigestibilidade em quantidade de 10 g/kg. Foi possível observar que as enzimas influenciaram a perda endógena de aminoácido pelas aves, além de aumentar a digestibilidade ileal dos aminoácidos do farelo de soja e da dieta basal. Houve também, efeito mais pronunciado da protease em relação à carboidrase, além disso, a associação das enzimas proporcionou efeito semelhante à protease usada isoladamente. Não foi observado efeito aditivo das enzimas.

Palavras-chave: protease, carbohidrase, aminoácidos, digestibilidade

Abstract

A study was realized in order to evaluate the true ileal digestibility of amino acids in a soy meal and a basal diet and also the loss of endogenous amino acid using a protease and a carbohydrase alone or in combination. Three digestibility trials were conducted simultaneously, using 504 animals. In each experiment were used 168 animals with 4 treatments: control treatment (without the addition of any enzyme), use of protease use of carbohydrase enzymes and their combination, with 6 replicates of 7 birds each, distributed in a completely randomized design in metal batteries. A protein free diet (DIP) was used to determine endogenous excretion (trial 1), DIP + Soybean meal (DIP + FS) was used to determine the amino acid digestibility of soybean (trial 2) and a basal diet (BD), formulated based on corn and soybean meal (trial 3). All diets with and without the addition of enzymes. In all diets Celite were added as an indicator of indigestible at 10 g / kg. It was observed that the enzymes influenced the loss of endogenous amino acids by poultry, besides increasing the ileal amino acid digestibility of soybean meal and basal diet. The addiction of protease had a highest effect than carbohydrase addiction, and also the protease addicted alone, had the same effect when use in combination with phytase. No additive effect of the enzymes was observed.

Key words: protease, carbohydrase, amino acids, digestibility.

Introdução

Os avanços alcançados pela avicultura trazem consigo grandes desafios no sentido de reduzir o custo de produção. A alimentação representa a maior parte destes custos, com isso grande esforço tem sido feito para encontrar alternativas que ajudem as aves a terem melhor aproveitamento das dietas oferecidas.

Um dos grandes problemas para a boa digestão dos alimentos pelos animais é a presença de fatores antinutricionais. A maior parte das dietas no Brasil é produzida a base de milho e de farelo de soja (Fortes et al., 2012). Segundo Choct (2006), o milho contém aproximadamente 8% de polissacarídeos não amiláceos (PNA) insolúveis, já Irish & Balnave (1993) apontaram ter 16% de PNA no farelo de soja.

A maior capacidade de digestão dos alimentos da dieta e o melhor aproveitamento dos nutrientes faz com que seja possível a formulação de dietas mais baratas, reduzindo o custo de produção. Uma boa alternativa para que isso seja possível, é o uso de enzimas exógenas.

Segundo Soto Salanova et al. (1996), as enzimas exógenas atuam principalmente, provocando a ruptura das paredes celulares das fibras; reduzindo a viscosidade provocada pela fibra solúvel na digesta do intestino proximal; degradando as proteínas, por exemplo, do farelo de soja, reduzindo os efeitos dos fatores antinutricionais tais como os inibidores de proteases, e tornando os nutrientes mais disponíveis para o animal; suplementando a produção de enzimas endógenas do animal.

A atividade de enzimas sobre a digestibilidade vem sendo estudada há bastante tempo, com resultados já consagrados, mas, de acordo com Cowieson & Adeola (2005), o estudo da atividade das enzimas em conjunto vem recebendo pouca atenção. Estes mesmo autores afirmam que apesar da lógica dizer que a resposta ao uso de 2 ou mais enzimas seria um aumento proporcional na digestibilidade, na realidade essa afirmação pode não ser verdadeira.

Além disso, pode haver uma dinâmica na ação das enzimas, por estas atuarem de forma divergente em diferentes tipos de alimentos e ainda podem influenciar a perda endógena de aminoácidos.

Com isso, foi realizado um estudo com o objetivo de avaliar a digestibilidade ileal verdadeira de aminoácidos em um farelo de soja, uma dieta basal, e ainda avaliar a perda endógena, utilizando uma protease e uma carboidrase isoladamente, ou em conjunto.

Material e métodos.

Foram realizados simultaneamente três ensaios de digestibilidade no Setor de Avicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, seguindo a normas adotadas pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Viçosa. Cada ensaio utilizou 168 pintos de corte da linhagem comercial Cobb 500®, que foram utilizados durante o período experimental de 14 a 24 dias de idade. Os animais foram distribuídos em gaiolas metabólicas em 4 tratamentos com 6 repetições e 7 aves por unidade experimental (em cada ensaio). Sendo assim, foram usados ao todo 504 animais. Os ensaios foram realizados em duas etapas, considerando dois blocos separados pelo tempo, sendo que cada bloco teve um total de três repetições de cada tratamento, possuindo as mesmas condições, diferenciando apenas no tempo.

Cada ensaio foi realizado usando um tipo de dieta diferente, mas todos possuíam os mesmos tratamentos: controle sem adição de enzima (s/enz), controle mais protease (Prot), controle mais carboidrase (Carbo) controle mais associação das enzimas (Ass).

As dietas utilizadas estão apresentadas na tabela1: uma dieta isenta em proteína (DIP) foi usada para determinar a excreção endógena, (ensaio 1), DIP + Farelo de soja (DIP+ FS) foi usada para determinar a digestibilidade de aminoácidos da soja (ensaio 2) e uma dieta basal(DB), formulada à base de milho e farelo de soja (ensaio 3). Todas as dietas com e sem a adição das enzimas. Em todas as dietas foram adicionadas Celite™ como indicador de indigestibilidade em quantidade de 10 g/kg.

As enzimas utilizadas foram: Ronozyme ProAct® que é uma protease produzida a partir de *Bacillus licheniformis* com uma inclusão de 200ppm. A atividade enzimática para esta protease é definida pela quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol of *p*-nitroaniline a partir de 1 μM do substrato ((Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-*N*-succinyl Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilide) por minuto a um pH de 9.0 e 37° C. O produto utilizado consiste de 75000 unidades de / g

de enzima. Ronozyme® VP, com uma inclusão de 300ppm contendo 1,3(4)- β -glucanase, pentosanase, hemicellulase and pectic-substance hydrolyzing activities.

Tabela 1 Dietas experimentais.

Ingredientes / Dietas	DIP	DIP + FS	DB
Amido	81,02	51,02	-
Açúcar	5,00	5,00	-
Milho	-	-	55,429
Farelo de Soja	-	30,00	36,602
Óleo de Soja	5,00	5,00	3,186
Fosfato Bicálcio	2,10	2,10	1,520
Calcário	1,00	1,00	0,908
Sal	0,45	0,45	0,483
Sabugo de Milho	4,00	4,00	-
L-Lysina HCl 99%	-	-	0,162
DL-Methionina 99%	-	-	0,275
L-Threonina 98%	-	-	0,040
Premix Mineral ¹	0,11	0,110	0,110
Premix Vitaminico ²	0,12	0,120	0,185
Cloreto de Colina (60%)	0,20	0,20	0,100
Cinza Insolúvel em ácido	1,00	1,00	1,000
Total	100	100	100
Proteína Bruta %	0,00	1,35	21,00

¹Manganês 77,0 mg ; Ferro - 55,0 mg; Zinco – 71,5 mg; Cobre - 11,0 mg ; Cobalto - 1,0 mg ; Iodo - 1,1 mg; Selênio - 0,33 mg.

²Vitamina A - 8250 UI; Vitamina D3 - 2090 UI; Vitamina E - 31 UI; Vitamina B1 - 2,2 mg ; Vitamina B6 – 3,08 mg; Ac Pantotênico - 11,0 mg; Biotina - 0,077 mg; Vitamina K3 - 1,65 mg ; Ácido fólico - 0,770 mg ; Ácido nicotínico- 33,0 mg ; Vitamina B12 – 0,013 mg.

Até o 13^o dia de idade, os animais receberam uma ração à base de milho e de farelo de soja para atender suas exigências nutricionais seguindo as recomendações de Rostagno (2011). Aos 14 dias de vida os animais foram transferidos para baterias metálicas equipadas com bandejas coletoras de excreta cobertas por uma lona plástica para evitar a contaminação do material, e então começaram a receber as dietas experimentais até o 23^o dia de vida.

No 24^o dia todos os animais foram abatidos por eletronarcese. Depois de abatidos, foi realizada uma incisão abdominal para expor o íleo e coletar o conteúdo de 40 cm a partir da junção íleo cecal, o conteúdo foi coletado

realizando uma leve pressão com os dedos no intestino dos animais. A digesta coletada foi armazenada em potes plásticos devidamente identificados, liofilizados, moídos em moinho de aço inox e enviados para análise de matéria seca e proteína bruta de acordo com Silva et al. (2002) e cinza insolúvel em ácido (CIA) seguindo as recomendações de Josleyn (1970). O conteúdo de aminoácido das digestas das dietas e farelo de soja foi analisado no Laboratório CBO por High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

Os valores de excreção endógena foram estimados através dos animais que receberam as DIPs. O cálculo da digestibilidade verdadeira de aminoácidos foi realizado de acordo com as equações propostas por Sakomura & Rostagno (2007) e estão indicadas a seguir:

Fator de indigestibilidade ilial (IF):

IF1 = [AIA] na dieta / [AIA] digesta.

IF2 = [AIA] na DIP / [AIA] digesta

Coeficiente de digestibilidade ileal (IDC):

$$\text{TIDAA \%} = \frac{(\% \text{ AA dieta} - (\% \text{ AA dig.} \times \text{IF1}) - (\text{AA end. PFD} \times \text{IF2}))}{\% \text{ AA dieta}} \times 100$$

onde:

IF = fator de indigestibilidade

[IAA] = concentração de cinza insolúvel em ácido .

DIP = Dieta isenta de proteína.

TIDAA = Coeficiente de digestibilidade verdadeira dos aminoácidos.

% AA diet = Porcentagem de aminoácido na dieta dieta.

% AA dig = Porcentagem de aminoácido na digesta.

AA end = Aminoácido endógeno.

Tabela 5: Composição Analisada de aminoácidos do Farelo de soja e da ração basal com base na matéria natural (mg/g).

Aminoácidos	Farelo de Soja	Dieta Basal
Proteína Bruta	466,98	220,57
Soma AA	441,91	217,53
Lisina	25,72	13,20
Metionina	5,23	5,40
Cistina	5,77	2,92
Met + Cis	11,00	8,32
Treonina	18,50	8,65
Triptofano	4,63	1,70
Arginina	34,08	15,77
Valina	21,53	10,43
Isoleucina	16,75	8,07
Leucina	31,52	17,40
Fenilalanina	21,49	10,67
Tirosina	15,67	8,23
Histidina	11,53	5,70
Glicina	21,95	9,70
Serina	25,18	11,93
Prolina	25,48	13,40
Acido Glutâmico	87,81	42,17
Acido Aspartico	50,00	23,63
Alanina	19,09	10,33

Os dados de cada ensaio foram submetidos à ANOVA e as médias avaliadas pelo teste Student Newman Keuls (SNK) com 5% de probabilidade usando o pacote estatístico do SAS Institute. (2009).

Resultados

Os valores de excreção endógena dos aminoácidos estão apresentados na tabela 3. Houve alta variação, o que pode ser percebido pelos valores dos erros padrão da média. Houve influência das enzimas sobre a perda endógena de aminoácidos, sendo que a associação das enzimas aumentou ($P < 0,05$) a excreção de Alanina, Prolina, Serina, Glicina, Histina, Phenilalanina, Leucina, Cistina e Lisina, em relação ao tratamento controle. Analisando individualmente, observa-se que a protease proporcionou perda endógena igual ($P > 0,05$) ao tratamento controle, sendo que a carboidrase foi diferente ($P < 0,05$) para Cistina. Já a carboidrase proporcionou excreção de

Cistina maior que o controle e excreção de Serina igual ao tratamento com associação das enzimas.

Tabela 3: Média dos valores das perdas endógenas (g/kg de consumo de matéria seca),

Aminoácidos	Enzima				ANOVA	
	DIP	Prot	Carbo	Ass	P	SEM
Proteína Bruta	1,099	1,216	1,025	1,758	0,084	0,51
Soma AA	1,424	1,621	1,612	1,984	0,393	0,56
Lisina	0,035 ^B	0,045 ^{AB}	0,030 ^B	0,067 ^A	0,026	0,02
Metionina	0,014	0,015	0,015	0,020	0,294	0,01
Cistina	0,039 ^A	0,042 ^A	0,021 ^B	0,036 ^A	0,027	0,01
Met + Cis	0,053	0,057	0,036	0,055	0,139	0,02
Treonina	0,097	0,108	0,104	0,122	0,633	0,03
Triptofano	0,026	0,028	0,033	0,035	0,305	0,01
Arginina	0,053	0,063	0,051	0,079	0,231	0,03
Valina	0,068	0,082	0,070	0,098	0,296	0,03
Isoleucina	0,040	0,049	0,041	0,063	0,158	0,02
Leucina	0,057 ^B	0,078 ^B	0,068 ^B	0,133 ^A	0,009	0,04
Fenilalanina	0,038 ^B	0,049 ^B	0,043 ^B	0,074 ^A	0,028	0,02
Tirosina	0,049	0,047	0,046	0,057	0,687	0,02
Histidina	0,014 ^B	0,018 ^{AB}	0,016 ^B	0,028 ^A	0,039	0,01
Glicina	0,057 ^B	0,080 ^B	0,066 ^B	0,148 ^A	0,002	0,04
Serina	0,087 ^B	0,110 ^B	0,096 ^{AB}	0,163 ^A	0,047	0,05
Prolina	0,066 ^B	0,096 ^B	0,076 ^B	0,166 ^A	0,004	0,04
Ac. Glutâmico	0,109	0,132	0,108	0,202	0,077	0,07
Ac. Aspartico	0,073	0,085	0,065	0,127	0,151	0,05
Alanina	0,049 ^B	0,046 ^B	0,053 ^B	0,092 ^A	0,014	0,02

*Letras diferentes significam diferença estatística ($P < 0,05$).

Tabela 4: Média dos valores de Digestibilidade ileal verdadeira dos aminoácidos do farelo de soja (%).

Enzima	Tratamentos				Anova	
	S/ Enz	Prot	Carbo	Ass	P	SEM
Proteína Bruta	86,25 ^B	91,32 ^A	86,39 ^B	92,04 ^A	< 0,001	1,99
Soma AA	80,57 ^C	86,62 ^B	82,04 ^C	92,10 ^A	< 0,001	2,27
Lisina	85,24 ^B	89,98 ^A	89,89 ^A	90,31 ^A	< 0,001	1,79
Metionina	88,77 ^B	93,08 ^A	95,63 ^A	94,69 ^A	< 0,001	2,56
Cistina	77,12 ^C	85,88 ^{AB}	83,73 ^B	89,87 ^A	< 0,001	4,03
Met + Cis	83,63 ^{AB}	88,03 ^A	81,81 ^B	88,77 ^A	0,019	4,68
Treonina	79,03 ^B	87,92 ^A	81,43 ^B	90,13 ^A	< 0,001	3,11
Triptofano	75,04 ^B	86,50 ^A	75,12 ^B	89,25 ^A	< 0,001	5,7
Arginina	91,61 ^B	95,49 ^A	92,08 ^B	96,53 ^A	< 0,001	1,49
Valina	79,20 ^C	90,13 ^B	80,92 ^C	92,65 ^A	< 0,001	2,04
Isoleucina	80,83 ^B	90,30 ^A	82,24 ^B	91,82 ^A	< 0,001	1,77
Leucina	82,23 ^B	89,46 ^A	82,79 ^B	90,53 ^A	< 0,001	2,18
Fenilalanina	84,27 ^B	91,22 ^A	85,22 ^B	92,55 ^A	< 0,001	1,78
Tirosina	82,55 ^D	89,77 ^B	85,31 ^C	93,67 ^A	< 0,001	2,02
Histidina	84,76 ^B	89,45 ^A	85,92 ^B	91,03 ^A	< 0,001	2,04
Glicina	78,50 ^B	84,92 ^A	80,58 ^{AB}	85,09 ^A	0,005	3,28
Serina	82,84 ^B	90,75 ^A	84,04 ^B	91,65 ^A	< 0,001	2,61
Prolina	85,09 ^B	91,08 ^A	85,25 ^B	93,25 ^A	< 0,001	2,2
Ac. Glutâmico	83,14 ^C	87,50 ^B	84,16 ^C	90,80 ^A	< 0,001	2,46
Ac. Aspartico	89,02 ^B	93,18 ^A	88,85 ^B	93,51 ^A	< 0,001	1,82
Alanina	81,11 ^B	88,36 ^A	81,58 ^B	87,28 ^A	0,001	3,26

*Letras diferentes significam diferença estatística (P<0,05).

Tabela 5: Média dos valores de Digestibilidade ileal verdadeira dos aminoácidos dieta basal.

Enzima	S/ Enz	Tratamentos			Anova	
		Prot	Carbo	Ass	P	SEM
Proteína Bruta	79,93 ^B	83,46 ^A	82,35 ^A	83,79 ^A	0,005	2,15
Soma AA	76,41 ^B	80,96 ^A	79,69 ^A	81,54 ^A	0,002	1,77
Lisina	82,04 ^B	85,48 ^A	87,72 ^A	86,56 ^A	<0,001	1,58
Metionina	93,37	94,09	94,59	93,98	0,377	1,17
Cistina	73,79	80,90	75,70	81,35	0,154	6,6
Met + Cis	86,92	89,02	88,31	87,74	0,305	2,17
Treonina	73,81 ^B	79,26 ^A	77,06 ^{AB}	78,17 ^{AB}	0,037	3,1
Triptofano	67,61	73,34	75,13	72,24	0,100	5,08
Arginina	85,85 ^B	88,08 ^A	87,98 ^A	89,09 ^A	0,004	1,35
Valina	74,36 ^C	82,99 ^A	78,63 ^B	79,51 ^B	<0,001	2,03
Isoleucina	76,71 ^C	83,56 ^A	80,03 ^B	82,59 ^A	<0,001	1,61
Leucina	79,07 ^C	83,78 ^A	81,33 ^B	85,24 ^A	<0,001	1,51
Fenilalanina	79,03 ^C	84,63 ^A	81,97 ^B	83,37 ^{AB}	<0,001	1,41
Tirosina	78,15 ^B	82,29 ^A	79,74 ^{AB}	81,24 ^A	0,009	2,44
Histidina	79,45 ^B	83,12 ^A	82,58 ^A	83,70 ^A	0,001	1,61
Glicina	72,94 ^B	75,21 ^{AB}	76,16 ^{AB}	77,57 ^A	0,058	2,77
Serina	77,96 ^B	81,89 ^A	81,51 ^A	83,27 ^A	0,001	1,93
Prolina	77,19 ^C	80,51 ^B	80,20 ^B	85,59 ^A	<0,001	1,96
Ac. Glutâmico	78,46 ^C	82,08 ^{AB}	80,00 ^{BC}	83,84 ^A	<0,001	1,76
Ac. Aspartico	82,88 ^A	85,89 ^B	85,01 ^B	85,59 ^B	0,017	1,59
Alanina	75,02 ^B	78,78 ^A	78,25 ^A	79,79 ^A	0,019	2,46

*Letras diferentes significam diferença estatística ($P < 0,05$).

O coeficiente de digestibilidade ileal verdadeira dos AAs do farelo de soja submetido a enzima A diferiu ($P < 0,05$) dos coeficientes do tratamento controle em todos os AA com exceção da Met+Cys. Esta enzima ainda se igualou ($P > 0,05$) à associação entre enzimas para todos os aminoácidos, exceto para a Soma AA, Valina, Tirosina e Alanina. O tratamento que recebeu a carboidrase diferiu ($P < 0,05$) do tratamento controle nos seguintes aminoácidos: Tirosina, Cistina, Metionina e Lisina, sendo igual ($P > 0,05$) à enzima A nos coeficientes de digestibilidade de Lisina, Metionina, Cistina e Glicina. A associação das duas enzimas fez com que os coeficientes de aminoácidos estivessem sempre valores estatisticamente mais altos ($P < 0,05$)

que o tratamento que não recebeu nenhuma enzima, porém, os valores estiveram sempre próximos aos valores encontrados quando se adicionou a carboidrase.

Houve efeito ($P < 0,05$) das enzimas sobre o coeficiente de digestibilidade verdadeira dos aminoácidos da dieta basal para a maioria dos aminoácidos, não havendo diferença apenas para Triptofano, Cistina, Metionina e Metionina + Cistina. Dentre os outros aminoácidos, O tratamento que recebeu a protease apresentou coeficientes de digestibilidade maiores ($P < 0,05$) que o tratamento controle em todos eles, sendo estatisticamente igual apenas para a Glicina. A carboidrase proporcionou aumento dos coeficientes de digestibilidade também para a maioria dos aminoácidos em relação ao tratamento controle, não havendo diferença para Treonina, Tirosina, Glicina, Alanina. Esta enzima apresentou coeficientes inferiores ($P < 0,05$) aos da enzima A para Valina, Isoleucina, Leucina e Fenilalanina. Dentre os AA que apresentaram diferença ($P < 0,05$), a associação de enzimas só não foi superior ao tratamento controle para Treonina, mas no geral, apresentou resultados semelhantes à protease.

Discussão

Embora o valor de proteína bruta do farelo de soja (466,98 g/kg) tenha sido mais alto que o esperado (455,0 g/kg), o nível dos aminoácidos parece estar próximo daqueles apresentados por Rostagno et al. (2011), porém, estes mesmos autores apresentam valores de coeficiente de digestibilidade verdadeira consideravelmente maiores.

Os coeficientes de digestibilidade encontrados neste trabalho foram menores que aqueles descrito por Rostagno et al. (2011). Por exemplo, o coeficiente de digestibilidade da lisina encontrado neste trabalho foi de 85,2%, enquanto que os autores supracitados apresentam coeficiente de 92,2%.

Os valores da excreção endógena encontrados neste trabalho são menores que os encontrados por Siriwan et al. (1993) que avaliou a excreção endógena para animais de 5 semanas, os animais do presente trabalho foram abatidos com 24 dias, segundo Silva et al.(2006) a idade é um dos fatores que pode influenciar na excreção endógena de aves.

É escasso na literatura trabalhos relacionando o uso de enzimas exógenas e a excreção endógena de aminoácidos pelos animais, neste trabalho houve efeito, porém, este não foi conclusivo, não demonstrando relação clara entre tratamento e a resposta.

O método da Dieta isenta de proteína tende a ser o mais consistente para a determinação das perdas endógenas (Adedokun et al. 2011). Segundos estes autores vários fatores podem influenciar as perdas endógenas das aves, dentre eles esta o método de coleta, uma vez que a coleta por pressão do intestino (como foi realizado no presente trabalho) pode lesar a mucosa, aumentando a perda endógena. Os autores ainda sugerem práticas para minimizar a variação das perdas endógenas, dentre elas: o uso de grande número de animais para as dietas que receberam a DIP, para que haja maior volume de material; a coleta do conteúdo ileal através do fluhing; constantes estudos da perda endógena e a padronização das dietas para determinação das perdas endógenas. Esta última também é sugerida por Stein et al. (2007). Os efeitos benéficos das proteases sobre a digestibilidade de nitrogênio, da proteína bruta e dos aminoácidos já foram demonstrados anteriormente (Freitas et al. 2011; Cowieson & Ravidram 2008; Garcia et al. 2009). A melhora na digestibilidade verdadeira da proteína causado pela protease sobre a dieta controle foi de 3,53% . A carboidrase promoveu aumento de 3,08, enquanto que a associação entre as duas promoveu aumento em média de 4,70%. Angel et. al.(2011) avaliando a digestibilidade aparente apenas, encontrou melhora de 6,1%, diferença considerável, levando em conta que para a digestibilidade verdadeira ainda devemos descontar a perda endógena dos aminoácidos excretados.

Segundo Pettersson et al. (2013) as proteases promovem aumento da digestibilidade aparente verdadeira do farelo de soja em média de 5%, valor muito próximo ao encontrado no presente trabalho (5,07%), este efeito pode ser causado tanto pela atuação da enzima exógena diretamente sobre a proteína do alimento deixando-a mais disponível, quanto pela hidrólise dos fatores antinutricionais fazendo com que o animal tenha maior capacidade digestiva.

Liu et al. (2013) avaliou o efeito de uma protease sobre a digestibilidade aparente de aminoácidos do sorgo em quatro partes do intestino (jejuno

proximal e distal, íleo proximal e distal), este autor concluiu que além de aumentar a digestibilidade, a enzima ainda aumentou a taxa de digestão de alguns aminoácidos. Segundo Sacranie et al. (2013) efeitos fisiológicos não definidos podem influenciar o efeito da protease.

O efeito da protease não se limita a apenas a digestão da proteína, mas também pode influenciar a digestão de amido e gordura Romero et al. (2013). Ou seja, o efeito da protease não pode ser considerado isoladamente, pois ela é utilizada juntamente com outras enzimas, cujo efeito e mecanismos parecem não serem totalmente independentes.

O efeito da carboidrase sobre a digestibilidade de aminoácidos sobre a dieta completa foi mais pronunciado que quando avaliada somente em um farelo de soja. Segundo Cowiesom (2009), o efeito de uma carboidrase nos coeficientes de digestibilidade ileal dos aminoácidos é dependente da fração indigerível da dieta e, portanto, quanto maior for esta fração na dieta, maior será a quantidade de nutrientes liberada pela enzima. A digestibilidade do farelo de soja foi calculada usando uma dieta semi purificada que continha 30% de farelo de soja e os demais ingredientes eram todos de fácil digestibilidade, como amido e açúcar. Já a dieta basal utilizada continha 36,60% de farelo de soja e ainda 55,45 % de milho, ou seja, possivelmente a dieta basal continha uma quantidade muito maior de fatores indigeríveis que a dieta usada para calcular a digestibilidade da soja.

Apesar de não ter sido feita uma análise estatística, ao comparar os valores de coeficiente de digestibilidade verdadeira dos aminoácidos da dieta basal e do farelo de soja, é claramente perceptível que o farelo de soja apresenta números maiores, isso pode ser devido ao fato de que uma dieta com maior quantidade de peptídeos proporcionar uma maior perda de aminoácidos endógenos (Ravindran et al., 2009), uma vez que as perdas endógenas da dieta basal foram estimadas usando uma dieta isenta de proteína, as perdas endógenas da dieta basal podem ter sido subestimadas.

Olukosi et al. (2007) trabalhando com fitase e um coquetel enzimático que continha xilanase, amilase e protease separadamente ou em associação, encontrou diferença estatística para o desempenho dos animais quando as enzimas foram usadas separadamente ou em conjunto, mas disseram não haver aditividade, pois se isso ocorresse, a melhora do desempenho dos

tratamentos onde houve a associação das enzimas deveria ser a soma da melhora das enzimas separadamente. Cowieson et al. (2010) definiram como efeito subaditivo, quando a associação entre duas ou mais enzimas promovem um efeito melhor que quando usadas individualmente, porém menor que a soma do efeito das enzimas. No presente estudo isso também não foi comprovado, uma vez que a associação das enzimas teve resultado semelhante à protease quando usada separadamente.

Com isso, é possível dizer que as enzimas utilizadas influenciaram a perda endógena de aminoácidos, bem como atuaram no sentido de aumentar a digestibilidade dos aminoácidos tanto do farelo de soja isoladamente, quanto da dieta basal, porém o efeito é diferenciado entre o alimento isoladamente e a dieta completa. Não é possível afirmar que exista efeito aditivo ou subaditivo entre as enzimas utilizadas.

Referências

- Adadokun, S. A.; Adeola O. ; Parsons C. M. et al., 2011 Factors affecting endogenous amino acid flow in chickens and the need for consistency in methodology. *Poultry Science* v. 90 p. 1737 - 1748.
- Angel, C. R., Saylor, W., Vieira, S. L., & Ward, N. 2011. Effects of a monocomponent protease on performance and protein utilization in 7-to 22-day-old broiler chickens. *Poultry Science*, 90(10), 2281-2286.
- Chárraga, S., & Fernández, S. 2010. *Uso de Enzimas en Producción Avícola*. DSM Nutritional Products México SA de CV, 14.
- Choct, m. E kochev, A. 2000. Non-starch polysaccharides: Chemical structures and nutritional significance. *Feed Milling International*. June: 13-26.
- Choct, M. 2006 Enzymes for the feed industry: Past, present and future. *World's Poultry Science Journal*, Ithaca, v.62, n.1, p.5-16,.
- Cowieson, A. J., & Bedford, M. R. (2009). The effect of phytase and carbohydrase on ileal amino acid digestibility in monogastric diets: complimentary mode of action?. *World's Poultry Science Journal*, 65(4), 609.
- Cowieson, A. J., & Adeola, O. 2005. Carbohydrases, protease, and phytase have an additive beneficial effect in nutritionally marginal diets for broiler chicks. *Poultry Science*, 84(12), 1860-1867.
- Cowieson, A. J., Bedford, M. R., & Ravindran, V. 2010. Interactions between xylanase and glucanase in maize-soy-based diets for broilers. *British poultry science*, 51(2), 246-257.
- Cowieson, A. J., & V. Ravindran. 2008. Effect of exogenous enzymes in maize-based diets varying in nutrient density for young broilers: Growth performance and digestibility of energy, minerals and amino acids. *Br. Poult. Sci.* 49:37–44.
- Freitas, D. M., Vieira, S. L., Angel, C. R., et al. 2011. Performance and nutrient utilization of broilers fed diets supplemented with a novel mono-component protease. *The Journal of Applied Poultry Research*, 20(3), 322-334.

Fortes, B. D. A., Cafe, M. B., Stringhini, J. H. et al. 2012. Avaliação de programas nutricionais com a utilização de carboidrases e fitase em rações de frangos de corte.

Gracia, M. I., R. Lázaro, M. A. Latorre, Pet al. 2009. Influence of enzyme supplementation of diets and cooking–flaking of maize on digestive traits and growth performance of broilers from 1 to 21 days of age. *Anim. Feed Sci. Technol.* 150:303–315.

Guenter, W. 2002 Pratical experience with the use of enzymes disponível na internert. <http://books.google.com.br> acesso 23/11/2013.

Irish, G. G.; Balnave, D. Non-starch polysaccharides and broiler performance on diets containing soyabean meal as the sole protein concentrate. *Australian Journal of Agricultural Research*, Victoria, v.44, n.7, p.1483-1499, 1993.

Joslyn, M.A. *Methods in Food Analysis-Physical, Chemical, and Instrumental Methods of Analysis*. 2 nd ed. New York, Ac. Press. 1970.

Mayorga, M. E., Vieira, S. L., Kindlein, L., et al. (2011) Efeitos de uma protease monocomponente em dietas de frangos de corte com níveis crescentes de inibidores da tripsina. Disponível em <http://pt.engormix.com/MA-avicultura/nutricao/artigos/efeitos-protease-monocomponente-dietas-t515/141-p0.htm> acesso em 22/11/2013.

Olukosi, O. A., Cowieson, A. J., & Adeola, O. 2007. Age-related influence of a cocktail of xylanase, amylase, and protease or phytase individually or in combination in broilers. *Poultry Science*, 86(1), 77-86.

Oxenboll, K. M., Pontoppidan, K., & Fru-Nji, F. 2011. Use of a protease in poultry feed offers promising environmental benefits. *International Journal of Poultry Science*, 10(11), 842-848.

Pettersson, D., & Pontoppidan, K. 2013. Soybean Meal and The Potential for Upgrading Its Feeding Value by Enzyme Supplementation. disponível na internet http://cdn.intechopen.com/pdfs/40314/InTech-Soybean_meal_and_the_potential_for_upgrading_its_feeding_value_by_enzyme_supplementation.pdf acesso em 23/11/2013

Ravindran, V., Morel, P. C., Rutherford, S. M., et al. 2009. Endogenous flow of amino acids in the avian ileum as influenced by increasing dietary peptide concentrations. *British Journal of Nutrition*, 101(6), 822.

Rostagno, H. S.; Albino, L. F. T.; Donzele, J. L. et al. 2011. Brazilian tables for poultry and swine: composition of feedstuffs and nutritional requirements. 3rd edition, Viçosa: UFV. 252 p.

Sakomura, N. K. and H. S. Rostagno. Métodos de pesquisa em nutrição de monogástricos. editor funep, jaboticabal. 2007.

SAS Institute. (2009). SAS Web Report Studio 4. 2: User's Guide. SAS Publishing (Ed.). Sas Institute.

Silva, D. J., and A. C. Queiroz. 2002. Análise de alimentos (métodos químicos e biológicos). 3^{ed}.Viçosa: UFV, 235p.

Soto-Salanova, M. F. 1996.. Uso de enzimas em dietas de milho e soja para frangos de corte. In: Conferência Apinco De Ciência E Tecnologia Avícola, 1996, Campinas. Anais... Campinas: FACTA, p.71-76.

Stein, H. H., B. Seve, M. F. Fuller, P. J., et al. 2007. Amino acid bioavailability and digestibility in pig feed ingredients: Terminology and application. *J. Anim. Sci.* 85:172–180.

Artigo 3

Digestibilidade ileal verdadeira de aminoácidos em dietas com diferentes níveis de proteína bruta, suplementadas com enzimas.

Digestibilidade ileal verdadeira de aminoácidos em dietas com diferentes níveis de proteína bruta, suplementadas com enzimas.

Use of exogenous enzyme on true ileal digestibility of amino acids in diets with different levels of crude protein.

Resumo

Foi realizado um ensaio de digestibilidade no Setor de Avicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa para determinar a digestibilidade ileal verdadeira de aminoácidos de dietas com diferentes níveis de proteína bruta suplementadas ou não com enzimas exógenas. Foram utilizados 504 pintos de corte da linhagem comercial Cobb 500® durante o período experimental de 14 a 24 dias de idade. Os animais foram distribuídos em gaiolas metabólicas em esquema fatorial 4 x 2 (enzimas e níveis de proteína bruta) resultando em 8 tratamentos com 6 repetições e 7 aves por unidade experimental. As enzimas usadas foram: uma protease, uma carboidrase e a associação de ambas, além de uma dieta sem a adição de enzimas. Foram misturadas dietas com dois níveis de proteína bruta 21,0% e 14,7%. A suplementação das dietas com protease proporcionou aumento ($P < 0,05$) na digestibilidade da maioria dos aminoácidos, sendo em média 2,5% superior à dieta sem a adição de enzimas. A suplementação com carboidrase promoveu nas dietas aumento na digestibilidade de aminoácidos de 1,9% em relação à dieta basal enquanto a associação das duas enzimas promoveu em média aumento de 4,7%. Houve diferença ($P < 0,05$) para a digestibilidade de aminoácidos das dietas de diferentes níveis de proteína bruta, sendo a dieta de 14,7% de proteína bruta 2,21% superior à dieta de 21,0% de proteína bruta. Houve interação significativa ($P < 0,05$) para serina, glicina, alanina, prolina, metionina, leucina, fenilalanina, lisina, soma dos aminoácidos e proteína bruta.

Abstract

Digestibility assay was performed in the Poultry Section of the Department of Animal Science, Federal University of Viçosa, 504 commercial broiler chicks Cobb 500® was used during the experimental period of 14 to 24 days old. The animals were distributed in metabolic cages in a 4 x 2 factorial arrangement (Enzymes and protein levels) resulting in 8 treatments with 6 replicates of 7 birds per experimental unit . The enzymes used were: a protease , carbohydrase and one combination of both , and a diet without enzymes addition. Diets with two levels of crude protein 21.0% and 14.7 % were mixed. The protease promoted an increase (P <0.05) in digestibility of most amino acids, on average 2.5 % higher than the diet without enzymes addition, carbohydrase in the diet promoted an increase in amino acid digestibility 1.9 % compared to the basal diet while the association of the two enzymes promoted an average increase of 4.7 % . There were differences (P < 0.05) for the amino acid digestibility of diets of different protein levels , with the diet of 14.7 % crude protein 2.21 % higher than the diet of 21.0 % crude protein. There was a significant interaction (P < 0.05) serine, glycine, alanine , proline , methionine , leucine , phenylalanine, lysine sum of the crude protein and amino acids.

Key words: proteases, carbohydrase, amino acids, digestibility, poultry.

Introdução

O Brasil é hoje um dos maiores produtores e exportadores de carne de frango no mundo, devido às constantes pesquisas em nutrição, manejo, melhoramento, sanidade e ambiência. A atividade avícola tem grande importância econômica e social para o país, já que além de produzir proteína barata e de qualidade é também, grande geradora de emprego e de renda.

A alimentação é a parte mais onerosa do processo produtivo, representando aproximadamente 75% do custo de produção. A formulação de dietas de precisão e de mínimo custo tem grande impacto na redução dos custos de produção como um todo. Pesquisas têm sido feitas para promover melhor aproveitamento das dietas pelos dos animais.

Um dos grandes problemas para a boa digestão dos alimentos pelos animais é a presença de fatores antinutricionais. A maior parte das dietas no Brasil é produzida a base de milho e de farelo de soja (Fortes et al., 2012). Considerando que, o milho contém aproximadamente 8% de polissacarídeos não amiláceos (PNA) insolúveis (Choct, 2006) e o farelo de soja contém 16% de PNA (Irish & Balnave, 1993), necessário se faz adotar estratégias para melhor aproveitamento dos nutrientes.

As enzimas exógenas surgem com alternativa para melhorar a capacidade digestiva dos animais, conseqüentemente com melhor aproveitamento dos nutrientes e com menor excreção de agentes poluidores no ambiente, O uso destas enzimas tem sido estudado há vários anos, principalmente as fitases e as enzimas que degradam PNA, já possuindo resultados consistentes, o que possibilita sua larga utilização pela indústria.

Porém, de acordo com Cowieson & Adeola (2005), o estudo da atividade das enzimas em conjunto vem recebendo pouca atenção. Estes mesmos autores afirmam que, apesar da lógica dizer que a resposta ao uso de duas ou mais enzimas teria aumento proporcional na digestibilidade, na realidade essa afirmação pode não ser verdadeira. É necessário então, estudos que possibilitem o melhor entendimento do mecanismo de ação das enzimas em conjunto.

Além disto, Freitas et al. (2011) afirmam que existe diferença de eficiência de atividade de enzimas exógenas quando utilizadas em dietas com diferentes

níveis nutricionais. Ou seja, uma protease pode promover diferentes digestibilidade em dietas com diferentes níveis de proteína bruta.

Materiais e métodos.

Foi realizado um ensaio de digestibilidade no Setor de Avicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, seguindo a normas adotadas pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Viçosa. Foram utilizados 504 pintos de corte da linhagem comercial Cobb 500® durante o período experimental de 14 a 24 dias de idade. Os animais foram distribuídos em gaiolas metabólicas em um esquema fatorial 4 x 2 (enzimas e níveis de proteína bruta) resultando em 8 tratamentos com 6 repetições e 7 aves por unidade experimental. O estudo foi dividido em 2 blocos separados pelo tempo, sendo que cada bloco teve um total de três repetições de cada tratamento, possuindo as mesmas condições, diferenciando apenas no tempo. Para que fosse determinada a excreção endógena de aminoácidos foram fornecidas a diferentes grupos de animais dietas isentas de proteína suplementadas ou não com enzimas.

Os tratamentos foram constituídos de um controle (sem enzima), adição de uma protease, adição de um complexo de carboidrases e a adição das duas enzimas simultaneamente (Associação), em dietas contendo 21,0 ou 14,7% de proteína bruta. Para produzir as dietas, foi elaborada uma dieta basal (DB) a base de milho e de farelo de soja contendo 21% de proteína bruta. A segunda dieta foi formulada com 70 % da dieta basal + 30 % de amido, contendo 14,7% de proteína bruta, de modo que mesmo tendo diferentes teores de proteína bruta, a relação entre os aminoácidos era a mesma para as duas dietas que estão apresentadas na Tabela 1. Em todas as dietas foi adicionado Celite™ como indicador de indigestibilidade em uma quantidade de 10 g/kg.

Tabela 1: Dietas experimentais (g/kg).

Ingredientes / Dietas	DIP	210,0	147,0
Amido	810,20	-	300,00
Açúcar	50,00	-	-
Dieta Basal	-	-	700,00
Milho	-	554,29	-
Farelo de Soja	-	366,02	-
Óleo de soja	50,00	31,86	-
Fosfato Bicálcio	21,00	15,20	-
Calcário	10,00	9,08	-
Sal	4,50	4,83	-
Sabugo de milho	40,00	-	-
L-Lisina HCl	-	1,62	-
DL-Metionina	-	2,75	-
L-Treonina	-	0,40	-
Premix Mineral ¹	1,10	1,10	-
Premix Vitamínico ²	1,20	1,85	-
Cloreto de Colina	2,00	1,00	-
Celite TM	10,00	10,00	-
Total	100,00	100,00	100,00
Proteína Bruta %	0,00	21,00	14,70

As enzimas utilizadas foram: Ronozyme ProAct® (protease) que é uma protease produzida a partir de *Bacillus licheniformis* com inclusão de 200ppm. A atividade enzimática para esta protease é definida pela quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol of *p*-nitroaniline a partir de 1 µM do substrato (Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-*N*-succinyl Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilide) por minuto a um pH de 9.0 e 37° C. O produto utilizado consiste de 75000 unidades/g de enzima. Ronozyme® VP (carboidrase) com inclusão de 300ppm contendo (50 FBG/g de atividade de endo-1,3(4) -β-glucanase e ainda atividade de pentozanase, hemicellulase e pectinase).

Até o 13° dia de idade os animais receberam uma ração à base de milho e de farelo de soja para atender suas exigências nutricionais seguindo as recomendações de Rostagno (2011). Aos 14 dias de vida foram transferidos para baterias metálicas equipadas com bandejas coletoras de excreta, cobertas por uma lona plástica, para evitar a contaminação do material, e então começaram a receber as dietas experimentais até o 23° dia de vida.

No 24^o dia todos os animais foram abatidos por eletronarcose. Em seguida foi realizada uma incisão abdominal para expor o íleo e coletar o conteúdo de 40 cm a partir da junção íleo cecal. O conteúdo ileal foi coletado realizando uma leve pressão com os dedos no intestino dos animais. A digesta coletada foi armazenada em potes plásticos devidamente identificados, liofilizados, moídos em moinho de aço inox e enviados para análise de matéria seca e de proteína bruta de acordo com Silva et al. (2002) e cinza insolúvel em ácido (AIA) seguindo as recomendações de Josleyn (1970). O conteúdo de aminoácido das digestas e das dietas foi analisado no Laboratório CBO por High Performance Liquid Chromatography (HPLC)..

Os valores de excreção endógena foram determinados utilizando aves submetidas as DIPs. A determinação dos coeficientes de digestibilidade verdadeira dos aminoácidos foi realizada de acordo com as equações propostas por Sakomura & Rostagno (2007) e estão indicadas a seguir:

Fator de indigestibilidade ilial (IF):

IF1 = [AIA] na dieta / [AIA] digesta.

IF2 = [AIA] on DIP / [AIA] digesta

Coeficiente de digestibilidade ileal (IDC):

$$\text{TIDAA \%} = \frac{(\% \text{ AA dieta} - (\% \text{ AA dig.} \times \text{IF1}) - (\text{AA end. PFD} \times \text{IF2}))}{\% \text{ AA dieta}} \times 100$$

onde:

IF = fator de indigestibilidade

[AIA] = concentração de cinza insolúvel em ácido.

DIP = Dieta isenta de proteína.

TIDAA = Coeficiente de digestibilidade verdadeira dos aminoácidos.

% AA diet = Porcentagem de aminoácido na dieta dieta.

% AA dig = Porcentagem de aminoácido na digesta.

AA end = Aminoácido endógeno.

Os dados de cada ensaio foram submetidos à ANOVA e as médias avaliadas pelo teste Student Newman Keuls (SNK) com 5% de probabilidade usando o pacote estatístico do SAS Institute. (2009).

Resultados

Os teores de aminoácidos analisados nas dietas estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2: Teor de aminoácidos analisados nas dietas¹ (mg/g).

Aminoácidos/Dietas	21,00%	14,70%
Ác. Aspartico	22,80	16,20
Ác. Glutâmico	41,10	29,20
Serina	11,50	8,10
Glicina	9,30	6,70
Histidina	5,60	3,90
Arginina	15,60	10,70
Treonina	8,60	5,80
Alanina	10,40	7,60
Prolina	13,10	9,60
Tirosina	8,20	5,50
Valina	10,80	7,20
Metionina	5,10	3,30
Cistina	2,40	1,70
Isoleucina	8,30	5,40
Leucina	17,60	12,20
Fenilalanina	10,70	7,30
Lisina	13,10	8,80
Triptofano	1,80	1,30
Somatória	217,90	156,00
Proteína	215,10	149,30

¹ Laboratório CBO – Campinas SP

Tabela3: Coeficientes de digestibilidade ileal verdadeira dos aminoácidos essenciais. (%)

Dieta	Enz	Ser	Gli	His	Arg	Treo	Val	Met	Iso	Leu	Fen	Lis	Trip	Soma	PB
21,00%	S/enz	77,96	72,94	79,45	85,85	73,81	74,36	93,37	76,71	79,07	79,03	82,04	67,61	76,41	79,93
	Protease	81,89	75,21	83,12	88,08	79,26	82,99	94,08	83,56	83,78	84,63	85,48	73,34	80,96	83,46
	Carboidrase	81,51	76,16	82,58	87,98	77,06	78,63	94,59	80,03	81,33	81,97	87,72	75,13	79,69	82,35
	Associação	83,27	77,57	83,70	89,09	78,17	79,51	93,98	82,59	85,24	83,37	86,56	72,24	81,54	83,79
14,70%	S/enz	80,99	74,74	80,81	89,09	77,99	78,55	94,84	79,36	82,02	82,44	85,28	74,79	80,49	79,51
	Protease	80,88	75,04	81,83	89,94	78,72	83,99	92,83	83,84	83,58	84,95	85,94	73,10	80,64	79,22
	Carboidrase	79,20	72,08	84,71	90,19	79,27	81,96	93,19	81,47	81,99	83,39	86,46	79,33	81,62	83,45
	Associação	87,58	81,29	85,53	92,42	82,01	83,28	95,82	85,54	84,03	87,92	88,49	75,59	85,95	85,19
ENZ	S/enz	79,47	73,84	80,13 ^C	87,47 ^C	75,90 ^B	76,45 ^C	94,11	78,03 ^C	80,55	80,73	83,66	71,20 ^B	78,45	79,72
	Protease	81,38	75,12	82,48 ^B	89,01 ^B	78,99 ^{AB}	83,49 ^A	93,46	83,70 ^A	83,68	84,79	85,71	73,22 ^{AB}	80,80	81,34
	Carboidrase	80,35	74,12	83,64 ^{AB}	89,08 ^B	78,16 ^{AB}	80,30 ^B	93,89	80,75 ^B	81,66	82,68	87,09	77,23 ^A	80,66	82,90
	Associação	85,42	79,43	84,61 ^A	90,76 ^A	80,09 ^A	81,39 ^B	94,90	84,06 ^A	84,64	85,65	87,53	73,91 ^{AB}	83,74	84,49
DIET	21,00%	81,16	75,47	82,21	87,75	77,07	78,87	94,01	80,72	82,36	82,25	85,45	72,08	79,65	82,38
	14,70%	82,16	75,79	83,22	90,41	79,50	81,95	94,17	82,55	82,91	84,68	86,54	75,70	82,18	81,84
ANOVA	ENZ	0,001	0,001	0,001	0,001	0,037	0,001	0,008	0,001	0,001	0,001	0,001	0,024	0,001	0,001
	DIETA	0,077	0,665	0,079	0,001	0,021	0,001	0,562	0,003	0,297	0,001	0,015	0,010	0,001	0,330
	ENZ*DIETA	0,001	0,005	0,132	0,507	0,344	0,335	0,001	0,355	0,047	0,014	0,005	0,286	0,024	0,003
	SD	3,291	3,602	2,582	2,242	3,946	3,749	1,310	3,255	2,458	2,876	2,279	5,492	3,105	2,802

Letras diferentes significam diferença significativa (P<0,05)

Tabela 4: Coeficiente de digestibilidade ileal dos aminoácidos não essenciais.

Dieta	Enz	Asp	Glu	Ala	Pro	Tir	Cis	Iso
21,00%	S/ENZ	75,02	82,87	78,46	77,19	78,15	73,79	76,71
	Protease	78,78	85,89	82,08	80,51	82,29	80,90	83,56
	Carboidrase	78,25	85,01	80,00	80,20	79,74	75,70	80,03
	Associação	79,79	85,59	83,84	85,59	81,24	81,35	82,59
14,70%	S/ENZ	78,13	86,43	82,65	80,73	82,09	79,62	79,36
	Protease	79,00	87,08	82,59	80,45	81,56	82,06	83,84
	Carboidrase	77,32	86,10	84,93	79,00	80,94	81,14	81,47
	Associação	82,04	86,57	88,94	91,62	82,38	82,07	85,54
ENZ	S/ENZ	76,57 ^C	84,65 ^B	80,55	78,96	80,12	76,70	78,03 ^C
	Protease	78,89 ^B	86,48 ^A	82,33	80,48	81,93	81,48	83,70 ^A
	Carboidrase	77,78 ^{BC}	85,56 ^{AB}	82,47	79,60	80,34	78,42	80,75 ^B
	Associação	80,92 ^A	86,08 ^{AB}	86,39	88,60	81,81	81,71	84,06 ^A
DIETA	21,00%	77,96	84,84	81,1	80,87	80,36	77,93	80,72
	14,70%	79,12	86,54	84,78	82,95	81,75	81,22	82,55
ANOVA	ENZ	0,001	0,039	0,001	0,001	0,128	0,075	0,001
	DIETA	0,083	0,001	0,001	0,001	0,045	0,04	0,003
	ENZ*DIETA	0,128	0,149	0,015	0,001	0,121	0,514	0,355
	SD	2,872	1,961	3,453	4,698	2,526	5,702	3,255

Letras diferentes significam diferença significativa (P<0,05)

Observou-se efeito significativo da suplementação de enzimas ($P < 0,05$) com aumento da digestibilidade da maioria dos aminoácidos em relação as dietas que não receberam enzimas, não tendo sido observado efeito ($P > 0,05$) apenas para os aminoácidos tirosina, cistina e metionina + cistina. As dietas suplementadas com protease tiveram digestibilidade de aminoácidos maior ($P < 0,05$) para grande parte deles, sendo superior a dieta sem adição de enzimas em média em 2,5%. Os animais que receberam as dietas sem enzimas e a dieta suplementada com protease tiveram a digestibilidade de glicina, treonina, prolina, metionina e triptofano semelhantes entre si. As aves que receberam dietas suplementadas com carboidrases tiveram uma maior digestibilidade ($P < 0,05$) de histidina, arginina, alanina, valina, isoleucina, fenilalanina, lisina, triptofano, para a soma de aminoácidos e para a proteína bruta, tendo uma média total 1,9% superior a dieta basal. Os tratamentos que receberam a associação das enzimas tiveram maior digestibilidade ($P > 0,05$) de grande parte dos aminoácidos, exceto para ácido glutâmico, triptofano e metionina, a média de melhora da digestibilidade em relação à dieta basal foi de 4,7%.

As aves dos tratamentos que receberam a protease e as que receberam as dietas suplementadas com carboidrase apresentaram resultados semelhantes tendo digestibilidade de aminoácidos média de 82,77% e 82,19% respectivamente, sendo que a protease propiciou melhor digestibilidade para os aminoácidos valina, isoleucina, leucina fenilalanina e lisina. A associação das enzimas propiciou digestibilidade de aminoácidos de 84,55%, enquanto os animais que receberam as dietas basais sem a adição de enzimas tiveram digestibilidade de aminoácidos média de 80,27%. Com relação aos níveis de proteína das dietas, os animais que receberam as dietas com 21% de proteína bruta tiveram digestibilidade de aminoácidos média de 81,55%, apresentando resultados significativamente ($P < 0,05$) menores para os aminoácidos ácido aspártico, serina, glicina, histidina, treonina, metionina, leucina e as aves que receberam as dietas contendo 14,7% que tiveram digestibilidade de aminoácidos de 83,35%.

Tabela 5: Desdobramento das interações.

	Dieta	S/ENZ	Protease	Carboidrase	Associação
Ala	21,0%	78,46 Cb	82,08 ABa	80,00 BCb	83,84 Ab
	14,7%	82,65 Ca	82,58 BCa	84,93 Ba	88,94 Aa
Pro	21,0%	77,19 Cb	80,51 Ba	80,20 Ba	85,59 Ab
	14,7%	80,73 Ba	80,44 Ba	79,00 Ba	91,62 Aa
Ser	21,0%	77,96 Bb	81,89 Aa	81,51 Aa	83,27 Ab
	14,7%	80,99 Ba	80,88 Ba	79,20 Bb	87,58 Aa
Gli	21,0%	72,94 Ba	75,21 ABa	76,16 ABa	77,57 Ab
	14,7%	74,74 Ba	75,04 Ba	72,08 Bb	81,29 Aa
Met	21,0%	93,37 Ab	94,08 Aa	94,59 Aa	93,98 Ab
	14,7%	94,84 Aa	92,83 Bb	93,19 Bb	95,82 Aa
Leu	21,0%	79,07 Cb	83,78 Aa	81,33 Ba	85,24 Aa
	14,7%	82,02 Aa	83,58 Aa	81,99 Aa	84,03 Aa
Fen	21,0%	79,03 Cb	84,63 Aa	81,97 Ba	83,37 Abb
	14,7%	82,44 Ca	84,95 Ba	83,39 Bca	87,92 Aa
Lis	21,0%	82,04 Cb	85,48 Ba	87,72 Aa	86,56 ABb
	14,7%	85,28 Ba	85,94 Ba	86,46 Ba	88,49 Aa
Soma	21,0%	76,41 Bb	80,96 Aa	79,69 Aa	81,54 Ab
	14,7%	80,49 Ba	80,64 Ba	81,62 Ba	85,95 Aa
Pb	21,0%	79,93 Ba	83,46 Aa	82,35 Aa	83,79 Aa
	14,7%	79,51 Ba	79,22 Bb	83,45 Aa	85,19 Aa

Letras maiúscula significam diferenças entre enzimas. Letras minúsculas diferenças entre dietas.

Houve interação significativa ($P < 0,05$) para os aminoácidos serina, glicina, alanina, prolina, metionina, leucina, fenilalanina, lisina, para a soma dos aminoácidos e para a proteína bruta. , No desdobramento das interações é possível ver que no geral, nos tratamentos sem a adição de enzimas a digestibilidade das dietas com 14,7% de proteína bruta e a digestibilidade de aminoácidos foi maior em relação as dietas com 21,0%, porém, a adição de enzimas tendeu a reduzir este efeito da proteína bruta sobre a digestibilidade de aminoácidos.

Discussão.

O efeito benéfico da protease sobre a digestibilidade de aminoácidos, a redução na excreção de nitrogênio e o desempenho de frangos de corte foi observado por vários autores (Angel et al. 2011; Oxemboll et al. 2011; Barekatin et al. 2012; Dusković et al. 2012). Guggenbuh et al. (2012) também verificaram os efeitos benéficos da protease sobre a digestibilidade de aminoácidos para leitões. No presente trabalho, a adição de protease melhorou a digestibilidade de diversos aminoácidos e da proteína bruta, que pode ser associado com a redução na excreção de nitrogênio no ambiente.

A melhora da digestibilidade dos aminoácidos nas dietas suplementadas com a carboidrase provavelmente se deve a quebra da parede celular das células dos alimentos, com consequente liberação de proteínas que estavam aprisionadas neste meio. Outros autores já demonstraram efeitos benéficos de carboidrases a base de β -glucanase (Romero 2012; Dalsgaard et al 2012; Rodríguez et al. 2012)

O efeito da associação das enzimas pode ser observado pela diferença estatística, mas também é interessante observar que ao analisar as médias dos valores de digestibilidade de todos os aminoácidos verifica-se que a protease isoladamente melhorou a digestibilidade em média em 3,12%, a carboidrase melhorou em media 2,39% e a associação das enzimas melhorou em média 5,33%, bem próximo do que seria a soma dos efeitos de cada enzima. Segundo Romero et al, 2013, o efeito de uma protease não pode ser considerado isoladamente, pois ela normalmente é utilizada juntamente com outras enzimas, e o efeito e mecanismos parecem não ser totalmente independente.

A melhor digestibilidade dos aminoácidos para a dieta de 14,7% de proteína bruta era esperada, já que, a digestibilidade depende da quantidade de substrato que chega ao intestino. Quanto menor a quantidade de substrato mais fácil é para o animal secretar enzimas suficientes para digerir os nutrientes, de modo que a adição de enzimas exógenas nesta situação irá contribuir pouco para o aumento da digestibilidade. A maior digestibilidade de aminoácidos para a dieta de 14,7% de proteína bruta era esperada e concorda com Freitas et al. (2011) que relatou diferenças na digestibilidade

de aminoácidos comparando dietas com diferentes níveis de proteína bruta, tendo uma maior digestibilidade em dietas utilizando os níveis mais baixos.

Warpechowski et al (2006) relataram aumento linear da digestibilidade ileal verdadeira da proteína bruta com o aumento da proteína bruta da dieta, porém, estes autores variaram a proteína bruta variando a concentração das fontes proteicas, fazendo com que ocorresse uma variação não só no nível, mas também no tipo de proteína bruta da dieta. No presente trabalho, a variação da proteína bruta ocorreu devido a adição de amido na dieta, ou seja, apesar de conter um nível diferente, a proteína bruta das dietas possuíam as mesmas características.

Quando houve interação significativa ($P < 0,05$) como foi o caso da lisina, é possível notar que ao se combinar as duas enzimas na dieta de baixa proteína bruta houve melhora da digestibilidade ($P < 0,05$) em relação a dieta de baixa proteína sem a adição de enzimas.

A contribuição das enzimas para melhorar a digestibilidade de aminoácidos em alimentos ou dietas que são bem digestíveis será menor que para aqueles menos digestíveis (Romero 2013), Em uma dieta onde existe alta concentração de DL-metionina na forma cristalina já terá naturalmente alta digestibilidade de metionina, sendo assim a magnitude do efeito da enzima será menor. Já em dieta que contenha grande quantidade de proteína bruta, a magnitude do efeito da enzima será melhor observada.

Matematicamente a digestibilidade ileal máxima de um alimento é 100%, com isso, a capacidade de aumento da digestibilidade por um aditivo diminui a cada vez que novo aditivo que trabalhe sobre o mesmo substrato é incluso na dieta (Isaksen et al. 2010). Mas enzimas que atuam sobre diferentes substratos podem influenciar positivamente, liberando nutrientes "aprisionados", por exemplo, enzimas que degradam parede celular liberando proteína. Cowieson (2010) A digestibilidade natural da dieta ou de um alimento sem a adição de nenhum aditivo é um bom indicativo da magnitude da resposta da enzima.

Ao observar o desdobramento das interações, nota-se que na dieta de 21% de proteína bruta o efeito das enzimas é mais pronunciado, mostrando diferenças entre o efeito de cada enzima que foi adicionada individualmente, em relação à dieta que não foi adicionado nenhuma enzima. Porém, ao

analisar os resultados de digestibilidade das dietas com 14,7% de proteína bruta, no geral, é possível observar que as enzimas quando adicionadas isoladamente não diferiram ($P > 0,05$) da dieta controle., Observou-se apenas a diferença quando houve a associação das enzimas, mostrando o efeito aditivo da adição de enzimas sobre a digestibilidade de aminoácidos.

A composição da dieta pode influenciar a fisiologia do trato digestivo (Isaksen et al. 2010) podendo alterar a excreção endógena de enzimas digestivas, modificando a amplitude do efeito da enzima exógena. Ainda segundo este autor, a mensuração deste mecanismo regulatório é intuitiva, mas aparentemente, o organismo tende a regular a excreção enzimática de acordo com a quantidade de nutrientes existente na luz intestinal, isso para evitar que uma quantidade desnecessária de enzimas seja excretada., Uma dieta com maior proteína bruta tende a estimular a excreção de proteases, mas , deve-se levar em consideração que existe um limite fisiológico para o animal, levando a crer que exista um nível nutricional ótimo em que o animal apresente maior eficiência metabólica.

Pode-se concluir que as enzimas melhoram a digestibilidade dos aminoácidos das dietas, Dietas com menores níveis de proteína bruta apresentam maior digestibilidade e ainda é necessário atentar para os a ação diferenciada das enzimas em dietas com diferentes níveis proteicos.

Referências.

- Angel, C. R., W. Saylor, S. L. Vieira, & N. Ward. "Effects of a monocomponent protease on performance and protein utilization in 7-to 22-day-old broiler chickens." *Poultry science* 90, n^o. 10: 2281-2286. (2011).
- Barekatin, M. R., M. Choct, C. Antipatis, & P. A. Iji. "Use of protease and xylanase in broiler diets containing distillers dried grains with solubles." In Proc. Aust. Poult. Sci. Symp, vol. 23, pp. 65-68. (2012).
- Cowieson, A. J., Bedford, M. R., & Ravindran, V. Interactions between xylanase and glucanase in maize-soy-based diets for broilers. *British poultry science*, 51(2), 246-257. (2010).
- Dalsgaard, J., V. Verlhac, N. H. Hjerimitslev, Kim Schøn Ekmann, M. Fischer, M. Klausen, and Per Bovbjerg Pedersen. "Effects of exogenous enzymes on apparent nutrient digestibility in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets with high inclusion of plant-based protein." *Animal Feed Science and Technology* 171, no. 2 (2012): 181-191.
- Dosković, V., S. Bogosavljević-Bošković, Z. Pavlovski, B. et al. "The effect of protease on productive and slaughter traits in broiler chickens." *Biotechnology in Animal Husbandry* 28, no. 4 (2012).
- Freitas, D. M., S. L. Vieira, C. R. Angel, A. Favero, and A. Maiorka. "Performance and nutrient utilization of broilers fed diets supplemented with a novel mono-component protease." *The Journal of Applied Poultry Research* 20, no. 3 (2011): 322-334.
- Guggenbuhl, P., Y. Waché, & J. W. Wilson. "Effects of dietary supplementation with a protease on the apparent ileal digestibility of the weaned piglet." *Journal of animal science* 90, no. Supplement 4 (2012): 152-154.
- Joslyn, M.A. *Methods in Food Analysis-Physical, Chemical, and Instrumental Methods of Analysis*. 2 nd ed. New York, Ac. Press. (1970).

ISAKSEN, M.F., COWIESON A.J., KRAGH K.M. in Bedford, M. R., and G. G. Partridge. "Enzymes in farm animal nutrition." CAB International (2010).

Oxenboll, K. M., K. Pontoppidan, & Fidelis Fru-Nji. "Use of a Protease in Poultry Feed Offers Promising Environmental Benefits." International Journal of Poultry Science 10, no. 11 (2011).

Ribeiro, T., M. M. S. Lordelo, P. I. P. Ponte, B. Maças, J. A. M. Prates, M. Aguiar Fontes, L. Falcão, J. P. B. Freire, L. M. A. Ferreira, and C. M. G. A. Fontes. "Levels of endogenous β -glucanase activity in barley affect the efficacy of exogenous enzymes used to supplement barley-based diets for poultry." Poultry science 90, no. 6 (2011): 1245-1256.

Rodríguez, M. L., Almudena R., Susana V., et al. "Wheat and barley based diets with or without additives influence broiler chicken performance, nutrient digestibility and intestinal microflora." Journal of the science of food and agriculture 92, no. 1 (2012): 184-190.

Romero, L. F., et al. "Comparative effects of dietary carbohydrases without or with protease on the ileal digestibility of energy and amino acids and AME in young broilers." Animal Feed Science and Technology 181.1 (2013): 35-44.

Rostagno, H. S.; Albino, L. F. T.; Donzele, J. L. et al. Brazilian tables for poultry and swine: composition of feedstuffs and nutritional requirements. 3rd edition, Viçosa: UFV. 252 p. (2011).

Sakomura, N. K. and H. S. Rostagno. Métodos de pesquisa em nutrição de monogástricos. editor funep, jaboticabal. (2007).

SAS Institute. SAS Web Report Studio 4. 2: User's Guide. SAS Publishing (Ed.). Sas Institute. (2009).

Silva, D. J., and A. C. Queiroz. Análise de alimentos (métodos químicos e biológicos). 3^{ed}. Viçosa: UFV, 235p. (2002).

Warpechowski, M. B., A. de M. Kessler, S. Pophal, A. Ebert, and A. M. L. Ribeiro. "True ileal protein digestibility in broilers fed diets with different crude protein levels." Acta Scientiarum-Animal Sciences 28, no. 3 (2006): 281-287.

Conclusões Gerais

Com tudo o que foi apresentado é possível concluir que:

Enzimas exógenas podem aumentar o desempenho de frangos de corte

O uso de enzimas exógenas influencia a perda endógena de aminoácidos sendo necessário levar este fato em consideração ao realizar o cálculo da digestibilidade verdadeira dos aminoácidos.

Proteases e Carboidrases e a associação de ambas podem aumentar o coeficiente de digestibilidade tanto do farelo de soja, quanto de dietas completas.

O nível de proteína bruta influencia a digestibilidade ileal verdadeira dos aminoácidos e da própria proteína bruta.

É possível haver efeito associativo entre duas enzimas exógenas, tanto em relação ao desempenho, quanto em relação a digestibilidade de aminoácidos das dietas.