

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE AMILASE DO FUNGO
Aspergillus awamori E SUA UTILIZAÇÃO EM DIETAS PARA
FRANGOS DE CORTE**

Hélber Souto Morgado
Orientador: Cirano José Ulhôa

GOIÂNIA
2013

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1 **1. Identificação do material bibliográfico:** ☐ Dissertação ☒ Tese

2 **2. Identificação da Tese ou Dissertação**

Autor (a):	Hélber Souto Morgado		
E-mail:	helber@globocom		
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?	☐ Sim	☒ Não	
Vínculo empregatício do autor	IF Goiano - Câmpus Ceres		
Agência de fomento:		Sigla:	
País:	Brasil	UF:GO	CNPJ: 10.651.417/0001-78
Título:	PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE AMILASE DO FUNGO <i>Aspergillus awamori</i> E SUA UTILIZAÇÃO EM DIETAS PARA FRANGOS DE CORTE		
Palavras-chave:	desempenho, digestibilidade, enzimas, frango de corte, sangue		
Título em outra língua:	PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF AMYLASE FROM THE FUNGUS <i>Aspergillus awamori</i> AND ITS USE IN BROILER DIETS		
Palavras-chave em outra língua:	blood, broilers, digestibility, enzymes, performance		
Área de concentração:	Produção Animal		
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	18/10/2013		
Programa de Pós-Graduação:	Doutorado em Ciência Animal		
Orientador (a):	Dr. Cirano José Ulhoa		
E-mail:	ulhoa@icb.ufg.br		
Co-orientador (a):*	José Henrique Stringhini - EVZ/UFG Cleiton Mateus Sousa - IFGoiano Campus Ceres - 091.671.957-09		
E-mail:	henrique@vet.edu.br cleiton.sousa@ifgoiano.edu.br		

*Necessita do CPF quando não constar no SisPG

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹


Assinatura do (a) autor (a)

Data: 04 / 11 / 13

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

HÉLBER SOUTO MORGADO

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE AMILASE DO FUNGO
Aspergillus awamori E SUA UTILIZAÇÃO EM DIETAS PARA
FRANGOS DE CORTE**

Tese apresentada para obtenção do grau
de Doutor em Ciência Animal junto à
Escola de Veterinária e Zootecnia da
Universidade Federal de Goiás

Área de Concentração:
Produção Animal

Orientador:
Prof. Dr. Cirano José Ulhôa - UFG

Comitê de Orientação:
Prof. Dr. José Henrique Stringhini - UFG
Prof. Dr. Cleiton Mateus Sousa - IF Goiano

GOIÂNIA

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(GPT/BC/UFG)

M847p Morgado, Hélber Souto.
Produção e caracterização de amilase do fungo
Aspergillus awamori e sua utilização em dietas para frangos
de corte [manuscrito] / Hélber Souto Morgado. - 2013.
108 f. : figs, tabs.

Orientador: Prof. Dr. Cirano José Ulhôa.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás,
Escola de Veterinária e Zootecnia, 2013.
Bibliografia.

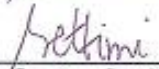
1. Frango de corte – Rações. 2. *Aspergillus awamori*,
fungo – Rações. 3. Nutrição animal. I. Título.

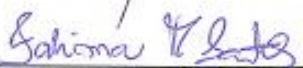
CDU: 636.5

HÉLBER SOUTO MORGADO

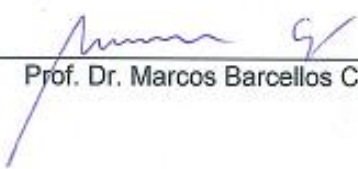
Tese defendida e aprovada em **18/10/2013** pela Banca Examinadora constituída pelos professores:



Prof. Dr. Cirano José Ulhoa
(ORIENTADOR (A))

Profa. Dra. Cristine dos Santos Settimi Cysneiros – JCB/UFG

Profa. Dra. Fabiana Ramos dos Santos - IFGOIANO

Prof. Dr. Paulo Ricardo de Sá da Costa Leite – IFGOIANO

Prof. Dr. Marcos Barcellos Café

DEDICO

À Valdoméria, minha esposa e amiga, meu alicerce, e aos meus filhos Alexandre e João Victor por serem a razão da minha vida e motivo de luta e felicidade.

AGRADECIMENTOS

Aos Professores da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, programa DINTER, pela amizade e ensinamentos.

Aos colegas de turma do curso de Doutorado em Ciência Animal pelo companheirismo e amizade.

Ao prof. Dr. Reginaldo Nassar Ferreira, pela amizade e colaboração.

Aos Servidores Ana Paula Santos Oliveira, Mônica Maria de Almeida Brainer, Paulo Ricardo de Sá Costa Leite, Ronaldo Fabino Neto, Sérgio Cortes Paiva, Waldeliza Fernandes da Cunha e Willian dos Santos Moreira, do IF Goiano - Câmpus Ceres, pela amizade e ajuda na condução dos experimentos.

À Maria Brandão, do Laboratório de Físico-Química Inorgânica do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, pela ajuda na análise das viscosidades das rações e excretas.

Ao Carlos Eduardo Dambros, Técnico do Laboratório de Bromatologia da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, pela ajuda nas análises bromatológicas.

Ao Ashbel Schneider da Silva, Médico Veterinário Residente do Hospital Veterinário da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, pela ajuda na realização das análises hematológicas.

Ao Helton Freires Oliveira, Técnico do Laboratório de Patologia Clínica, da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, pela ajuda na realização das análises hematológicas.

À Rejane Castro, graduanda na Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, pela ajuda nas análises bromatológicas.

Aos alunos Paulo Vitor Divino Xavier de Freitas, Halef Pereira de Oliveira e Luís Henrique Curcino Batista, do curso de Zootecnia do IF Goiano - Câmpus Ceres, pela ajuda na realização dos experimentos de campo.

Aos alunos Camilla Antunes Fonseca, Camila Silva de Carvalho Costa, Daniel Martins de Oliveira, Fernando Camilo Silvério Quintão, Francine Pereira Higino da Costa, Leonardo Guimarães de Oliveira e Marcus Vinícius Pereira Assunção, bolsistas no Laboratório de Fisiologia da Digestão do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, pela amizade e ajuda nos experimentos.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano - Câmpus Ceres e à Universidade Federal de Goiás pela oportunidade e condições materiais para a realização deste trabalho.

À São Salvador Alimentos S/A incubatório Superfrango, pelo fornecimento das aves para experimentação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus, por guiar meus passos, me amparar nos momentos difíceis e me dar forças para superar as dificuldades.

Aos meus pais, Valtorízio (*in memorian*), que Deus levou tão cedo, e Maria que com muito amor me criaram.

Aos meus amados Valdoméria, Alexandre e João Victor pela ajuda, incentivo, motivação e por renovarem minhas forças perante os desafios. Desculpem-me pelos momentos de ausência.

Aos meus filhos, Guilherme e Pedro Lucas, mesmo estando longe, fazem parte de minha vida.

Às minhas irmãs Heloisa e Helainy pelo incentivo e carinho.

Ao Professor Cirano José Ulhôa, pela orientação e amizade, minha eterna gratidão.

Ao Professor José Henrique Stringhini, pelos conselhos nas horas de angústia, pela oportunidade de compartilhar sua amizade e ensinamentos.

Ao professor Cleiton Mateus Sousa pela amizade e a disponibilidade de fazer parte do comitê de orientação.

A Cristine dos Santos Settimi Cysneiros pela amizade, ajuda e ensinamentos. Devo muito a você e sempre serei grato por tudo.

SUMÁRIO

RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv

CAPÍTULO I - CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
--	---

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1	Produção de enzimas fúngicas.....	4
2.1.1	Fermentação em meio líquido.....	6
2.1.2	Fermentação em meio sólido.....	7
2.1.3	Separação e purificação de enzimas.....	10
2.2	Mercado de enzimas.....	11
2.3	Enzimas na alimentação de frango de corte.....	13
2.3.1	Uso de amilase em ração para aves.....	15
2.3.2	Desempenho e metabolizabilidade de nutrientes.....	16
2.3.3	Polissacarídeos não amiláceos.....	20
2.3.4	Viscosidades de rações e de digestas.....	22
2.3.5	Parâmetros hematológicos e bioquímicos de sangue.....	23
2.3.6	Biometria de órgãos digestórios, atividades enzimáticas, conteúdo de proteína e peso absoluto do pâncreas.....	24
	REFERÊNCIAS.....	26

CAPÍTULO II - PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE AMILASE DE <i>Aspergillus awamori</i>	38
--	----

	RESUMO.....	38
	ABSTRACT.....	39
1	INTRODUÇÃO.....	40

2	MATERIAL E MÉTODOS.....	42
2.1	Linhagem do fungo e produção de amilase.....	42
2.2	Dosagem de proteína total.....	43
2.3	Determinação da atividade amilolítica.....	43
2.4	Caracterização bioquímica.....	44
2.4.1	Determinação do pH ótimo.....	44
2.4.2	Determinação da temperatura ótima.....	44
2.4.3	Determinação da termoestabilidade.....	44
2.5	Dosagem de proteína solúvel e de açúcar redutor nas rações.....	44
2.6	Análise estatística.....	46
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
3.1	Dosagem de proteína total e determinação da atividade amilolítica.....	46
3.2	Caracterização bioquímica.....	46
3.3	Dosagem de proteína solúvel e de açúcar redutor nas rações.....	49
4	CONCLUSÕES.....	50
	REFERÊNCIAS.....	50

	CAPÍTULO III - ADIÇÃO DE AMILASE PRODUZIDA POR <i>Aspergillus awamori</i> NAS DIETAS PRÉ-INICIAL E INICIAL DE FRANGOS DE CORTE: desempenho, metabolizabilidade dos nutrientes e viscosidade.....	53
--	--	----

	RESUMO.....	53
	ABSTRACT.....	54
1	INTRODUÇÃO.....	55
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	57
2.1	Procedimentos gerais.....	57
2.1.1	Experimento 1 - Fase pré-inicial.....	58
2.1.2	Experimento 2 - Fase inicial.....	58
2.2	Desempenho.....	59
2.3	Ensaio metabólico.....	60
2.4	Viscosidades das rações e das digestas.....	61
2.5	Análise estatística.....	62

3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
3.1	Desempenho.....	63
3.2	Ensaio metabólico.....	65
3.3	Viscosidades das rações e das digestas.....	67
4	CONCLUSÕES.....	68
	REFERÊNCIAS.....	68

CAPÍTULO IV - ADIÇÃO DE AMILASE DE <i>Aspergillus awamori</i> NA DIETA DE FRANGOS DE CORTE: parâmetros hematológicos e bioquímicos do sangue, biometria dos órgãos digestórios e atividades enzimáticas, conteúdo de proteína e peso absoluto do pâncreas.....		72
--	--	----

	RESUMO.....	72
	ABSTRACT.....	73
1	INTRODUÇÃO.....	74
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	75
2.1	Procedimentos gerais.....	75
2.2	Parâmetros hematológicos e bioquímicos do sangue.....	78
2.3	Biometria dos órgãos digestórios.....	79
2.4	Atividades enzimáticas, conteúdo de proteína e peso absoluto do pâncreas.....	80
2.5	Análise estatística.....	80
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	81
3.1	Parâmetros hematológicos e bioquímicos do sangue.....	81
3.2	Biometria dos órgãos digestórios.....	84
3.3	Atividades enzimáticas, conteúdo de proteína e peso absoluto do pâncreas.....	86
4	CONCLUSÕES.....	88
	REFERÊNCIAS.....	88

CAPÍTULO V - CONSIDERAÇÕES FINAIS.....		92
--	--	----

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1	Peso vivo (kg), idade (mês) e conversão alimentar (kg.kg^{-1}) ao abate de frangos de corte no período de 1930 a 2010.....	1
Figura 2	Etapas de fermentação em meio sólido.....	8
Figura 3	Exportação e importação brasileiras de enzimas industriais de 2007 a 2011.....	12

CAPÍTULO II

Figura 1	<i>Aspergillus awamori</i> em placa de petri (A), métula envolvida por esporos (B - 20x), esporos (C - 40 x) e hifas/esporos (D - 40x).....	40
Figura 2	Atividade relativa (%) de amilase produzida por <i>Aspergillus awamori</i> em função do pH.....	47
Figura 3	Atividade relativa (%) de amilase produzida por <i>Aspergillus awamori</i> em função da temperatura de incubação.....	48
Figura 4	Atividade relativa (%) de amilase produzida por <i>Aspergillus awamori</i> em função do tempo de incubação a 40°C.....	49

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1	Classificação das enzimas em função das reações catalisadas, segundo a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB).....	5
Tabela 2	Principais enzimas utilizadas na alimentação de aves, seus substratos e efeitos.....	14

CAPÍTULO II

Tabela 1	Composição (%) e níveis nutricionais das rações pré-inicial e inicial.....	45
Tabela 2	Concentração de proteína solúvel e de açúcar redutor nas rações pré-inicial e inicial para frangos de corte.....	49

CAPÍTULO III

Tabela 1	Composição (%) e níveis nutricionais das rações pré-inicial e inicial.....	59
Tabela 2	Desempenho dos frangos de corte alimentados com rações suplementadas ou não com amilase de <i>Aspergillus awamori</i> , no período de 1 a 7 dias de criação.....	63
Tabela 3	Desempenho dos frangos de corte alimentados com rações suplementadas ou não com amilase de <i>Aspergillus awamori</i> , no período de 8 a 21 dias de criação.....	64
Tabela 4	Valores (%) dos coeficientes de metabolizabilidade da matéria seca (CMMS), do extrato etéreo (CMEE) e do balanço de nitrogênio (BN) em frangos de corte alimentados com ração contendo ou não amilase de <i>Aspergillus awamori</i> , no período de um a sete dias de criação.....	66

LISTA DE TABELAS - CONTINUAÇÃO

Tabela 5	Valores (%) dos coeficientes de metabolizabilidade da matéria seca (CMMS), do extrato etéreo (CMEE) e do balanço de nitrogênio (BN) em frangos de corte alimentados com ração contendo ou não amilase de <i>Aspergillus awamori</i> , no período de oito a 21 dias de criação.....	66
Tabela 6	Viscosidades (cPs) das rações (Vração) e das digestas (Vdigesta) dos frangos de corte alimentados com rações que receberam ou não amilase produzida por <i>Aspergillus awamori</i> , nas fases pré-inicial e inicial.....	68

CAPÍTULO IV

Tabela 1	Temperatura e umidade médias internas do galpão experimental nos períodos de 1 a 7 e de 8 a 21 dias de criação dos frangos de corte.....	76
Tabela 2	Composição (%) e níveis nutricionais das rações pré-inicial e inicial.....	77
Tabela 3	Parâmetros hematológicos dos frangos de corte alimentados com rações contendo ou não amilase produzida por <i>Aspergillus awamori</i> , aos 21 dias de idade.....	81
Tabela 4	Parâmetros bioquímicos do sangue dos frangos alimentados com rações contendo ou não amilase produzida por <i>Aspergillus awamori</i> , aos 21 dias de idade.....	82
Tabela 5	Pesos relativos (%) do fígado, do pâncreas, dos intestinos, da moela, do pró-ventrículo e comprimento (cm) dos intestinos dos frangos de corte alimentados com rações contendo ou não amilase produzida por <i>Aspergillus awamori</i> , aos sete dias de idade.....	84

LISTA DE TABELAS - CONTINUAÇÃO

Tabela 6	Pesos relativos (%) do fígado, do pâncreas, dos intestinos, da moela, do pró-ventrículo e comprimento (cm) dos intestinos dos frangos de corte alimentados com rações contendo ou não amilase produzida por <i>Aspergillus awamori</i> , aos 21 dias de idade..	85
Tabela 7	Atividades enzimáticas, conteúdo de proteína e peso absoluto do pâncreas dos frangos de corte alimentados com rações pré-inicial e inicial contendo ou não amilase produzida por <i>Aspergillus awamori</i>	87

RESUMO

Os objetivos deste trabalho foram produzir e caracterizar amilase utilizando o fungo *Aspergillus awamori* e avaliar os efeitos da sua suplementação em dietas para frangos de corte. Para isso, produziu-se amilase em meio de cultura contendo milho triturado e farelo de soja como fontes de carbono. A amilase apresentou 100% de atividade em pH 5,6, atividade relativa de 97,6% em 40°C, 88,64% de estabilidade térmica durante 120 minutos e atividade enzimática de 3,66 U.mL⁻¹. Realizou-se dois experimentos, um na fase pré-inicial e outro na inicial, utilizando-se 120 frangos de corte machos em cada experimento, distribuídos em delineamento inteiramente casualizado, com dois tratamentos, seis repetições e 10 aves por unidade experimental, recebendo ração e água à vontade. A adição de amilase na ração pré-inicial aumentou 60,6% a concentração proteica, enquanto que na ração inicial houve redução de 17,6%. A concentração de açúcar redutor aumentou nas rações pré-inicial e inicial com a adição de amilase. A suplementação das dietas com amilase aumentou o consumo da ração, piorou a conversão alimentar e não afetou o consumo de água, o peso final e o ganho de peso na fase pré-inicial. Já na inicial, reduziu o consumo de água e os demais parâmetros de desempenho não foram afetados. A adição de amilase nas rações diminuiu o balanço de nitrogênio na fase pré-inicial; reduziu a metabolizabilidade da matéria seca, do extrato etéreo e o balanço de nitrogênio. As viscosidades das rações pré-inicial e inicial e das digestas dos frangos de corte não foram afetadas pela suplementação enzimática. A aplicação de amilase nas dietas não afetou os parâmetros hematológicos e bioquímicos do sangue, a biometria do trato gastrointestinal, as atividades enzimáticas, o conteúdo de proteína e o peso absoluto do pâncreas. Entretanto, reduziu a atividade de amilase e o conteúdo de proteína no pâncreas, no período de oito a 21 dias de criação das aves. Não se recomenda a adição de amilase produzida por *Aspergillus awamori* em rações pré-inicial e inicial para frangos de corte.

Palavras-chave: desempenho, digestibilidade, enzimas, frango de corte, sangue

ABSTRACT

The objectives of this study were to produce and characterize amylase using *Aspergillus awamori* and to assess the effects of its addition to diets for broilers. Amylase was produced in a culture medium containing ground corn and soybean meal as carbon sources. Amylase showed 100% activity at pH 5.6, 97.6% relative activity at 40°C, 88.64% thermal stability for 120 minutes and enzymatic activity of 3.66 U.mL⁻¹. We conducted two experiments, at different times, one in the pre-starter and another one in the starter phase, using 120 male broiler chicks in each experiment, distributed in a completely randomized design with two treatments and six replicates with ten broiler chicks per experimental unit, receiving food and water *ad libitum*. The addition of amylase to the pre-starter diet increased the protein concentration in 60.6%, while the addition to the starter ration reduced it in 17.6%. The concentration of reducing sugar in the two diets increased with the use of amylase. Supplementation of diets with amylase increased feed intake, decreased feed conversion and did not affect water consumption, final weight and weight gain in pre-starter phase. In the starter phase, it reduced water consumption but did not affect other performance parameters. The addition of amylase to the diet in the pre-starter phase decreased nitrogen balance, reduced metabolization of dry matter, ether extract and nitrogen balance. The viscosity of pre-starter and starter diets and of the digesta of broilers was not affected by enzyme supplementation. The addition of amylase to the diets did not affect the hematological and biochemical parameters of blood, the biometrics of the gastrointestinal tract, enzyme activities, protein content and pancreas absolute weight; however, it reduced amylase activity and protein content in the pancreas, within eight to 21 days. We do not recommend the addition of amylase produced by *Aspergillus awamori* to pre-starter and starter diets for broilers.

Keywords: blood, broilers, digestibility, enzymes, performance

CAPÍTULO I

CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 INTRODUÇÃO

A avicultura brasileira alcançou níveis de produtividade e organização que a coloca como uma das mais competitivas do mundo (TURRA, 2009). Em vista disso, a produção de carne de frango aumentou 8% anualmente, desde 2000 (MENDES, 2010). Em 2013, a avicultura de corte produzirá cerca de 13 milhões de toneladas de carne, fazendo do país o maior exportador mundial (ZANNI, 2013).

A tecnologia tem papel importante nesse contexto, visto que proporcionou aumento de cerca de 70% no peso, redução de aproximadamente 60% na idade ao abate e melhoria de 55% na conversão alimentar de frangos de corte, desde 1930 (FIGURA 1). Esses avanços são atribuídos às melhorias no manejo, no ambiente, nas instalações, na nutrição, na sanidade e, principalmente, no melhoramento genético das linhagens de aves de corte (MENDES, 2010).

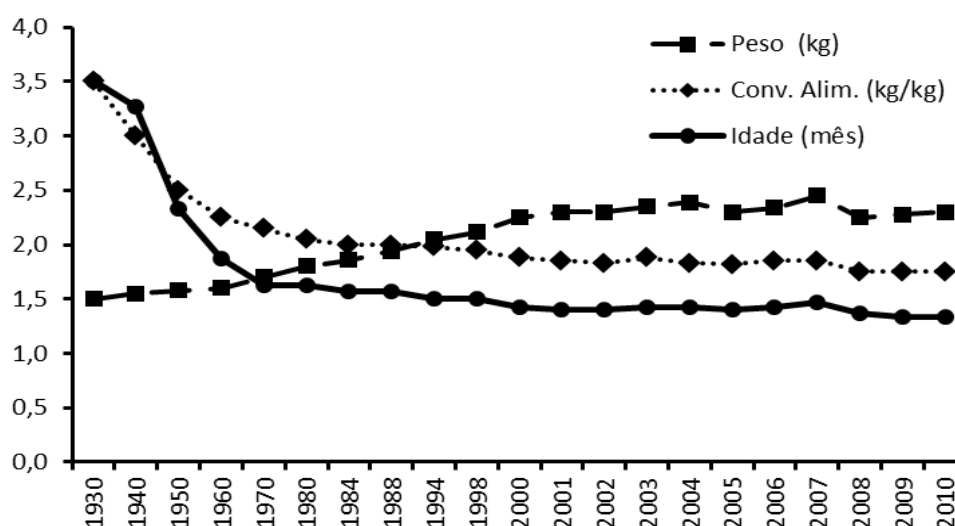


FIGURA 1 - Peso vivo (kg), idade (mês) e conversão alimentar (kg.kg^{-1}) ao abate de frangos de corte no período de 1930 a 2010

Fonte: MENDES, 2010 - adaptado

A utilização de modernos aditivos na produção avícola, advindos da biotecnologia, é essencial, pois pode aumentar a produtividade dos animais e/ou reduzir os custos de produção (ARAÚJO et al., 2007). Dentre esses, destacam-se as enzimas exógenas, das quais cerca de duas mil são conhecidas, tanto do ponto de vista funcional como estrutural (MONTEIRO & SILVA, 2009).

Enzimas são proteínas globulares, de origem biológica, formadas por cadeias de aminoácidos que reagem com substratos específicos, em tempo definido, dependendo das condições de temperatura, pH e umidade, acelerando a velocidade das reações químicas, transformando nutrientes em energia e material celular (NELSON & COX, 2011).

Ao completar o ciclo da reação, a molécula de enzima pode manter a atividade biológica, voltando a atuar em outra reação da mesma forma, por isso, as quantidades de enzimas necessárias para incorporação a um substrato são muito pequenas (LIMA, 2005).

As enzimas exógenas podem ser obtidas de animais, de vegetais e de micro-organismos. Entretanto, essas substâncias podem ser produzidas industrialmente em laboratórios especializados utilizando fermentação fúngica ou bacteriana (LIMA et al., 2002).

Na fermentação fúngica, os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma* são os mais utilizados. Esses fungos se caracterizam pela alta produção de enzimas, pelo menor custo e pela maior variabilidade e estabilidade das enzimas (COSTA et al., 2004).

Muitas espécies de *Aspergillus* são descritas na literatura como *Aspergillus niveus*, *A. flavus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. versicolor* e *Aspergillus awamori*. Esses micro-organismos produzem várias enzimas extracelulares que são aplicadas na biotecnologia, principalmente amilase, fitase, protease e celulase (WAINWRIGHT, 1995; CUI et al., 1998; SOUZA-MOTTA et al., 2005).

O uso dessas enzimas em dietas para aves pode aumentar a disponibilidade de nutrientes para os animais (CLEÓPHAS et al., 1995), diminuindo a sua presença nas excretas, reduzindo o impacto ambiental (CAIRES et al., 2008; MONTEIRO & SILVA, 2009).

A amilase utilizada na alimentação de frangos de corte complementa a produção endógena e melhora a degradação do amido, pois atua na hidrólise desse carboidrato (PAQUET et al., 1991; CLEÓPHAS et al., 1995), produzindo moléculas de cadeia curta, tais como dextrinas, maltopentose, maltotriose, maltose e finalmente glicose (CRUEGER & CRUEGER, 1984). Com isso, a suplementação enzimática das rações à base de milho e farelo de soja pode favorecer o desempenho das aves (MINAFRA, 2007).

Alguns trabalhos científicos apresentam resultados desejados com o uso de enzimas em dietas para aves (LEITE et al., 2008; CARVALHO et al., 2009;); outros não têm conseguido comprovar a eficiência da suplementação enzimática (HAJATI, 2010; OPALINSKI et al., 2010; CARDOSO et al., 2011; BARBOSA et al., 2012). Há também estudos em que alguns parâmetros de desempenho ou de metabolizabilidade de nutrientes são afetados pelo uso dessas substâncias (PUCCI, et al., 2010; VALLE et al., 2010; ISMAIL et al., 2011; OPALINSKI et al., 2011; FORTES et al., 2012; LEITE et al., 2012).

Diante do exposto, com este trabalho, objetivou-se produzir e caracterizar amilase, utilizando o fungo *Aspergillus awamori*, e avaliar os efeitos da sua aplicação em dietas para frangos de corte.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Produção de enzimas fúngicas

O homem explora involuntariamente, desde a antiguidade, as enzimas encontradas na natureza para produzir alimentos, bebidas, artefatos em couro e tecidos. Esses processos envolviam enzimas produzidas por micro-organismos de crescimento espontâneo ou presentes em preparações com “rúmen de bezerros” ou mamão (KIRK et al., 2002).

As enzimas produzidas comercialmente são provenientes de fermentações que utilizam, geralmente, fungos ou bactérias (FIREMAN & FIREMAN, 1998). Nesses processos, os fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Trichoderma* são os mais utilizados, por apresentarem alta produtividade, menor custo de produção e maior variabilidade e estabilidade (BEAUCHEMIN et al., 1998; FIREMAN & FIREMAN, 1998; COSTA et al., 2004).

A identificação de novas enzimas e a evolução da biotecnologia promoveu o desenvolvimento da produção, permitindo sua introdução em processos e produtos industriais (MONTEIRO & SILVA, 2009; ZIMMER et al., 2009). As enzimas foram classificadas pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) de acordo com as reações que catalisam (Tabela 1).

As enzimas microbianas podem ser obtidas industrialmente utilizando fermentação em meio líquido ou sólido (FELLOWS, 1994; RAIMBAULT, 1998; LIMA et al., 2002). As características desejáveis na produção de enzimas são: atividade específica, altos níveis de resistência à inativação por temperatura e pH, segurança toxicológica, baixo custo de produção, ausência de interações com a matriz do alimento para facilitar a determinação quantitativa de enzima nas dietas e especificidade em promover os efeitos esperados (LIMA, 2005).

TABELA 1 - Classificação das enzimas em função das reações catalisadas, segundo a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB)

Classe	Subclasse	Reação catalisada
Oxirredutase	Desidrogenase, Oxidase, Peroxidase, Hidrogenase	Oxidação-redução e remoção ou adição de átomos de hidrogênio
Transferase	Metiltransferase, Transaminase	Transferência de grupos tais como: aldeídos, cetonas etc.
Hidrolase	Carboidrase, Esterase, Lipase, Fosfatase, Protease	Hidrólise e formação de glicosídeos, anidridos, ésteres, amidas, peptídeos e outras funções com ligações C-N
Liase	Descarboxilase, Cetoacidólise, Hidratase	Adição, usualmente de HX, a duplas ligações como: C=C, C=N, e C=O, e também os processos reversos
Isomerase	Racemase, Mutase, Isomerase	Transferência de grupos na mesma molécula para formar isômeros
Ligase	Sintetase	Formação ou clivagem de ligações C-S, C-N e ésteres de fosfato

Fonte: NELSON & COX (2011) - adaptado

O uso da tecnologia do DNA recombinante melhora os processos de produção, permitindo a comercialização de enzimas que anteriormente não podiam ser produzidas. Além disso, o avanço da biotecnologia e a contribuição de novas áreas da biologia são importantes para a utilização de micro-organismos em escala industrial e o desenvolvimento de processos mais eficazes (MONTEIRO & SILVA, 2009).

A tecnologia enzimática poderá ajudar as indústrias de alimentos a enfrentarem desafios, principalmente em relação a projetos que garantam a segurança dos aditivos utilizados nas dietas dos animais (BEILEN & LI, 2002; KIRK et al., 2002), em conformidade com o Código Internacional de Boas Práticas na Alimentação Animal (PARIZA & COOK, 2010). Além disso, é necessário verificar em que condições e dimensões essas substâncias são realmente viáveis (ARAÚJO et al., 2007).

2.1.1 Fermentação em meio líquido

As fermentações em meio líquido ou submersas são responsáveis por aproximadamente 90% das enzimas produzidas industrialmente (HÖLKER et al., 2004). Nesses processos se empregam normalmente açúcares simples, amido e dextrinas como fonte de carbono para os micro-organismos (GUIMARÃES et al., 2006; SONI & KHIRE, 2007).

Segundo VATS & BANERJEE (2004), o uso de fungos filamentosos nesse sistema pode causar problemas, pois seu crescimento provoca aumento na viscosidade dos caldos durante a fermentação, afetando a mistura e, no caso das fermentações aeróbicas, podem ocorrer problemas com a oxigenação do meio de cultivo.

Uma das vantagens mais importantes da fermentação submersa é a facilidade de manuseio das vazões líquidas de alimentação e esvaziamento do reator. Entretanto, o maior inconveniente desse método é a manipulação de maiores volumes de líquido, tornando mais agressivo o processo com relação ao meio ambiente, pois, no mínimo, 96% da carga inicial é descartada como efluente (FERNÁNDEZ, 2009).

LI et al. (2006) investigaram o efeito do pH, da concentração do substrato e do tempo de incubação de *Aspergillus awamori* visando a produção de xilanase, em meio de cultivo composto por glicose, NH_4Cl , KH_2PO_4 , NaNO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e extrato de levedura. Esses autores verificaram que a utilização de $49,3 \text{ g.L}^{-1}$ de farelo de trigo, pH 4,14 e 103,7 horas de incubação promoveu a atividade enzimática máxima de $28,2 \text{ U.mL}^{-1}$.

A produção de amilase obtida de *Aspergillus awamori*, isolado de solo, foi avaliada por PRAKASHAM et al. (2007) e concluíram que a atividade máxima de 738 U.mL^{-1} foi conseguida em meio contendo 3% de amido solúvel, 0,5% de milhocina, 0,125% de KH_2PO_4 , 0,125% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,5% de caseína, pH 4,0 e temperatura de 31°C .

KANAUCHI et al. (2008) estudaram a enzima esterase produzida por quatro espécies de *Aspergillus* e observaram que o *Aspergillus awamori* “strain G2” produziu enzima com a maior atividade, 394 U.mL^{-1} , em pH 5,0 e temperatura ótima de 40°C .

A caracterização de amilase produzida por *Aspergillus awamori*, em meio de cultura com farelo de trigo, período de incubação de 96 horas e temperatura de 37°C, foi realizada por NEGI & BANERJEE (2009). Esses pesquisadores verificaram que a enzima foi estável em pH de 3 a 9 e em temperatura de 25 a 70°C. Além disso, a maior atividade da enzima, 140 U.mL⁻¹, ocorreu em pH 4 e temperatura de 70°C.

GUPTA et al. (2010) avaliaram α -amilase produzida por *Aspergillus niger* e concluíram que a atividade máxima da enzima, 48,8 U.mL⁻¹, foi obtida em meio contendo 0.5% de amido, 0.03% de peptona, 0.02% de tween-80, pH 5, temperatura de 35°C e com cinco dias de incubação.

2.1.2 Fermentação em meio sólido

A fermentação em meio sólido é o processo no qual ocorre o crescimento de micro-organismos em substratos sólidos sem a presença de água na forma livre. A água presente nesse sistema encontra-se ligada a uma matriz sólida, formando uma fina camada na superfície das partículas (RAIMBAULT, 1998).

Segundo VINIEGRA-GONZÁLEZ (1997) é um processo microbiano que acontece normalmente na superfície de materiais sólidos que tem a propriedade de absorver ou conter água, com ou sem nutrientes solúveis. Essa definição compreende processos em que o suporte sólido é inerte e os substratos utilizados pelos micro-organismos podem ser substâncias solúveis em água.

A fermentação em meio sólido apresenta as seguintes características: a fase sólida atua como fonte de carbono, nitrogênio e demais componentes, além de servir como suporte para o crescimento das células microbianas; o ar, necessário ao desenvolvimento microbiano, deve atravessar os espaços vazios do meio a pressões relativamente baixas; o substrato não deve apresentar aglomeração das suas partículas individuais; o crescimento microbiano ocorre em condições mais próximas às dos seus habitats; o meio apresenta alta heterogeneidade e os substratos não estão completamente acessíveis ao micro-organismo (PINTO et al., 2005).

Os fungos filamentosos são os micro-organismos mais adaptáveis à fermentação em meio sólido, pois são capazes de crescerem com umidade baixa, além de desenvolverem por meio de hifas, o que facilita a colonização do substrato (DURAND, 2003; HÖLKER et al., 2004).

Os estudos das fermentações em meio sólido estão focados na utilização de meios de cultivo a partir de resíduos agroindustriais e no desenvolvimento e monitoramento desses processos (PANDEY et al., 2001) e, de acordo com COSTA et al. (2007), a utilização desses produtos é uma forma de utilizar substratos alternativos, resolver os transtornos causados pela poluição ambiental nas indústrias e de custo na produção de enzimas.

De acordo com RAIMBAULT (1998) e PRABHAKAR et al. (2005), a metodologia empregada no processo de fermentação em meio sólido é geralmente simples (Figura 2).

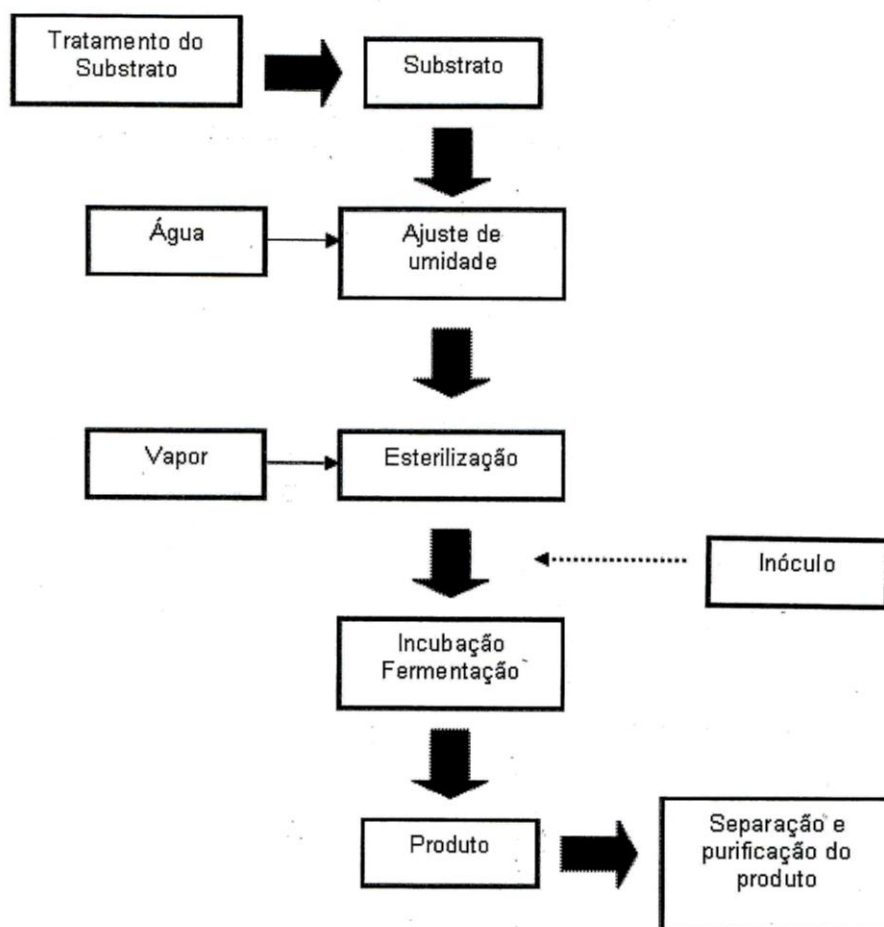


FIGURA 2 - Etapas de fermentação em meio sólido

Fonte: SANTOS et al. 2006 - adaptado

SANTOS et al. (2008) estudaram a produção de poligalacturonase, através da fermentação em meio sólido, usando o fungo *Aspergillus niger* e resíduo do pedúnculo de caju seco como substrato. Observaram, também, que a melhor condição para a produção dessa enzima foi umidade de 40%, atingindo-se atividade da poligalacturonase de 16 U.g^{-1} com 30 horas de fermentação.

A produção de amilase, utilizando *Aspergillus awamori* e torta de babaçu como substrato, foi avaliada por CASTRO & PEREIRA JR. (2010). Esses autores verificaram que o tempo de fermentação mais adequado foi de 144 horas, quando a atividade foi de $40,5 \text{ U.g}^{-1}$.

NEGI & BANERJEE (2010) estudaram a produção concomitante de amilase e protease por *Aspergillus awamori* e observaram que o farelo de trigo foi um bom substrato para a produção dessas enzimas. Além disso, as atividades máximas foram de $4528,4 \text{ U.mL}^{-1}$ para amilase e $250,4 \text{ U.mL}^{-1}$ para protease, alcançadas com 96 horas de incubação, 35°C de temperatura, pH 5,5 e 85% de umidade.

Em outra pesquisa, conduzida por SOUZA et al. (2010), foi avaliada a enzima poligalacturonase produzida por *Aspergillus niger* em resíduo seco da casca e do albedo do maracujá. A atividade máxima da enzima foi de $20,9 \text{ U.g}^{-1}$, com 66 horas de processo e 40% de umidade inicial. Essa mesma enzima foi estudada por ABBASI et al. (2011), utilizando o fungo *Aspergillus awamori* como inóculo e farinha de trigo como substrato. Esses pesquisadores observaram que as atividades máximas foram de $1,2 \text{ U.mL}^{-1}$ e $0,014 \text{ U.mL}^{-1}$ para exo e endo-poligalacturonases, respectivamente.

A influência do pH inicial, do tempo de cultivo, do tipo de bagaço de cana-de-açúcar e da espécie de *Aspergillus* foi estudada por SALES et al. (2010) na produção de celulasas e xilanase. A espécie *Aspergillus aculeatus* URM 4953, que produziu a celulase e a xilanase simultaneamente, o pH 6,0, o tempo de cultivo de 168 horas e o bagaço de cana-de-açúcar residual como substrato foram as melhores condições para produção dessas enzimas. Além disso, as maiores atividades enzimáticas foram $0,45 \text{ U.mL}^{-1}$ de celulase total e $30,05 \text{ U.mL}^{-1}$ de xilanase.

SANTOS et al. (2011) verificaram o efeito de fermentação e do teor de água sobre a atividade cinética de celulases produzidas por *Rhizopus* sp., usando palma forrageira como substrato e temperatura de 30°C. Esses pesquisadores observaram que a máxima atividade de carboximetilcelulase (CMCase) foi 5,7 U.mL⁻¹ a 0,949 de atividade de água em 96 horas, enquanto que para a celulase total (FPase) foi 8,7 U.mL⁻¹ a 0,993 de atividade de água em 72 horas.

Outro estudo visando a avaliação da produção de celulases foi realizado por BANSAL et al. (2012). Nesse trabalho foi inoculado *Aspergillus niger* em resíduos agrícolas e de cozinha. Os autores observaram que após 96 horas de incubação os valores de CMCase, FPase e β -glucosidase foram de 310, 17 e 33 U.g⁻¹ de substrato seco, respectivamente.

2.1.3 Separação e purificação de enzimas

Após a fermentação é importante conhecer os processos de separação e purificação das enzimas. NELSON & COX (2011) relatam que existem diversos métodos que podem ser utilizados para a separação de proteínas e classifica-os em processos baseados:

- a) no peso molecular: diálise e ultrafiltração, centrifugação em gradiente de densidade e cromatografia de exclusão molecular;
- b) nas diferenças de solubilidade: precipitação isoelétrica, solubilização e/ou precipitação das proteínas por salificação e fracionamento por solventes;
- c) na carga elétrica da molécula;
- d) na adsorção seletiva; e
- e) na especificidade de ligantes: cromatografia por afinidade.

Nessa mesma direção, FELLOWS (1994) relatou que as enzimas podem ser recuperadas do meio de cultivo por centrifugação, filtração, precipitação fracionada, separação cromatográfica, separação por membranas, liofilização ou pela combinação dessas técnicas. Segundo o mesmo autor, o êxito da produção industrial de enzimas depende do grau em que a atividade dos micro-organismos é alcançada e quanto se reduz nos custos do substrato, da incubação e da recuperação da enzima.

Segundo NELSON & COX (2011), os processos de purificação requerem métodos para a quantificação ou a avaliação da proteína de interesse na presença de outras proteínas e que a purificação pode ser monitorada pelo número de unidades de enzima por miligrama de proteína total.

Visando a separação de celulase e xilanase produzidas utilizando bagaço de cana como substrato e espécies de *Aspergillus*, SALLES et al. (2010) utilizaram centrifugação. Esse mesmo método foi utilizado por SANTOS et al. (2011) quando extraíram celulasas produzidas por *Rhizopus* sp. sobre palma forrageira.

SOUZA et al. (2010) extraíram poligalacturonase produzida por *Aspergillus niger* em meio de cultura contendo resíduo de maracujá, utilizando filtração em algodão hidrófobo de uso farmacêutico.

A enzima protease, obtida de *Aspergillus niger*, foi separada do extrato enzimático utilizando filtração e centrifugação, quando BENAZIR et al. (2011) compararam meios de fermentação líquido e sólido para a produção dessa enzima.

2.2 Mercado de enzimas

A produção de bens ou produtos consumidos pelo homem envolve, na sua maioria, reações químicas. A velocidade com que muitas dessas reações ocorrem depende da presença de catalisadores químicos. Esses, ao longo das últimas quatro décadas, foram substituídos por enzimas, graças à evolução da biotecnologia e por serem ecologicamente mais viáveis (KIRK et al., 2002).

De acordo com MONTEIRO & SILVA (2009), o mercado de enzimas está dividido em industriais, que incluem as técnicas, as utilizadas em alimentos, em ração animais e as especiais, que são destinadas para fins terapêuticos, diagnóstico, química quiral e pesquisa.

O mercado mundial de enzimas industriais, que representa cerca de 60% do setor, movimentou aproximadamente 3,5 bilhões de dólares em 2011 (MONTEIRO & SILVA, 2009). Desse montante, 1,3 bilhão foi de enzimas técnicas, 1,0 bilhão de enzimas utilizadas em alimentos e bebidas e 1,2 bilhão de enzimas

utilizadas na fabricação de outros produtos (LI et al., 2012). As previsões para 2015 são que o mercado de enzimas industriais movimentará cerca de 8,0 bilhões de dólares (SARROUH et al., 2012).

Em 2015, do ponto de vista regional, os maiores aumentos estarão nos mercados da América Central e do Sul, na África e no Oriente Médio. A região da Ásia e Pacífico também passará por um rápido aumento da demanda devido à força da China e da Índia. A demanda abaixo da média ocorrerá na América do Norte e Europa Ocidental. Nessas, o consumo de enzimas será travado pelo impacto da crise da dívida pública europeia (ZIGGERS, 2012).

O mercado brasileiro de enzimas foi estimado no ano de 2011 em cerca de 200 milhões de dólares. As importações foram de US\$ 119 milhões enquanto que as exportações chegaram a US\$ 52 milhões (MDIC, 2012). De 2007 a 2011 as importações triplicaram, enquanto que as exportações cresceram moderadamente (Figura 3).

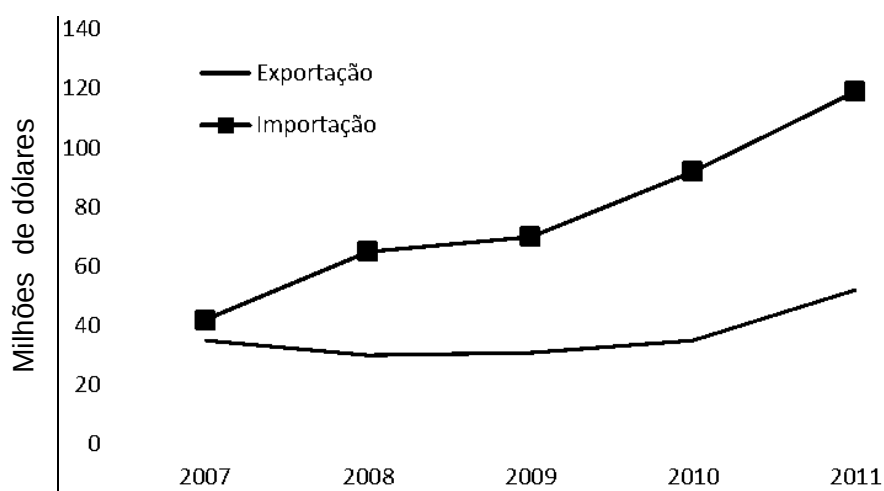


FIGURA 3 - Exportação e importação brasileira de enzimas industriais de 2007 a 2011

Fonte: MDIC (2012)

Assim, o Brasil é um país essencialmente importador de enzimas industriais. Nesse sentido, com o Decreto 6041/2007, que instituiu a Política de Desenvolvimento da Biotecnologia - PDB, inclui a produção e o uso industrial de enzimas (BON et al., 2008; MDIC, 2012), o Governo Federal tentou reverter essa situação. Entretanto, observando a Figura 3, pouco mudou até 2011.

2.3 Enzimas na alimentação de frangos de corte

A cadeia produtiva de frangos de corte no Brasil evoluiu em consequência do melhoramento genético e dos avanços nas áreas de nutrição, sanidade e manejo (MENDES, 2010). Nesse contexto, a indústria da avicultura demandará cerca de 60% da quantidade produzida de rações no país (ZANNI, 2013).

As rações para frangos de corte produzidas no Brasil são constituídas de alimentos de origem vegetal, principalmente milho e farelo de soja. A utilização dos nutrientes do milho e da soja pelas aves é considerada alta, mas nem todo conteúdo nutricional desses ingredientes é aproveitado em sua totalidade. Esses alimentos podem apresentar em sua composição substâncias antinutricionais como, por exemplo, os polissacarídeos não amiláceos - PNAs (CARDOSO, 2011).

Em relação aos PNAs, TAVERNARI et al. (2008) relataram que o milho e o farelo de soja apresentam cerca de 8 e 30%, respectivamente. Além disso, outros fatores antinutricionais como inibidores de proteases e lectinas podem estar presentes no farelo de soja e não serem degradados pelo sistema digestório das aves (CAMPESTRINI, 2005).

Segundo BRITO et al. (2008) os PNAs compreendem uma ampla classes de polissacarídeos como celulose, hemicelulose, quitina e pectinas que estão presentes na parede celular de alimentos de origem vegetal e que quando incluídos nas dietas modificam a metabolizabilidade de nutrientes, o tempo de permanência e a viscosidade no trato digestório dos animais.

Esses polissacarídeos e os outros componentes das dietas podem ser digeridos com mais eficiência com a inclusão de enzimas exógenas nas rações (Tabela 2), aumentando a metabolizabilidade dos nutrientes (CARDOSO et al., 2011; FORTES et al., 2012), diminuindo a viscosidade da digesta (GRAHAM, 1996) e a presença de nutrientes nas excretas (COSTA et al., 2004), resultando em melhorias na qualidade do meio ambiente (LIMA et al., 2007).

TABELA 2 - Principais enzimas utilizadas na alimentação de aves, seus substratos e efeitos

Enzima	Substrato	Efeitos
Amilase	Amido	Suplementação das enzimas endógenas e degradação mais eficiente do amido
Celulase	Celulose	Degradação de celulose e liberação de nutrientes
Fitase	Ácido fítico	Melhor utilização do fósforo dos vegetais e degradação do ácido fítico
Galactosidase	Galactosídios	Remoção de galactosídeos
Glucanase	β -glucanos	Redução da viscosidade da ração e menor umidade da cama
Lipase	Lipídios e ácidos graxos	Melhor utilização de gorduras animais e vegetais
Pectinase	Pectinas	Redução da viscosidade da ração
Protease	Proteínas	Suplementação das enzimas endógenas e degradação mais eficiente de proteínas
Xilanase	Arabinoxilanos	Redução da viscosidade da ração

Fonte: CLEÓPHAS et al. (1995) - adaptado

A idade da ave que se alimenta de ração formulada com enzimas deve ser levada em questão (CARDOSO et al., 2011), pois a sua capacidade digestiva está relacionada com o tempo de contato do trato gastrointestinal com o alimento (UNI et al., 1998). Durante as primeiras semanas de vida das aves a atividade enzimática e o desenvolvimento fisiológico não estão totalmente consolidados, embora algumas enzimas já estejam presentes antes da eclosão do ovo. Dessa forma, as aves já nasceriam com uma quantidade enzimática mínima e elevaria sua capacidade digestiva com o decorrer do tempo (LONGO, 2003).

A mudança de nutrientes fornecidos às aves na fase pré-inicial, que passam de proteínas e gorduras do saco vitelino para uma dieta composta basicamente por carboidratos, parece ser o maior desafio da nutrição, considerando-se a metabolizabilidade de nutrientes (LONGO et al., 2005). Além

disso, os pintos, logo após a eclosão, não dispõem de enzimas suficientes para digerirem glicídios e lipídios (MORAN JR., 1985). Assim, o uso de enzimas exógenas nesse período de vida das aves pode melhorar a utilização de nutrientes das rações.

2.3.1 Uso de amilase em ração para aves

As enzimas são classificadas de acordo com o substrato sobre o qual atuam, portanto, o termo amilase indica a ação sobre o amido (HARGER, 1982). Este polissacarídeo é encontrado principalmente em sementes de cereais como milho, cevada, trigo e arroz e em tubérculos ou raízes como batata e mandioca (MORAES, 2004) e possui em sua constituição amilose (25%) e amilopectina (75%). A amilose é um polímero linear constituído de cerca de 6000 resíduos de glicose unidos por ligações glicosídicas do tipo α -1,4, enquanto que a amilopectina consiste de pequenas cadeias laterais de 15 a 45 resíduos unidos por ligações do tipo α -1,6 (BULÉON et al., 1998).

Essa enzima pode ser dividida em três grupos: as α -amilases, as quais rompem as ligações no interior do substrato; as β -amilases, que hidrolisam unidades das extremidades não redutoras do substrato; e as amiloglucosidases (glucoamilases), que liberam unidades de glicose do terminal não-redutor das moléculas do substrato (REED, 1975).

GUPTA et al. (2003) propôs outra separação das amilases, onde são descritos dois grupos, as endoamilases e exoamilases. As endoamilases catalisam as hidrólises de forma aleatória no interior da molécula de amido. Essa ação causa a formação de ramos lineares de oligossacarídeos de cadeias de vários comprimentos. As exoamilases hidrolisam a partir das extremidades não-redutoras da cadeia resultando em produtos finais pequenos.

Além dos grupos propostos por REED (1975) e GUPTA et al. (2003), MORAIS (2004) relata mais dois, as amilases desramificadoras e as transferases. As desramificadoras hidrolisam somente ligações α -1,6 e as transferases são conversoras ou modificadoras de amido, que clivam ligações glicosídicas α -1,4 da

molécula doadora e transferem parte do doador para um acceptor glicosídico com a formação de uma nova ligação glicosídica.

A amilase pode ser derivada de diversas fontes, incluindo plantas, animais e micro-organismos. As microbianas geralmente têm alta demanda industrial e grandes quantidades estão disponíveis comercialmente, podendo ser aplicadas nas indústrias alimentícia, têxtil, farmacêutica e de ração animal (SPIER, 2005).

Em dietas para frangos de corte, a amilase exógena complementa quantitativamente as enzimas endógenas desses monogástricos (FISCHER et al., 2002; CAMPESTRINI et al., 2005). Além disso, segundo MINAFRA (2007), pesquisas têm mostrado que a adição de amilase em rações à base de milho e farelo de soja pode melhorar o desempenho das aves.

2.3.2 Desempenho e metabolizabilidade de nutrientes

Na busca pela utilização mais eficiente dos nutrientes das dietas à base de milho e farelo de soja, o uso de aditivos nas rações, principalmente enzimas, tem sido empregado como uma alternativa viável na avicultura (BARBOSA, 2012). As enzimas podem melhorar o desempenho dos animais por atuarem no aumento da metabolizabilidade dos nutrientes e na diminuição da excreção de minerais (FISCHER et al., 2002).

As enzimas podem ser adicionadas nas dietas de aves com os objetivos de complementar quantitativamente a atividade enzimática endógena do trato gastrointestinal e/ou atuar como fonte de determinada enzima devido à sua não produção natural pelo organismo animal (MINAFRA, 2007). Desse modo, a inclusão de enzimas exógenas em dietas para aves reduz a necessidade de síntese endógena, o que disponibiliza maior quantidade de aminoácidos para a síntese proteica (ZANELLA et al., 1999).

De acordo com GUENTER (1997), as principais funções da suplementação enzimática são: 1) remover ou destruir fatores antinutricionais dos grãos; 2) potencializar a ação de enzimas endógenas; 3) aumentar a

metabolizabilidade de nutrientes das dietas e, 4) diminuir a poluição ambiental causada pelo excesso de nutrientes excretados.

O efeito da adição de amilase, protease e xilanase em rações à base de milho, farelo de soja, milheto e sorgo nos parâmetros de desempenho de frangos de corte, criados no período de oito a 21 dias de idade, foi estudado por STRADA et al. (2005). Esses autores verificaram que o consumo de ração, o ganho de peso e a conversão alimentar não foram afetados pela suplementação enzimática.

MINAFRA (2007) estudou o efeito da suplementação da ração de frango de corte, de um a 21 dias de idade, com extratos contendo amilase produzida por *Cryptococcus flavus* e *Aspergillus niger* e verificou melhora na metabolizabilidade dos nutrientes. No entanto, a adição de enzimas reduziu a atividade de amilase pancreática, o peso dos órgãos e não afetou o desempenho, as viscosidades das rações e das digestas e a produção de enzima solúvel na ração.

CARVALHO et al. (2009) ao trabalharem com carboidrases, em rações fareladas para frangos de corte, concluíram que a inclusão das enzimas aumentou o ganho de peso na fase inicial (um a 21 dias de idade). Além disso, verificaram que a eficiência da suplementação enzimática depende da idade e do sexo da ave.

O efeito da suplementação das dietas com complexo enzimático (xilanase, β -glucanase, mannanase, pectinase e protease) e da granulometria da soja integral desativada no desempenho de frangos de corte foi avaliado por OPALINSKI et al. (2010), os quais verificaram que as enzimas não afetaram o consumo de ração, o ganho de peso e a conversão alimentar no período inicial de criação.

PUCCI et al. (2010) estudaram os efeitos da forma física da ração e do uso de amilase, celulase e protease em dietas à base de milho e farelo de soja no desempenho de frangos de corte no período de oito a 21 dias de criação. Observaram, também, que o uso do composto enzimático não influenciou o ganho de peso e o consumo de ração, independentemente da forma do alimento. Entretanto, a conversão alimentar melhorou com a inclusão das enzimas.

A eficiência da adição de complexo enzimático (xilanase, amilase, protease e fitase) em dietas sobre o desempenho de frangos de corte na fase de um a 21 dias de criação foi avaliada por BARBOSA et al. (2012). Esses autores verificaram que, em dietas com níveis nutricionais adequados, a suplementação enzimática não afetou o desempenho das aves.

LEITE et al. (2012) estudaram os efeitos da suplementação com complexo enzimático comercial (amilase, pectinase, betaglucanase, pentosanase, celulase, protease e fitase), em rações contendo milho ou sorgo sobre o desempenho de frangos e relataram que a adição de enzimas na ração pré-inicial, formulada com sorgo, melhorou a conversão alimentar. Já o peso final, o ganho de peso, a conversão alimentar e o consumo de ração não foram influenciados pela adição das enzimas nas dietas com sorgo ou com milho, no período total de criação.

Com o intuito de avaliar o resultado da ação de complexo enzimático, composto por xilanase, β -glucanase, α -amilase, protease, celulase, hemicelulase e α -galactosidase, obtido de *Aspergillus niger*, sobre o desempenho de frangos de corte, HAJATI (2010) conduziu experimento com pintos Cobb 500, não sexados, alimentados com dieta à base de milho e farelo de soja e verificou que as enzimas não afetaram o ganho de peso, o consumo de ração e a conversão alimentar das aves no período de um a 28 dias de criação.

CARDOSO et al. (2011) avaliaram os efeitos da suplementação com amilase isolada e em associação com complexo enzimático, em rações para frangos de corte, fêmeas, da linhagem Cobb, no desempenho das aves e observaram que o consumo de ração, o ganho de peso e a conversão alimentar não foram influenciados pela inclusão na dieta da amilase isolada e nem associada ao complexo. Numericamente, a presença da enzima nos alimentos, na fase de um a 21 dias de criação das aves, provocou redução de 0,6% no consumo de ração, 1,3% no ganho de peso e piorou a conversão alimentar em 0,7%.

A suplementação com complexo enzimático composto por α -amilase e β -xilanase em rações à base de milho e farelo de soja, com diferentes níveis de energia, para frangos de corte, da linhagem Hubbard, não sexados, foi estudada por YOUSSEF et al. (2011). Esses pesquisadores verificaram que as enzimas não

afetaram o ganho de peso e a conversão alimentar no período de 14 a 23 dias de criação. Entretanto, numericamente, o consumo de ração diminuiu cerca de 6% com a aplicação de enzimas nas dietas.

ABUDABOS (2012) avaliou os efeitos da densidade de aves e da suplementação com complexo produzido por *Aspergillus awamori* (α -amilase, protease, pectinase, amiloglicosidase, celulase e fitase) em ração para frango de corte, da linhagem Cobb 500, machos, no desempenho das aves e verificou que a adição das enzimas aumentou o peso, o consumo de ração e a conversão alimentar das aves.

Em relação ao metabolismo, ONDERCI et al. (2006) verificaram a eficiência da adição de α -amilase em rações à base de milho e farelo de soja na utilização de nutrientes em frangos de corte, machos, da linhagem Cobb 500, e observaram que a inclusão da enzima na dieta melhorou a metabolizabilidade de nutrientes, proporcionando melhor desempenho das aves.

LEITE et al. (2008) estudaram o efeito da suplementação com complexo enzimático comercial (Allzyme Vegpro[®]), composto por amilase, celulase e protease, em rações formuladas com milho e farelo de soja, fareladas ou peletizadas, na metabolizabilidade de nutrientes e no desempenho de frangos de corte, machos, da linhagem Cobb, de um a 21 dias de criação e notaram que as enzimas aumentaram o ganho de peso, melhoraram a conversão alimentar e a metabolizabilidade da proteína bruta e do extrato etéreo.

Os efeitos da suplementação enzimática (amilase, celulase e protease), da forma física (farelada ou triturada, peletizada e posteriormente moída) e dos níveis nutricionais (95 e 100% das exigências recomendadas) de rações à base de milho e farelo de soja sobre a metabolizabilidade de nutrientes em frangos de corte, machos, da linhagem Cobb 500, foram avaliados por PUCCI et al. (2010). Esses autores constataram que as enzimas pioraram a metabolizabilidade da matéria seca (1,4%), da proteína bruta (3,43%) e do extrato etéreo (1,7%).

OPALINSKI et al. (2011) avaliaram a influência da adição de complexo enzimático comercial, composto pelas enzimas amilase, celulase e protease, em rações formuladas com milho e farelo de soja sobre a metabolizabilidade de soja desativada em frangos de corte, machos, criados de um a 28 dias e observaram

que a adição das enzimas nas dietas não influenciou as metabolizabilidades dos aminoácidos e do nitrogênio.

FORTES et al. (2012) estudaram programas nutricionais com redução da energia metabolizável aparente (EMA), da proteína bruta e de aminoácidos, associados à suplementação com β -glucanase, xilanase, α -galactosidase, galactomananase e fitase em rações de frangos de corte e verificaram que a adição das enzimas na dieta das aves aumentou o consumo de ração (5,18 %) e o ganho de peso (4,39 %).

O efeito de amilase, xilanase, β -glucanase, probiótico e nível de energia em dietas para frangos de corte, da linhagem Ross, na fase de um a 35 dias de criação, na metabolizabilidade da matéria seca, da energia bruta, da proteína total e da energia metabolizável aparente foi avaliado por SANTOS et al. (2012), os quais verificaram que a suplementação com aditivos isolados ou combinados com enzimas não aumentou a metabolizabilidade da dieta.

2.3.3 Polissacarídeos não amiláceos

As dietas para frangos de corte são constituídas basicamente por produtos de origem vegetal, sendo o milho, fonte de energia, e o farelo de soja, fonte de proteína. Entretanto, esses alimentos apresentam constituintes que não são digeríveis pelas aves, entre eles, os polissacarídeos não amiláceos (PNAs) são os mais importantes (COUSINS, 1999). Esses PNAs correspondem a hidratos de carbono presentes na parede celular do endosperma dos grãos de cereais principalmente no trigo, na cevada, na aveia, no centeio e no tritcale (FRANCESCH, 1996). Nesse aspecto, o milho tem aproximadamente 8% e o farelo de soja cerca de 30% de PNAs (TAVERNARI, 2008).

De acordo com MATEOS et al. (2002), os PNAs podem ser solúveis (β -glucanos, arabinoxilanos, arabinoglactanos, galactomananos, pectinas) ou insolúveis (celulose, hemicelulose, pectinas) em água, sendo os solúveis os mais problemáticos para as aves dadas as suas características antinutricionais. Esses autores relatam que, dos compostos solúveis em água, os β -glucanos e os arabinoxilanos são os principais PNAs presentes nas paredes celulares dos

cereais e que os PNAs solúveis são os mais problemáticos para as aves, uma vez que são solubilizados no intestino delgado, tornando o conteúdo digestivo viscoso.

A presença de PNAs solúveis no lúmen intestinal aumenta a viscosidade da digesta, pois formam polímeros ou géis com a água, que comprometem a digestão e absorção dos nutrientes, por dificultar a ação das enzimas digestivas e a difusão das substâncias relacionadas com a digestão e a absorção (OPALINSKI et al., 2010).

Além desses efeitos, o aumento da viscosidade da digesta afeta a colonização microbiana no intestino (MARQUARDT et al., 1996; GAO et al., 2008). Nesse sentido, segundo GAO et al. (2008), a alta viscosidade reduz a velocidade da passagem da digesta, modificando o equilíbrio microbiano no intestino devido à diminuição da taxa de oxigênio no intestino delgado e à introdução de um ambiente que favorece a multiplicação da microflora intestinal e, conseqüentemente, o aumento da produção de ácidos graxos voláteis e de ácido láctico. Para BEDFORD & SCHULZE (1998), a multiplicação das bactérias no intestino delgado afeta negativamente a saúde intestinal e resulta na redução da digestão das gorduras, pois as bactérias degradam os sais biliares necessários à emulsão dessas gorduras.

MARQUARDT et al. (1996) descreveram que a ingestão de PNAs reduz o ganho de peso e a eficiência da utilização da dieta, além de alterações comportamentais, tais como a redução da ingestão de alimento e o aumento da ingestão de água pelas aves.

Uma alternativa para resolver esses efeitos negativos é a utilização de enzimas exógenas para hidrolisar os componentes da fibra. Nesse caso, as enzimas devem ser específicas para o tipo de PNA da dieta (BEDFORD & MORGAN, 1996). Assim, visando melhorar a metabolizabilidade de nutrientes, o uso de enzimas com diferentes especificidades tem sido proposto para dietas à base de milho e farelo de soja (BRUM et al., 2008).

2.3.4 Viscosidades de rações e de digestas

Viscosidade é a propriedade física que caracteriza o atrito interno em um fluido, ou seja, a resistência ao escoamento ou fluxo, a uma determinada temperatura. A força necessária para essa ação é a medida da viscosidade do fluido (YOUNG & FREEDMAN, 2008).

A viscosidade é determinada por viscosímetros e existem vários modelos desse equipamento, dependendo do propósito da medida e do tipo de amostra a ser analisada. Os principais são os do tipo capilar, de orifício, rotacional, de cone e de esfera (CARREIRA, 2011).

A viscosidade de soluções diluídas pode ser medida em viscosímetros capilares, sendo os mais comuns os de Oswald, o Cannon Fenske e o de Ubbelohde (TAVARES, 2011). De acordo com MINAFRA (2007), essa medida é dada em centipoise (cPs), que equivale a 10^{-3} Pascal-segundo (Pa.s).

Baseado na viscosidade, ZANELLA (1998) dividiu os alimentos mais utilizados em rações em dois grupos. Assim, o milho, o sorgo e a soja foram considerados de baixa viscosidade (<10 centipoise - cPs), enquanto que o trigo, o centeio, a cevada, a aveia, o triticale e o farelo de arroz, de alta viscosidade (>10 cPs). Segundo GRACIA et al. (2003), as dietas à base de milho e sorgo não apresentam problemas de viscosidade e, como consequência disso, apresentam, também, menor resposta a suplementação enzimática.

ZANELLA et al. (1999) avaliaram a viscosidade intestinal de frango de corte, machos, da linhagem Hubbard, com 37 dias de idade, com a inclusão das enzimas xilanase, protease e amilase em seis dietas à base de milho e soja. Os autores observaram que os valores variaram de 2,4 a 2,8 cPs para a dieta com enzima e de 2,3 a 2,7 cPs para sem enzima.

A viscosidade intestinal de pintos machos, da linhagem Cobb 500, alimentados com dietas à base de milho/farelo de soja e suplementadas com α -amilase foi verificada por GRACIA et al. (2003). Esses autores verificaram que a suplementação enzimática não afetou a viscosidade, sendo que os valores foram de 2,34 cPs para sete dias e 1,69 cPs para 28 dias de idade das aves.

CARVALHO (2006) avaliou a viscosidade das digestas de frangos de corte, machos, com 42 dias de idade, alimentados com rações à base de milho e

soja, suplementadas com complexo enzimático e obteve valor médio de 2,18 cPs. Além disso, observou que o complexo que continha xilanase diminui a viscosidade intestinal das aves com 42 dias de idade.

As viscosidades da ração e do conteúdo intestinal de frangos de corte, linhagem Cobb, sexados, foram estudadas por MARQUES (2007) quando incluiu complexo multienzimático (amilase, celulase e xilanase) nas dietas pré-inicial e inicial e observou que os valores variaram de 2,09 a 2,15 cPs na digesta e de 2,79 a 2,98 na ração e que não houve efeito das enzimas nas viscosidades.

MINAFRA (2007) verificou as viscosidades das rações e das digestas de frango de corte, linhagem Cobb, machos, com a inclusão nas rações de α -amilase produzida pelos fungos *Cryptococcus flavus* e *Aspergillus niger*, nas fases pré-inicial e inicial de criação. O autor observou que as viscosidades não apresentaram diferença significativa aos sete e 21 dias de idade e que os valores variaram de 2,79 a 2,82 cPs nas digestas e de 2,11 a 2,14 nas rações.

LU et al. (2009) avaliaram a viscosidade da digesta de frangos de corte, machos, da linhagem Arbor Acres, alimentados com dietas à base de milho, farelos de soja e de trigo e suplementadas com enzimas. Os autores encontraram valores de 2.17 (fitase+xilanase), 2.26 (xilanase) e 2.80 cPs (fitase) para as dietas com enzimas e 2.74 e 2.77 cPs para sem enzima.

2.3.5 Parâmetros hematológicos e bioquímicos de sangue

As principais funções do sangue são a absorção de nutrientes, proteção por meio das células de defesa, regulação do conteúdo de água corporal, transporte de oxigênio, de hormônios, de nutrientes, de calor dos tecidos termogênicos e eliminação de produtos do catabolismo celular (MACARI & LUQUETTI, 2002).

Nesse sentido, o hemograma constitui numa ferramenta importante para se definir um diagnóstico rápido da situação fisiológica dos animais. Qualquer alteração nos parâmetros sanguíneos, fora de um intervalo padrão, para uma determinada espécie, é indicativo da ocorrência de desvios funcionais que podem ser resultantes de problemas nutricionais. Entretanto, diferentemente do

que ocorre nos mamíferos, apenas recentemente o perfil hematológico das aves começou a receber maior atenção por parte dos pesquisadores (NAKAGE, 2007).

O sangue é constituído por uma parte fluida ou plasma, com sais e proteínas dissolvidas e outra de células. Nessas estão as hemácias, os leucócitos e os trombócitos (MACARI & LUQUETTI, 2002).

O número de leucócitos no sangue dos frangos pode variar de 2000 até 3000 células. μL^{-1} , dependendo do sexo, da idade, das condições de estresse e de doenças. Do total de leucócitos, 60% a 65% são linfócitos, 25 a 30% heterófilos, 2% eosinófilos, 1.7% basófilos e 10% monócitos (MACARI & LUQUETTI, 2002).

ABUDABOS (2012) avaliou os efeitos da adição de complexo enzimático (α -amilase, protease, pectinase, amiloglicosidase, celulase e fitase), produzido por *Aspergillus awamori*, em ração para frangos de corte, da linhagem Cobb 500, machos, sobre os parâmetros bioquímicos do soro sanguíneo e verificou que a adição das enzimas aumentou os níveis de proteína total, de cálcio, de fósforo e não afetou o teor de triglicérides das aves com 42 dias de idade.

Muitas pesquisas são desenvolvidas nessa área com resultados variáveis, dependendo do sexo, da idade, da alimentação (CARDOSO et al., 2009; EGBUNIKE et al., 2009; ISMAIL et al., 2011; OBIKAONU et al., 2012; ADEJUMO & OLOGHOB, 2013), das condições ambientais (MARCHINI et al., 2011; ABREU et al., 2012; NOWACZEWSKI & KONTECKA, 2012), de condições de estresse (ABUDABOS, 2012) e de doenças das aves (SHAH et al., 2013).

MINAFRA (2010) relatou que no Brasil há escassez de dados sobre níveis de referência para valores hematológicos e bioquímicos em frangos de corte. Por isso, a importância de se estudar e traçar o perfil sanguíneo das aves nas mais diversas situações de experimentação.

2.3.6 Biometria dos órgãos digestórios, atividades enzimáticas, conteúdo de proteína e peso absoluto do pâncreas

O trato gastrintestinal das aves é um tubo oco e fibromuscular, que vai do bico à cloaca e possui as funções básicas de digestão, absorção e eliminação

do alimento. Esse sistema divide-se em bico, língua, glândulas salivares, faringe, esôfago, papo, proventrículo, moela, intestino delgado, cecos, cólon, reto e cloaca (BOLELI et al., 2002; ALBINO & TAVERNARI, 2010). Esses órgãos, dependendo das condições nutricionais a que são submetidos, podem apresentar hipo ou hipertrofia (AHMED et al., 1991), afetando, conseqüentemente, os seus pesos.

Após a eclosão, as mudanças morfológicas e fisiológicas que ocorrem no trato gastrointestinal são importantes por aumentarem a superfície de digestão e absorção (MAIORKA et al., 2002). Assim, o rápido acesso aos alimentos, após a eclosão, é fundamental durante a fase de transição entre a vida embrionária e a utilização de dietas exógenas (NOY & SKLAN, 1998). Além disso, é vantajoso para o crescimento corporal (UNI et al., 1998), para a conversão alimentar e para a uniformidade do lote (SAKI, 2005).

O desenvolvimento do intestino também é mais rápido quando os pintos são arraçoados imediatamente após a eclosão (NOY & SKLAN, 1998). Em um estudo, NOY & SKLAN (2000) verificaram que pintos, desprovidos de alimento por 48 horas, após a eclosão, sofreram diminuição no peso corporal. RICCARDI et al. (2009) relatam que jejum pós-eclosão afeta negativamente o desenvolvimento dos órgãos e o crescimento dos pintos.

O pâncreas é uma glândula de dupla função, endócrina e exócrina, responsável pela produção de insulina, glucagon e suco pancreático. Esse compõe-se de água, sais, mucinas e enzimas de ação digestiva. Algumas enzimas agem sobre os carboidratos, como a amilase; outras sobre as gorduras, como a lipase; e outras ainda sobre as proteínas, como a tripsina (BOLELI, et al., 2002; FURLAN & MACARI, 2002).

Em relação ao pâncreas, SAKOMURA et al. (2004) relataram que a taxa de crescimento diminuiu linearmente com a idade da ave, sendo que o valor máximo foi observado no 7º dia de idade. Para MORAN JR. (1985), o crescimento alométrico do pâncreas acompanha a curva de crescimento do frango, porém sua taxa de crescimento é maior nas primeiras semanas de idade das aves, porque nessa fase ocorre a maturação fisiológica dos órgãos digestórios, essencial na produção das enzimas digestivas.

Ainda, em relação ao tamanho do pâncreas, a suplementação das dietas com enzimas pode afetar o seu peso. MINAFRA (2007) observou pâncreas

menores em aves que receberam amilase exógena e atribuiu essa diferença à uma diminuição da funcionalidade desse órgão.

Em relação às enzimas, a quantidade secretada diariamente aumenta com o avançar da idade dos pintos (NOY & SKLAN, 1995) e as atividades enzimáticas diminuem nos três a seis dias após a eclosão, aumentando entre o 10º e o 21º dias de idade. Além disso, o tipo de alimento fornecido às aves pode afetar a secreção enzimática pancreática (FURLAN et al., 2002).

Portanto, as transformações anatômicas e fisiológicas do sistema digestório na primeira semana de idade das aves são bastante significativas (MAIORKA et al., 2002). Com isso, as aves, nessa fase, possuem menor capacidade de digestão e absorção de nutrientes da ração (BRUMANO et al., 2006). Isso sugere práticas nutricionais e de manejo diferenciadas (MAIORKA et al., 2002), como, por exemplo, o desenvolvimento de dietas específicas para a fase pré-inicial (PENZ & VIEIRA, 1998).

BRUMANO et al. (2006) relataram que em aves mais velhas o sistema digestório está desenvolvido, possuindo maior tamanho e produzindo enzimas e secreções gástricas, daí o melhor aproveitamento de nutrientes das dietas.

O peso relativo do pâncreas variou muito nos trabalhos revisados, principalmente em relação à idade das aves e das dietas, que no 7º dia de vida foi de 0,43% (MARQUES, 2007) e 0,47% (MINAFRA, 2007), no 21º de 0,31% (MARQUES, 2007) e de 0,36% (MINAFRA, 2007).

Nesse sentido, de acordo com STRINGHINI et al. (2003), o conhecimento do peso dos órgãos das aves na fase pré-inicial é um fator importante para caracterizar o desenvolvimento do sistema digestório.

REFERÊNCIAS

1. ABBASI, H.; SHAFIGHZADEH, H.; RAHIMI, A. Continuous production of polygalacturonases (PGases) by *Aspergillus awamori* using wheat flour in surface culture fermentation. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 1, p. 50-56, 2011.

2. ABREU, V. M. N.; ABREU, P. G.; JAENISCH, F. R. F.; LOPES, L. S.; COLDEBELLA, A. Evaluation of the welfare of broiler chickens reared in different heating systems. **Ninth International Livestock Environment Symposium**, Valencia, Spain, July 8 - 12, 2012.
3. ABUDABOS, A. Effect of enzyme supplementation to normal and low density broiler diets based on corn-soybean meal. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 7, n. 2, p. 139-148, 2012.
4. ADEJUMO, I. O. & OLOGHOB, A. D. Influence of differently processed taro (*Colocasia esculenta* [(L.) Schott] on haematological indices of broiler finishers. **International Journal of AgriScience**, v. 3, n. 1, p. 47-52, 2013.
5. AHMED, A. E.; SMTTHARD, R.; ELLIS, M. Activities of enzymes of the pancreas, and the lumen and mucosa of the small intestine in growing broiler cockerels fed on tannin-containing diets. **British Journal of Nutrition**, v. 65, n. 2, p. 189-197, 1991.
6. ALBINO, L. F. T. & TAVERNARI, F. C. **Produção e manejo de frangos de corte**. Viçosa, MG: Editora UFV. 2010. 88 p.
7. ARAÚJO, J. A.; SILVA, J. H. V.; AMÂNCIO, A. L. L.; LIMA, M. R.; LIMA, C. B. Uso de aditivos na alimentação de aves. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 1, n. 3, p. 69-77, 2007.
8. BANSAL, N.; TEWARI, R.; SONI, R.; SONI, S. K. Production of cellulases from *Aspergillus niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues. **Waste Management**, v. 32, p. 1341-1346, 2012.
9. BARBOSA, N. A. A.; SAKOMURA, N. K.; BONATO, M. A.; HAUSCHILD, L.; OVIEDO-RONDON, E. Enzimas exógenas em dietas de frangos de corte: desempenho. **Ciência Rural**, v. 42, n. 8, p. 1497-1502, 2012.
10. BEAUCHEMIN, K. A.; RODE, L. M.; YANG, W. Z.; McALLISTER, T. A. Use of feed enzymes in ruminant nutrition. In: PACIFIC NORTHWEST NUTRITION CONFERENCE, 33rd, 1998. Vancouver. **Proceedings...**Vancouver, 1998. 14 p.
11. BEDFORD, M. R. & SCHULZE, H. Exogenous enzymes for pigs and poultry. **Nutrition Research Reviews**, v. 11, p. 91-114, 1998.
12. BEDFORD, M. R. & MORGAN, A. J. The use of enzymes in poultry diets. **World Poultry Science Journal**, v. 52, p. 61-68. 1996.
13. BEILEN, J. B. V. & LI, Z. Enzyme technology: an overview. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 338-344, 2002.
14. BENAZIR, J. F.; SUGANTHI, R.; ANJANA, H; RAMESH, K. V.; ASWATHI, M. P.; NIRAIMATHI, G.; MALA, M. K.; SUKANYA, S.; SANTHI, R. Bio utilization of agroindustrial waste in solid state fermentation by *Aspergillus niger* for the production of protease. **Asiatic Journal of Biotechnology Resources**, v. 2, n. 4, p. 422-435, 2011.
15. BOLELI, I. C.; MAIORKA, A.; MACARI, M. Estrutura funcional do trato digestório. In: MACARI, M.; FURLAN, R.L.; GONZALES, E. (Eds). **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 2002. p. 75-95.

16. BON, E. P. S.; PEREIRA JR., N.; GOTTSCHALK, L. M. F.; SÁ-PEREIRA, P.; ROSEIRO, J. C.; FERRARA, M. A. Bioprocesso para a produção de enzimas. In: **Enzimas em biotecnologia: Produção, aplicação e mercado**. BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L.; VERMELHO, A. B.; PAIVA, C. L. A.; ALENCASTRO, R. B.; COELHO, R. R. R., eds.; Interciência: Rio de Janeiro, 2008, cap. 5.
17. BRITO, M. S.; OLIVEIRA, C. F. S.; SILVA, T. R. G.; LIMA, R. B.; MORAIS, S. N.; SILVA, J. H. V. Polissacarídeos não amiláceos na nutrição de monogástricos - revisão. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 2, n. 4, p. 111-117, 2008.
18. BRUM, P. A. R.; LIMA, G. J. M. M.; AVILA, V. S.; COLDEBELLA, A.; ZANOTTO, D. L.; KLEIN, C. H. **Utilização de Complexos Enzimáticos em Dietas à Base de Milho e Farelo de Soja para Frangos de Corte**. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2008. 4p. (Comunicado Técnico, 471).
19. BRUMANO, G.; GOMES, P. C.; ALBINO, L. F. T.; ROSTAGNO, H. S.; GENEROSO, R. A. R.; SCHMIDT, M. Composição química e valores de energia metabolizável de alimentos proteicos determinados com frangos de corte em diferentes idades. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 6, p. 2297-2302, 2006.
20. BULÉON, A.; COLONNA, P.; PLANCHOT, V.; BALL S. Starch granules: structure and biosynthesis. **International journal of Biological Macromolecules**, v. 23, p. 85-112, 1998.
21. CAIRES, C. M.; FAGUNDES, N. S.; FERNANDES, E. A.; CARVALHO, A. P. Enzimas na alimentação de frangos de corte. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 5, n.1, p. 491-497, 2008.
22. CAMPESTRINI, E.; SILVA, V. T. M.; APPELT, M. D. 2005. Utilização de enzimas na alimentação animal. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 2, n. 6, p. 259-272, 2005.
23. CARDOSO, D. M.; MACIEL, M. P.; PASSOS, D. P.; SILVA, F. V.; REIS, S. T.; AIURA, F. S. Efeito do uso de complexo enzimático em rações para frangos de corte. **Archivos de Zootecnia**, v. 60, n. 232, p.1053-1064, 2011.
24. CARDOSO, V. S.; LIMA, C. A. R.; LIMA, M. E. F.; DORNELES, L. E. G.; TEIXEIRA FILHO, W. L.; LISBOA, R. S.; GUEDES JUNIOR, D. S.; DIREITO, G. M.; DANELLI, M. G. M. Administração oral de piperina em frangos de corte. **Ciência Rural**, v.39, p.1521-1526, 2009.
25. CARREIRA, C. F. M. **Relação entre a viscosidade *in vivo* e *in vitro* de alimentos à base de cevada para frangos de carne**. 2011. 71 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Zootécnica - Produção Animal). Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa. Disponível em: <https://www.repository.utl.pt/handle/10400.5/3694>. Acesso em: 23 jun. 2013.
26. CARVALHO, J. C. C. **Complexos enzimáticos em rações fareladas para frangos de corte**. 2006. 64 f. Dissertação (Mestrado em nutrição de Monogástricos) - Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Lavras, Lavras. Disponível em: http://www.dominiopublico.gov.br/pesquisa/DetalheObraForm.do?select_action=&co_obra=28690. Acesso em: 26 de mar. 2013.

27. CARVALHO, J. C. C.; BERTECHINI, A. G.; FASSANI, E. J.; RODRIGUES, P. B.; PEREIRA, R. A. N. Desempenho e características de carcaça de frangos de corte alimentados com dietas à base de milho e farelo de soja suplementadas com complexos enzimáticos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 2, p. 292-298, 2009.
28. CASTRO, A. M. & PEREIRA JR., N. Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.
29. CLEÓPHAS, G. M. L.; VAN HARTNGSVELDT, W.; SOMERS, W. A. C.; VAN DER LUGT, J. P. K. Enzymes can play an important role in poultry nutrition. **World Poultry**, v. 11, n. 4, p.12-15, 1995.
30. COSTA, F. G. P.; CLEMENTINO, R. H.; JÁCOME, I. M. T. D.; NASCIMENTO, G. A. J.; PEREIRA, W. E. Utilização de um complexo multienzimático em dietas de frangos de corte. **Ciência Animal Brasileira**, v. 5, n. 2, p. 63-71, 2004.
31. COSTA, J. A. V.; COLLA, E.; MAGAGNIN, G.; SANTOS, L.; BERTOLIN, T. Simultaneous amyloglucosidase and exo-polygalacturonase production by *Aspergillus niger* using Solid-state Fermentation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 5, p. 759-766, 2007.
32. COUSINS, B. Enzimas na nutrição de aves. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL ACAV - EMBRAPA SOBRE NUTRIÇÃO DE AVES, 1. 1999, Concórdia. **Anais...** Concórdia: EMBRAPA - CNPSA.
33. CRUEGER, W. & CRUEGER, A. **Biotechnology: a textbook of industrial microbiology**. Madison: Science Technology, Inc. Science Tech, Inc., 1984. 308p.
34. CUI, Y. Q.; VAN DER LANS, R. G. J. M.; GIUSEPPIN, M. L. F.; LUYBEN, K. C. A. M. Influence of fermentation conditions and scale on the submerged fermentation of *Aspergillus awamori*. **Enzyme and Microbial Technology**, n. 23, p. 157-167, 1998.
35. DURAND, A. Bioreactors designs for solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2/3, p. 113-125, 2003.
36. EGBUNIKE, G. N.; AGIANG, E. A.; OWOSIBO, A. O.; FATUFE, A. A. Effect of protein on performance and haematology of broilers fed cassava peel-based diets. **Archives Zootechnic**, v. 58, n. 224, p. 655-662, 2009.
37. FELLOWS, P. **Tecnología del procesado de los alimentos: principios y prácticas**. Acribia, Zaragoza, 1994. 549p.
38. FERNÁNDEZ, D. E. R. **Desenvolvimento de um bioprocesso por fermentação em estado sólido para produzir e recuperar enzimas de interesse comercial**. 2009. 126p. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) - Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. Disponível em: <http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/handle/1884/23349/>. Acesso em: 23 jun. 2013.
39. FIREMAN, F. A. T. & FIREMAN, A. K. A. T. Enzimas na alimentação de suínos. **Ciência Rural**, v. 28, n. 1, p. 173-178, 1998.

40. FISCHER, G.; MAIER, J. C.; RUTZ, F.; BERMUDEZ, V. L. Desempenho de frangos de corte alimentados com dietas a base de milho e farelo de soja, com ou sem adição de enzimas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 1, p. 402-410, 2002.
41. FORTES, B. D. A.; CAFÉ, M. B.; STRINGHINI, J. H.; BRITO, J. A. G.; REZENDE, P. L. P.; SILVA, R. D. Avaliação de programas nutricionais com a utilização de carboidrases e fitase em rações de frangos de corte. **Ciência Animal Brasileira**, v. 13, n. 1, p. 24-32, 2012.
42. FRANCESCH, M. Bases de la utilización de complejos enzimáticos en avicultura. In: XII Curso de Especialización FEDNA, Madrid. 1996. p. 118-131.
43. FURLAN, R. L. & MACARI, M. Motilidade gastrointestinal. In: MACARI, M.; FURLAN, R. L.; GONZALES, E. (Eds). **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 2002. p. 97-103.
44. FURLAN, R. L.; MACARI, M.; SUGETA, S. M. Secreções gastrointestinais. In: MACARI, M.; FURLAN, R. L.; GONZALES, E. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. 2. ed., Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 2002. p. 105-111.
45. GAO, F.; JIANG, Y.; ZHOU, G.H.; HAN, Z. K. The effects of xylanase supplementation on performance, characteristics of the gastrointestinal tract, blood parameters and gut microflora in broilers fed on wheat-based diets. **Animal Feed Science and Technology**, v. 142, p. 173-184, 2008.
46. GRACIA, M. I.; ARANÍBAR, M. J.; LÁZARO, R.; MEDEL, P.; MATEOS, G. G. α -amylase supplementation of broiler diets base on corn. **Poultry Science**, v. 82, p. 436-442, 2003.
47. GRAHAM, H. Mode de action of feed enzymes in diets based on low viscous and viscous grains. In: SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE NUTRIÇÃO DE SUÍNOS E AVES, 1996, Campinas. **Anais...** Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 1996. p. 60-69.
48. GUENTER, W. **Practical experience with the use of enzymes**. 1997. Disponível em: <http://archive.idrc.ca/books/focus/821/chp6.html>. Acesso em: 23 ago. 2013.
49. GUIMARÃES, L. H. S.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S. C.; MICHELIN, M.; RIZZATTI, A. C. S.; SANDRIM, V. C.; ZANOELO, F. F.; AQUINO, M. M.; JUNIOR, A. B. E.; POLIZELI, M. L. Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological applications. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 474-480, 2006.
50. GUPTA, A.; GAUTAM, N.; MODI, D. R. Optimization of α -amilase production from free and immobilized cells of *Aspergillus niger*. **Journal of Biotechnology and Pharmaceutical Research**, v. 1, n. 1, p. 1-8, 2010.
51. GUPTA, R.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V. K.; CHAUHAN, B. Microbial α -amylases: Biotechnological Perspective. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 11, p. 1-18, 2003.

52. HAJATI, H. Effects of enzyme supplementation on performance, carcass characteristics, carcass composition and some blood parameters of broiler chicken. **Journal of Animal and Veterinary Sciences**, v. 5, n. 3, p. 221-227, 2010.
53. HARGER, C.; SPRADA, D.; HIRATSUKA, E. Amilase fúngica. In: **Bioquímica das fermentações**. [S.l.]: [s.n.], 1982. 56 p.
54. HÖLKER, U.; HÖFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 2, p.175-186, 2004.
55. ISMAIL, F. S. A.; ABO EL-MAATY, H. M. A.; EL-SAYED, A. A. M. Performance of broiler chicks affected by dietary supplementation with commercial enzymes or probiotics. **Journal Animal and Poultry Production**, v. 2, n. 2, p. 23-32, 2011.
56. KANAUCHI, M.; WATANABE, S.; TSUKADA, T.; ATTA, K.; KAKUTA, T.; KOIZUMI, T. Purification and Characteristics of Feruloyl Esterase from *Aspergillus awamori* G-2 Strain. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 6, p. 458-463, 2008.
57. KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 345-351, 2002.
58. LEITE, P. R. S. C.; LEANDRO, N. S. M.; STRINGHINI, J. H.; SOUZA, E. S.; CAFÉ, M. B.; CARVALHO, F. B.; ANDRADE, M. A. Microbiota intestinal e desempenho de frangos alimentados com rações elaboradas com sorgo ou milho e complexo enzimático. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 6, p. 1673-1681, 2012.
59. LEITE, J. L. B.; RODRIGUES, P. B.; FIALHO, E. T.; FREITAS, R. T. F.; NAGATA, A. K.; CANTARELLI, V. S. Efeito da peletização e adição de enzimas e vitaminas sobre o desempenho e aproveitamento da energia e nutrientes em frangos de corte de 1 a 21 dias de idade. **Ciências Agrotécnicas**, v. 32, n. 4, p. 1292-1298, 2008.
60. LI, S.; YANG, X.; YANG, S.; ZHU, M.; WANG, X. Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 2, n. 3, p. 11, 2012.
61. LI, Y.; LIN, J.; MENG, D.; LU, J.; GU, G.; MAO, Z. Effect of pH, cultivation time and substrate concentration on the endoxylanase production by *Aspergillus awamori* ZH-26 under submerged fermentation using central composite rotary design. **Food Technology Biotechnology**, v. 44, n. 4, p. 473-477, 2006.
62. 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**, v. 1, n. 4, p. 99-110, 2007.
63. LIMA, F. R. Aditivos zootécnicos: enzimas. In: PALERMO NETO, J.; SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. I. **Farmacologia aplicada à avicultura**. São Paulo: ROCA, 2005. p. 239-248.

64. LIMA, A. C. F.; MACARI, M.; PIZAULO JÚNIOR, J. M.; MALHEIROS, E. B. Atividade enzimática pancreática de frangos de corte alimentados com dietas contendo enzimas ou probióticos. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 4, n. 3, p. 1-9, 2002.
65. 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). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba. Disponível em: www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11139/tde-13052004.../flavio.pdf. Acesso em: 06 de jul. 2013.
66. LONGO, F. A.; MENTEN, J. F. M.; PEDROSO, A. A.; FIGUEIREDO, A. N.; RACANICCI, A. M. C.; GAIOTTO, J. B.; SORBARA, J. O. B. Diferentes fontes de carboidrato na dieta pré-inicial de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 1, p. 112-122, 2005.
67. LU, M.; LI, D.; GONG, L.; RU, Y.; RAVINDRAM, V. Effects of supplemental microbial phytase and xylanase on the performance of broilers fed diets based on corn and wheat. **Japan Poultry Science**, v. 46, n. 3, p. 217-223, 2009.
68. MACARI, M. & LUQUETTI, B. C. Fisiologia Cardiovascular. In: MACARI, M.; FURLAN, R. L.; GONZALES, E. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 2002. p. 17-36.
69. MAIORKA, A.; BOLELI, I. C.; MACARI, M. Desenvolvimento e reparo da mucosa intestinal. In: MACARI, M.; FURLAN, R. L.; GONZALES, E. (Eds). **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 2002. p. 113-123.
70. MARCHINI, C. F. P.; NASCIMENTO, M. R. B. M.; SILVA, P. L.; GUIMARÃES, E. C. **Parâmetros hematológicos de frangos de corte submetidos à temperatura ambiente cíclica elevada**. XXII Latin American Poultry Congress 2011. Disponível em: <http://pt.engormix.com/MA-avicultura/industria-carne/artigos/parametros-hematologicos-frangos-corte-t518/471-p0.htm>. Acesso em: 23 jun. 2013.
71. MARQUARDT, R. R.; BRENES, A.; ZHANG, Z.; BOROS, D. Use of enzymes to improve nutrient availability in poultry feedstuffs. **Animal Feed Science and Technology**, v. 60, p. 321-330, 1996.
72. MARQUES, S. F. F. **Biotecnologia enzimática: produção de complexo multienzimático de *Trichoderma harzianum* e sua aplicação na alimentação de frangos de corte**. 2007. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade Federal de Goiás, Goiânia. Disponível em: http://ppgca.vet.ufg.br/uploads/67/original_Dissertacao2007_Sonaide_Marques.pdf. Acesso em: 23 fev. 2013.
73. MATEOS, G. G.; LÁZARO, R.; GRACIA, M. I. **Modificaciones nutricionales y problemática digestiva en aves**. XVIII Curso de Especialización FEDNA, Barcelona. 2002.
74. MENDES, A. A. Avicultura brasileira: avanços, gargalos e desafios. In: Conferência APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2010, Campinas, **Resumos...** Campinas: FACTA. 2010. p. 123-138.

75. MINAFRA, C. S. **Produção e suplementação com α -amilase de *Cryptococcus flavus* e *Aspergillus niger* HM2003 na dieta de frangos de corte de um a 21 dias de idade.** 2007. 124 f. Tese (Doutorado em Bioquímica Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. Disponível em: http://www.tede.ufv.br/tedesimplificado/tde_arquivos/27/TDE-2008-02-29T125750. Acesso em: 28 fev. 2013.
76. MINAFRA, C. S.; MARQUES, S. F. F.; STRINGHINI, J. H.; ULHOA, C. J.; REZENDE, C. S. M.; SANTOS, J. S.; MORAES, G. H. K. Perfil bioquímico do soro de frangos de corte alimentados com dieta suplementada com alfa-amilase de *Cryptococcus flavus* e *Aspergillus niger*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 12, p. 2691-2696, 2010.
77. MDIC - MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR. **Diagnóstico de referência sobre serviços de escalonamento de biotecnologias no Brasil.** Rio de Janeiro: Fundação Bio-Rio, 2012. 50p.
78. MONTEIRO, V. N. & SILVA, R. N. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. **Revista Processos Químicos**, v. 3, n. 5, p. 9-23, 2009.
79. MORAES, L. M. P. Amilases. In: SAID, S.; PIETRO, R. **Enzimas como agentes biotecnológicos.** Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004.
80. MORAN JR., E. T. Digestion and absorption of carbohydrates in fowl and events through perinatal development. **The Journal of nutrition**, v. 115, n. 2, p. 665-671, 1985.
81. NAKAGE, E. S. **Respostas fisiológicas de pintos submetidos a diferentes períodos de jejum: parâmetros hematológicos e intestinais.** 2007. 86 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. Disponível em: <http://www.fcav.unesp.br/download/pgtrabs/zoo/d/1766.pdf>. Acesso em: 15 jun. 2013.
82. NEGI, S. & BANERJEE, R. Characterization of amylase and protease produced by *Aspergillus awamori* in a single bioreactor. **Food Research International**, v. 42, n. 4, p. 443-448, 2009.
83. NEGI, S. & BANERJEE, R. Study of conformational changes in glucoamylase of *Aspergillus awamori* nakazawa in presence of denaturants through CD-spectroscopy. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 19, p. 7577-7580, 2010.
84. NELSON, D. L. & COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger.** 5^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. 1274p.
85. NOWACZEWSKI, S. & KONTECKA, H. Haematological indices, size of erythrocytes and haemoglobin saturation in broiler chickens kept in commercial conditions. **Animal Science Papers and Reports**, v. 30, n. 2, p. 181-190, 2012.
86. NOY, Y. & SKLAN, D. Hydrolysis and absorption in the small intestines of posthatch chicks. **Poultry Science**, v. 79, p. 1306-1310, 2000.
87. NOY, Y. & SKLAN, D. Yolk utilization in the newly hatched poultry. **British Poultry Science**, v. 39, p. 446-451, 1998.
88. NOY, Y. & SKLAN, D. Digestion and absorption in the young chick. **Poultry Science**, v. 74, p. 366-373, 1995.

89. OBIKAONU, H. O.; OKOLI, I. C.; OPARA, M. N.; OKORO, V. M. O.; OGBUEWU, I. P.; ETUK, E. B.; UDEDIBIE, A. B. I. Haematological and serum biochemical indices of starter broilers fed leaf meal of neem (*Azadirachta indica*). **Journal of Agricultural Technology**, v. 8, n. 1, p. 71-79, 2012.
90. ONDERCI, M.; SAHIN, N.; SAHIN, K.; CIKIM, G.; AYDIN, A.; OZERCAN, I.; AYDIN, S. Efficacy of supplementation of α -amylase producing bacterial culture on the performance, nutrient use, and gut morphology of broiler chickens fed a corn-based diet. **Poultry Science**, v. 85, n. 3, p. 505-510, 2006.
91. OPALINSKI, M.; MAIORKA, A.; CUNHA, F.; ROCHA, C.; BORGES, S. A. Adição de complexo enzimático e da granulometria da soja integral desativada melhora desempenho de frangos de corte. **Ciência Rural**, v. 40, n. 3, p. 628-632, 2010.
92. OPALINSKI, M.; ROCHA, C.; MAIORKA, A.; DAHLK, F.; SILVA, A. V. F.; BORGES, S. A. Impacto de enzimas e da granulometria sobre a metabolizabilidade da soja desativada para frangos de corte. **Archives of Veterinary Science**, v.16, n. 2, p. 84-90, 2011.
93. PANDEY, A.; SZAKACS, G.; SOCCOL, C. R.; RODRIGUEZ-LEON, J. A. SOCCOL, V. T. Production, purification and properties of microbial phytases. **Bioresource Technology**, v. 77, p.203-214, 2001.
94. PAQUET, V.; CROUX, C.; GOMA, G.; SOUCAILLE, G. Purification and characterization of the extracellular alpha amylase from *Clostridium acetabutylicum* ATCC 824. **Applied Environmental Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 212-218, 1991.
95. PARIZA, M. W. & COOK, M. Determining the safety of enzymes used in animal feed. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 56, p. 332-342, 2010.
96. PENZ JR., A. M. & VIEIRA, S. L. Nutrição na primeira semana. In: CONFERENCIA APINCO DE CIENCIA E TECNOLOGIA, 1998, Campinas. **Anais...** Campinas: Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas, 1998. p. 121-139.
97. PINTO, G. A. S.; BRITO, E. S.; ANDRADE, A. M. R; FRAGA, S. L. P.; TEIXEIRA, R. B. **Fermentação em estado sólido: uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais tropicais**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2005. 5p. (Comunicado Técnico, 102).
98. PRABHAKAR, A.; KRISHNAIAH, K.; JANAUN, J.; BONO, A. An overview of engineering aspects of solid state fermentation. **Malaysian Journal of Microbiology**, v. 1, n. 2, p. 10-16, 2005.
99. PRAKASHAM, R. S.; SUBBA RAO, C. H.; SREENIVAS RAO, R.; SARMA, P. N. Enhancement of acid amylase production by an isolated *Aspergillus awamori*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 1, p. 204-211, 2007.

100. PUCCI, L. E. A.; RODRIGUES, P. B.; BERTECHINI, A. G.; NASCIMENTO, G. A. J.; LIMA, R. R.; SILVA, L. R. Forma física, suplementação enzimática e nível nutricional de rações para frangos de corte na fase inicial: desempenho e metabolizabilidade dos nutrientes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 6, p. 1272-1279, 2010.
101. RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 1, n. 3, 1998.
102. REED, G. **Enzymes in Food Processing**. 2^a. ed. New York: Academic Press Inc., 1975. p. 62-87.
103. RICCARDI, R. R.; MALHEIROS, E. B.; BOLELI, I. Efeito do jejum pós-eclosão sobre pintos de corte provenientes de ovos leves e pesados. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 4, p. 1013-1020, 2009.
104. SAKI, A. A. Effect of post-hatch feeding on broiler performance. **International Journal of Poultry Science**, v. 4, p. 4-6, 2005.
105. SAKOMURA, N. K.; DEL BIANCHI, M.; PIZAULO JR., J. M.; CAFÉ, M. B.; FREITAS, E. R. Efeito da idade dos frangos de corte na atividade enzimática e digestibilidade dos nutrientes do farelo de soja e da soja integral. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 4, p. 924-935, 2004.
106. SALES, M. R.; MOURA, R. B.; PORTO, T. S.; MACEDO, G. R.; PORTO, A. L. F. Variáveis que influenciam a produção de celulasas e xilanase por espécies de *Aspergillus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 11, p. 1290-1296, 2010.
107. SANTOS, I. I.; KESSLER, A. M.; MENDES, J. F.; GIANFELICI, M. F.; KRÁS, R. V. Efeito de probiótico e enzimas em dietas para frangos de corte na fase de crescimento. **Revista Biotemas**, v. 25, n. 2, p. 187-191, 2012.
108. SANTOS, T. C.; SOARES, G. A.; ROCHA, T. J. O.; FERREIRA, A. N.; PACHECO, C. S. V.; FRANCO, M. Quantificação da atividade de CMCase e FPase produzidas a partir da fermentação em estado sólido da palma forrageira. **Revista Científica do Departamento de Química e Exatas**, v. 2, n. 2, p. 22-29, 2011.
109. SANTOS, S. F. M.; SOUZA, R. L. A.; ALCÂNTARA, S. R.; PINTO, G. A. S.; SILVA, F. L. H.; MACEDO, G. R. Aplicação da metodologia de superfície de resposta no estudo da produção de pectinase por fermentação em estado sólido do pedúnculo de caju. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 10, n. 2, p. 101-109, 2008.
110. SANTOS, D. T.; SARROUH, B. F.; SANTOS, J. C.; PÉREZ, V. H.; SILVA, S. S. Potencialidades e aplicações da fermentação semi-sólida em biotecnologia. **Janus**, v. 3, n. 4, p. 164-183, 2006.
111. SARROUH, B.; SANTOS, T. M.; MIYOSHI, A.; DIAS, R.; AZEVEDO, V. Up-to-date insight on industrial enzymes applications and global market. **Journal Bioprocessing and Biotechniques**, v. 4, p. 1-10, 2012.

112. SHAH, S. N.; KAMIL, S. A.; DARZI, M. M.; MIR, M. S.; BHAT, S. A. Haematological and some biochemical changes in experimental fowl typhoid infection in broiler chickens. **Comparative Clinical Pathology**, v. 22, p. 83-91, 2013.
113. SONI, S. K. & KHIRE, J. M. Production and partial characterization of two types of phytase from *Aspergillus niger* NCIM 563 under submerge fermentation conditions. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p.1585-1593, 2007.
114. SOUZA, R. L. A.; OLIVEIRA, L. S. C.; SILVA, F. L. H; AMORIM, B. C. Caracterização da poligalacturonase produzida por fermentação semi-sólida utilizando-se resíduo do maracujá como substrato. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 14, n. 9, p. 987-992, 2010.
115. SOUZA-MOTTA, C. M.; CAVALCANTI, M. A. Q.; PORTO, A. L. F.; MOREIRA, K. A.; FILHO, J. L. L. *Aspergillus niveus* Blochwitz 4128URM: new source for inulinase production. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 3, p. 343-350, 2005.
116. SPIER, M. R. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglucosidase por fermentação em estado sólido**. 2005. 178 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Paraná, Curitiba. Disponível em: <http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/handle/1884/4684/Disserta%E7%E3o%20de%20Mestrado%20-20Michele%20Rigon%20Spier.pdf;jsessionid=7B82444368EC2188A3936498492DC3DD?sequence=1>. Acesso em: 09 maio 2013.
117. STRADA, E. S. O.; ABREU, R. D.; OLIVEIRA, G. J. C. O.; COSTA, M. C. M. M.; CARVALHO, G. J. L.; FRANCA, A. S.; CLARTON, L.; AZEVEDO, J. L. Uso de enzimas na alimentação de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, p. 2369-2375, 2005.
118. STRINGHINI, J. H.; RESENDE, A.; CAFÉ, M. B.; SUSANA, N.; MOGYCA, L.; ANDRADE, M. Efeito do peso inicial dos pintos e do período da dieta pré-inicial sobre o desempenho de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, p.353-360, 2003.
119. TAVARES, R. **Apostila de práticas - Físico-Química**. Universidade Federal do Ceará. Disponível em: http://www.labufc.com.br/arqs/Apostila_FQII.pdf. Acesso em: 10 maio 2012.
120. TAVERNARI, F. C.; CARVALHO, T. A.; ASSIS, A. P.; LIMA, H. J. A. Polissacarídeo não amiláceo solúvel na dieta de suínos e aves. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 5, n. 5, p. 673-689, 2008.
121. TURRA, F. **Mercado mundial de frango e ovos**. Revista Aveworld, Campinas, n. 41, p. 12-14, 2009.
122. UNI, Z.; GANOT, S.; D. SKLAN. Posthatch development of mucosal function in the broiler small intestine. **Poultry Science**, v. 77, p. 75-82, 1998.

123. VALLE, F. L. P.; ROCHA, C.; BURATTO, R. N.; MAYER, A. N.; MORAES, M. T. T.; MAIORKA, A. Suplementação de protease em dietas contendo ou não ingredientes de origem animal sobre o desempenho de frangos de corte. **Anais do Prêmio Lamas 2010**, 1p.
124. VATS, P. & BANERJEE, U. C. Production studies and catalytic properties of phytases (myo-inositolhexakisphosphate phosphohydrolases): an overview. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 3-14, 2004.
125. VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. Solid State Fermentation: Definition, Characteristics, limitations and monitoring. In: ROUSSOS, S.; LONSAN, E. B. K.; RAIMBAULT, M.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. (Eds). **Advances in Solid State Fermentation**. Kluwer Academic Publishers, 1997. cap. 2, p. 5-22.
126. WAINWRIGHT, M. **Introducción a la biotecnología de los hongos**. Zaragoza: Acribia, 1995, 228 p.
127. YOUNG, H. D. & FREEDMAN, R. A. **Física II: termodinâmica e ondas**. 12^a ed. São Paulo: Addison Wesley, 2008.
128. YOUSSEF, A. W.; HASSAN, H. M. A.; ALI, H. M.; MOHAMED, M. A. Performance, abdominal fat and economic efficiency of broilers fed different energy levels supplemented with xylanase and amylase from 14 to 40 days of age. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 7, n. 3, p. 291-297, 2011. Disponível em: <http://wwwZ-1054/Publico/texto%20completo.pdf>. Acesso em: 09 maio 2013.
129. ZANELLA, I. **Suplementação enzimática em dietas a base de milho e soja processadas sobre a digestibilidade de nutrientes e desempenho de frangos de corte**. 1998. 179 f. Tese (Doutorado em Zootecnia - Produção Animal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
130. ZANELLA, I.; SAKOMURA, N. K.; SILVERSIDES, F. G.; FIQUEIRDO, A.; PACK, M. Effect of enzyme supplementation of broiler diets based on corn and soybeans. **Poultry Science**, v. 78, n. 4, p. 561-568, 1999.
131. ZANNI, A. **Boletim informativo do setor de alimentação animal**. SINDIRAÇÕES, maio 2013. 8p. Disponível em: <http://sindiracoes.org.br/sindiracoes-publica-o-boletim-informativo-do-setor-maio-2013>. Acesso em: 23 jun. 2013.
132. ZIGGERS, D. **World enzyme demand to reach \$7.6 billion by 2015**. 2012. Disponível em: <http://www.allaboutfeed.net/Nutrition/Feed-Additives/2012/2/World-enzyme-demand-to-reach-76-billion-by-2015-AAF012787WFeb2012>. Acesso em: 26 jul. 2013.
133. ZIMMER, K. R.; BORRÉ, G. L.; TRENTIN, D. S.; WOICICKOSKI JR., C.; FRASSON, A. P.; GRAEFF, A. A.; GOMES, P.; MACEDO, A. J. Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico. **Revista Liberato**, v. 10, n. 14, p. 123-137, 2009.

CAPÍTULO II

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE AMILASE DE *Aspergillus awamori*

RESUMO

Os objetivos deste trabalho foram produzir e caracterizar amilase de *Aspergillus awamori*. Para isso, produziu-se amilase em meio de cultura contendo milho triturado e farelo de soja, como fontes de carbono, incubação durante 48 horas, a 30°C e velocidade de 120 rpm. A amilase obtida apresentou atividade enzimática de 3,66 U.mL⁻¹. A temperatura ótima de atividade foi 60°C e 100% de atividade em pH 5,6, apresentando estabilidade térmica, com aumento de 88,64% de sua atividade em 120 minutos, em relação ao tempo de zero hora. A adição da amilase na ração pré-inicial aumentou cerca de 60 e 80% as concentrações de proteína solúvel e açúcar redutor, respectivamente. Já na fase inicial, dobrou a concentração de açúcar redutor e reduziu em 17,6% a de proteína solúvel. A amilase produzida pelo fungo *Aspergillus awamori* apresentou estabilidade nos pHs fisiológicos e em temperatura que se assemelha a das aves.

Palavras-chave: caracterização bioquímica, enzima, pH, temperatura

CHAPTER II

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF AMYLASE FROM *Aspergillus awamori*

ABSTRACT

The objectives of this study were to produce and characterize amylase from *Aspergillus awamori*. We used culture medium containing ground corn and soybean meal as carbon source for 48 hours of incubation at 30°C and at a speed of 120 rpm. Amylase obtained showed enzymatic activity of 3.66 U.mL⁻¹. The optimum temperature for activity was 60°C and 100% activity at pH 5.6, with thermal stability, with 88.64% increase of its activity at 120 minutes compared to time zero. The addition of amylase to the pre-starter diet increased approximately in 60 and 80% the concentrations of soluble protein and reducing sugar, respectively. In the starter phase, it doubled the concentration of reducing sugar and reduced in 17.6% the concentration of the soluble protein. The amylase produced by *Aspergillus awamori* was stable at physiological pH and temperature similar to the ones of the birds.

Keywords: biochemical characterization, enzyme, pH, temperature

1 INTRODUÇÃO

Aspergillus é um gênero de fungo pertencente ao filo Ascomycota, ordem Eurotiales e família Trichocomaceae. Existem aproximadamente 200 espécies de *Aspergillus* distribuídas na natureza, particularmente na vegetação em decomposição e no solo. As espécies mais conhecidas são o *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. nidulans*, *A. fumigatus*, *A. clavatus*, *A. glaucus*, *A. versicolor* e *A. awamori* (SOUSA-MOTA et al., 2005).

O *Aspergillus awamori* (Figura 1) é utilizado industrialmente para a produção de enzimas amilolíticas (ALMEIDA et al., 2009) e seu uso na fabricação de produtos alimentícios é vantajoso, pois esse micro-organismo é considerado seguro, não tóxico e não patogênico (CUI et al., 1998).

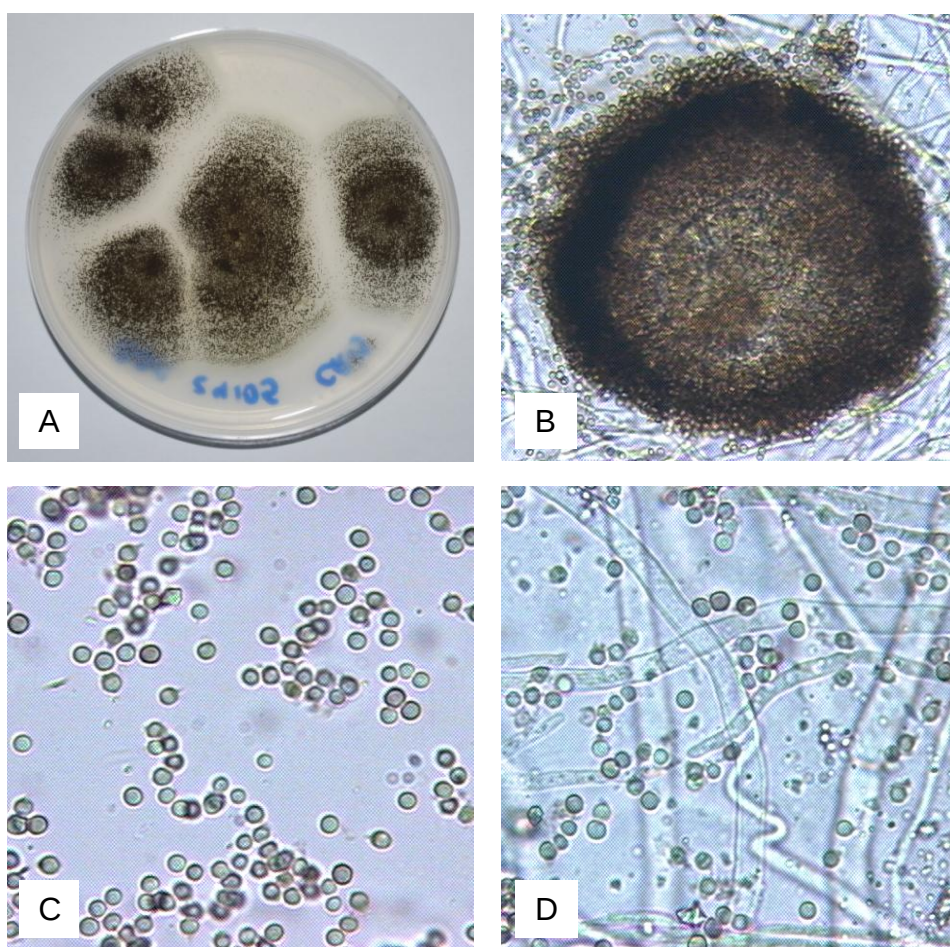


FIGURA 1 - *Aspergillus awamori* em placa de petri (A), métula envolvida por esporos (B - 20x), esporos (C - 40 x) e hifas/esporos (D - 40x)

O uso de enzimas exógenas para reduzir os custos das rações, representa, sem dúvida, uma das alternativas mais versáteis para auxiliar na melhoria da rentabilidade da avicultura (LIMA et al., 2007). Além disso, outro motivo para se utilizar enzimas nas dietas para aves é a redução de substâncias poluentes que podem ser excretadas em maior ou menor quantidade, dependendo da formulação das rações (COSTA et al., 2004)

No entanto, segundo MINAFRA (2007), para se utilizar enzimas na alimentação de aves é necessário saber o seu comportamento em diferentes temperaturas, intervalos de pH e sua estabilidade térmica para que não ocorra a desnaturação da enzima durante o processamento da ração e no trato gastrointestinal.

A caracterização das suas atividades deve ser o primeiro passo na seleção de enzimas. Essa caracterização deve ser conduzida sob condições definidas de tempo, de pH, de temperatura, da sua concentração e do substrato, pois esses fatores podem afetar a atividade enzimática (BEUCHEMIN et al., 2003; COLOMBATTO et al., 2003a).

Pouca atenção era dada a esses fatores e, evidentemente, a observação da temperatura e do pH é inquestionável, pois a atividade enzimática pode variar amplamente em condições diferentes daquelas consideradas ótimas para sua atuação (COLOMBATTO et al., 2003b). Além disso, alguns fatores influenciam a atuação das enzimas no organismo animal, destacando-se o processamento da ração, o pH do meio, o comprimento do trato gastrointestinal, o grau de hidratação, a temperatura corporal, a suscetibilidade da enzima exógena ao ataque das endógenas, a concentração do produto e o tipo de ingrediente utilizado na ração (STRADA et al., 2005).

Em relação ao pH e ao tempo de passagem do alimento no trato digestório de aves, GAUTHIER (2007) relata que no papo é de 5,5 e o tempo de 50 minutos, no proventrículo e moela de 2,5 a 3,5 e 90 minutos, no duodeno 5,0 a 6,0 e tempo de 5 a 8 minutos, no jejuno 6,5 a 7,0 e tempo de 20 a 30 minutos, íleo o pH varia de 7,0 a 7,5 e o tempo de 50 a 70 minutos, no reto pH 8,0 e tempo de 25 minutos.

A digestão final do alimento e a absorção de nutrientes ocorrem no intestino delgado, ou seja, no duodeno, jejuno e íleo (BOLELI et al., 2002), sendo

que o tempo de passagem nesses segmentos é de cerca de 100 minutos (GAUTHIER, 2007).

Segundo LIMA et al. (2002), as enzimas limitam sua capacidade catalítica às condições ambientais sob as quais elas atuam. O sucesso da utilização das enzimas exógenas necessita de conhecimento sobre os possíveis substratos a serem hidrolisados, juntamente com as condições nas quais as reações são realizadas.

Frente ao exposto, objetivou-se produzir e caracterizar parcialmente a amilase utilizando o fungo *Aspergillus awamori*, dosar o conteúdo de proteína total, determinar a atividade enzimática, as concentrações de proteína solúvel e de açúcar redutor nas rações pré-inicial e inicial para frangos de corte.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Linhagem do fungo e produção de amilase

A produção de amilase foi realizada no Laboratório de Enzimologia e de Fisiologia da Digestão, do Instituto de Ciências Biológicas/ICB II, da Universidade Federal de Goiás. Para isso, utilizou-se uma linhagem do fungo filamentoso *Aspergillus awamori*, proveniente do Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília (UnB). Para o cultivo e manutenção do fungo foi utilizado meio de cultura constituído de extrato de malte 3,0% e Ágar 2,0% (MEX), autoclavado a 120°C por 20 minutos.

Três discos de cultura com 5 mm de diâmetro, contendo micélio vegetativo e esporos de *Aspergillus awamori*, foram retirados das placas de *petri* e inoculados em erlenmeyers de 2,0 L, contendo 500 mL de meio de indução (extrato de levedura 10 g.L⁻¹; CaCl₂.2H₂O 0,1 g.L⁻¹; sulfato de magnésio 0,5 g.L⁻¹; sulfato de ferro 0,1.L⁻¹; KH₂PO₄ 0,2 g.L⁻¹; milho triturado 0,5% e farelo de soja 0,5%). Os erlenmeyers foram colocados em agitador rotatório (*Controlled Environment Incubator Shacker, Brunswick Scientific Co. Inc., U.S.A*) à 30°C e velocidade de 120 rpm.

Após 48 horas, o extrato foi filtrado a vácuo e alíquotas foram retiradas e centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos, para determinação da concentração de proteína total e ensaio enzimático. O filtrado foi transferido para recipiente plástico e armazenado em congelador ($- 8^{\circ}\text{C}$) para posterior utilização nos experimentos de campo.

2.2 Dosagem de proteína total

A concentração de proteína total foi determinada pelo método de BRADFORD (1976), utilizando albumina sérica (sigma[®]) como padrão. A reação foi conduzida utilizando 100 μL da amostra e 1 mL do reagente de Bradford e incubado a temperatura de 25°C por 15 minutos. A leitura foi feita em espectrofotômetro (Spectrum SP-2000 UV) a 595 nm. A amostra "branco" foi feita seguindo todos os procedimentos descritos, substituindo a amostra enzimática por água destilada.

2.3 Determinação da atividade amilolítica

A atividade de amilase foi determinada pelo método sacarificante que se baseia na produção de açúcar redutor (MILLER, 1959). Para isso, à solução de 40 μL de tampão citrato-fosfato (50 mmol. L^{-1}) foram adicionados 60 μL da amostra enzimática e 100 μL de solução de amido solúvel 0,5% (Cromoline[®]). A mistura foi incubada a 40°C por 20 minutos. Posteriormente, 1,0 mL de reagente ácido dinitrosalicílico $\{10 \text{ g.L}^{-1}$ ácido dinitrosalicílico (ADNS), 100 mL de NaOH (2 mmol.L^{-1}), 300 g.L^{-1} de tartarato de sódio e potássio $\}$ foi adicionado nos tubos de ensaio. A mistura foi mantida por 10 minutos em banho-maria a 96°C e a absorbância determinada a 550nm. A quantidade de açúcar redutor formado foi calculada de acordo com uma curva padrão de glicose (MILLER, 1959). Uma unidade (U) de atividade sacarificante foi definida como a quantidade de enzima que libera 0,1 mg de açúcar redutor por minuto de reação.

2.4 Caracterização bioquímica

2.4.1 Determinação do pH ótimo

Tendo em vista as variações de pH no trato gastrointestinal (GAUTHIER, 2007) e a temperatura internas das aves, em torno de 40°C (MINAFRA, 2007), a atividade de amilase em diferentes concentrações hidrogeniônicas foi avaliada.

Amostras de amilase foram incubadas em tampão citrato-fosfato 50 mmol.L⁻¹, nos pHs 2,6; 3,2; 4,0; 4,6; 5,0; 5,6; 6,0; 6,4 e 7,0, a 40°C, por 10 minutos, conforme item 2.3.

2.4.2 Determinação da temperatura ótima

A temperatura ótima foi verificada pela incubação das amostras de amilase em tampão citrato-fosfato 50 mmol.L⁻¹, no pH ótimo (5,6), em banho-maria a 30, 40, 50 e 60°C, durante 10 minutos, seguindo protocolo do item 2.3.

2.4.3 Determinação da estabilidade térmica

Na avaliação da estabilidade térmica da amilase, os ensaios foram realizados na temperatura de 50°C e pH 5,0, nos tempos de 0, 30, 60 e 120 minutos, de acordo com item 2.3.

2.5 Dosagem de proteína solúvel e de açúcar redutor nas rações

As concentrações de proteína solúvel e de açúcar redutor nas rações pré-inicial e inicial (TABELA 1), com e sem amilase, foram determinadas utilizando 0,15 g de cada tipo de ração. Essas amostras foram diluídas em 2 mL de água destilada, homogeneizadas e centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Em seguida, foram retiradas do sobrenadante alíquotas de 100 µL e

determinadas as concentrações de proteína solúvel, segundo BRADFORD (1976), e açúcar redutor pelo método do ADNS, conforme MILLER (1959), em triplicata.

TABELA 1 - Composição (%) e níveis nutricionais das rações pré-inicial e inicial

Ingrediente	Pré-Inicial	Inicial
Milho	55,24	59,35
Farelo de soja	38,26	34,78
Óleo vegetal	2,24	2,21
Fosfato bicálcico	1,91	1,51
Calcário	0,90	0,91
Sal comum	0,50	0,47
DL-Metionina	0,36	0,29
L-Lisina HCL	0,28	0,22
L-Treonina	0,11	0,06
Vitamina ¹	0,10	0,10
Mineral ¹	0,05	0,05
Anticoccidiano	0,05	0,05
Total	100,00	100,00
Nível nutricional calculado		
Proteína bruta (%)	22,2	20,8
EM (Mcal/kg)	2,95	3,00
Lisina dig. aves (%)	1,31	1,17
Treonina dig. aves (%)	0,85	0,76
Metionina + Cistina(%)	0,94	0,84
Triptofano dig. aves	0,25	0,23
Cálcio (%)	0,92	0,81
Fósforo disponível (%)	0,47	0,39
Cloro (%)	0,33	0,31
Sódio (%)	0,22	0,21

¹Suplementos vitamínico e mineral (garantia por kg de produto): Vitamina A 11.000.000 UI; Vit. D3 2.000.000 UI; Vit. E 16.000 UI; Vit. B1 1.200 mg; Vit. B2 4.500 mg; Vit. B6 2.000 mg; Vit. B12 16.000 mcg; Ácido Pantotênico 9.200 mg; Biotina 60 mg; Niacina 35.000 mg; Selênio 250 mg; Cobre 18.000 mg; Ferro 60.000 mg; Iodo 2.000 mg; Manganês 106.000 mg e Zinco 120.000 mg

A equação usada para determinar a concentração proteica, em função da absorvância, medida a 595 nm, foi $X = (y - 0,0082)/0,00399$, em que X = Concentração proteica (mg.mL⁻¹) e y = Absorvância da amostra.

Para a dosagem de açúcar redutor, a absorvância foi determinada a 540 nm. A conversão dos valores de absorvância em μ mol foi feita através da equação $X = 1,054y + 0,162$, em que X = Concentração de açúcar redutor (μ mol.mL⁻¹) e y = Absorvância da amostra.

2.6. Análise estatística

Nas análises estatísticas utilizou-se o software SISVAR (FERREIRA, 2007). Os dados das concentrações de proteína solúvel e açúcar redutor nas rações foram submetidos à ANOVA e teste F ao nível de 5% de probabilidade de erro. Com os valores da atividade amilolítica e da caracterização bioquímica foram calculados a média e o desvio padrão.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Dosagem de proteína total e da atividade amilolítica

Observou-se que a quantidade de proteína total foi de $31,68 \text{ U.mg}^{-1}$, considerando que o tempo de produção enzimática foi de 48 horas. A atividade enzimática foi de $3,66 \text{ U.mL}^{-1}$ e específica $0,12 \text{ U.mg}^{-1}$. Esta medida exprime o número de unidades enzimáticas por miligrama de proteína total.

A atividade de amilase de *Aspergillus awamori*, de $3,66 \text{ U.mL}^{-1}$, observada neste estudo foi inferior as encontradas por PRAKASHAM et al. (2007) que obtiveram atividade de 738 U.mL^{-1} , quando utilizaram meio de cultivo líquido com 3% de amido.

NEGI & BANERJEE (2010) verificaram atividade de amilase de $4528,4 \text{ U.mL}^{-1}$ de *Aspergillus awamori* cultivado em farelo de trigo, com 96 horas de incubação. Essa atividade foi cerca de 1200 vezes maior do que a verificada neste trabalho. As variações de atividade enzimática podem ser atribuídas à linhagem do fungo e as técnicas de produção utilizadas.

3.2 Caracterização bioquímica

Verificou-se que a amilase teve 100% de atividade enzimática em pH 5,6. Além disso, a enzima manteve atividade de cerca de 60% nos pHs de 6,0; 6,4 e 7,0 (Figura 2). Resultado semelhante para pH ótimo foi relatado por NEGI &

BANERJEE (2010), quando estudaram a produção de amilase por *Aspergillus awamori*. Entretanto, meios mais ácidos para a produção dessa enzima por *A. awamori* foram considerados ótimos por PRAKASHAM et al. (2007) e NEGI & BANERJEE (2010).

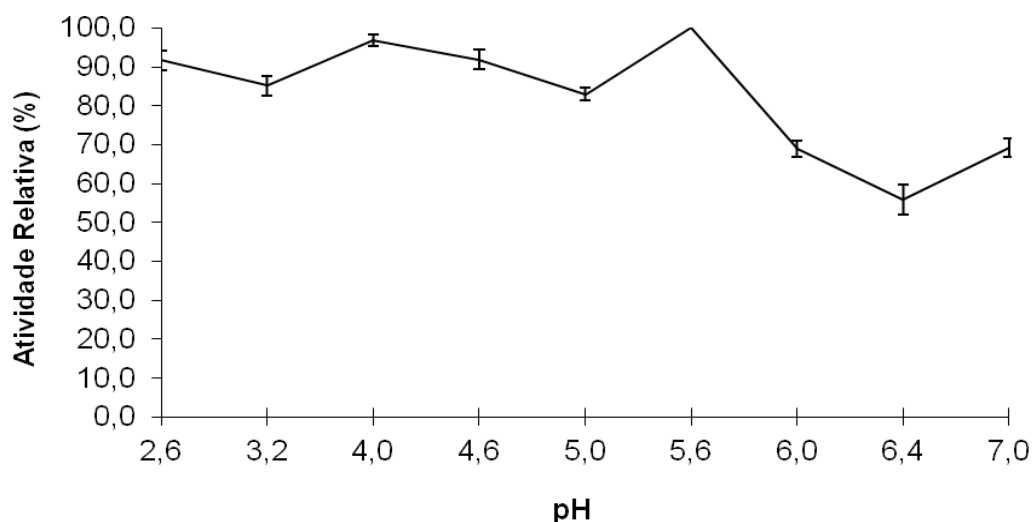


FIGURA 2 - Atividade relativa (%) de amilase produzida por *Aspergillus awamori* em função do pH

Nesse aspecto, considerando que o pH no trato gastrointestinal das aves varia de 2,5 a 8,0 (GAUTHIER, 2007) e que a maioria das rações apresenta pH por volta de 6,0 a 6,4 (MINAFRA, 2007), o uso de amilase produzida por *Aspergillus awamori* é viável, tendo em vista que a enzima permanecerá estável.

Para o fator temperatura, verificou-se que a enzima apresentou 97,6, 99,3 e 100% de sua atividade, a 40, 50 e 60°C, respectivamente (Figura 3).

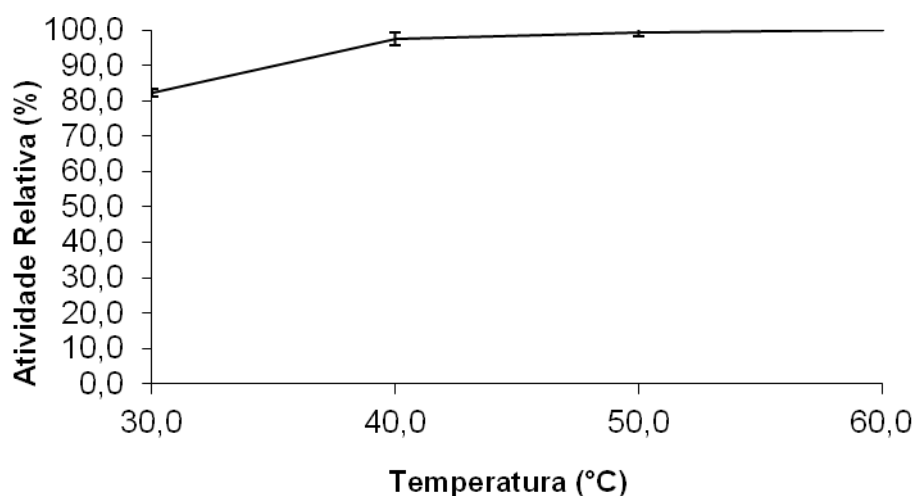


FIGURA 3 - Atividade relativa (%) de amilase produzida por *Aspergillus awamori* em função da temperatura de incubação

Resultado semelhante foi verificado por NEGI & BANERJEE (2009) quando avaliaram a produção de amilase por *Aspergillus awamori* em meio de cultura com farelo de trigo. Temperaturas ótimas mais baixas foram relatadas por PRAKASHAM et al. (2007) e NEGI & BANERJEE (2010).

O resultado obtido neste estudo é importante uma vez que as aves, nos períodos pré-inicial (um a sete dias) e inicial (oito a 21 dias), apresentam temperatura interna de aproximadamente 40°C (MINAFRA, 2007).

A amilase produzida por *Aspergillus awamori* permaneceu estável durante a incubação, mantendo 88,64% de sua atividade em 120 minutos, em relação ao tempo inicial (Figura 4). Esse resultado é semelhante ao verificado por (MINAFRA, 2007), quando avaliou amilase produzida por *Cryptococcus flavus*. Esses resultados indicam que a enzima pode passar pelo trato digestório sem que ocorra desnaturação enzimática.

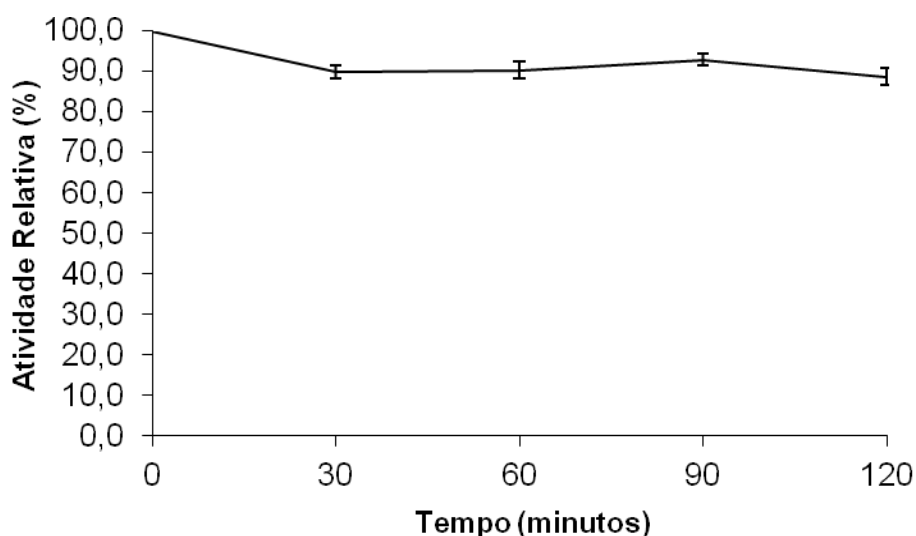


FIGURA 4 - Atividade relativa (%) de amilase produzida por *Aspergillus awamori* em função do tempo de incubação a 40°C

3.3 Dosagem de proteína solúvel e de açúcar redutor nas rações

Na ração pré-inicial, a adição de amilase produzida por *Aspergillus awamori* aumentou 60,6 e 80,4% a concentração proteica e de açúcar redutor nas rações, respectivamente. Já na ração inicial, a suplementação enzimática aumentou cerca de 100% a concentração de açúcar redutor e reduziu em 17,6% a concentração de proteína (Tabela 2).

TABELA 2 - Concentração de proteína solúvel e de açúcar redutor nas rações pré-inicial e inicial para frangos de corte

Concentração	Tratamento		CV (%)	P
	Controle	Ração + enzima		
<u>Ração pré-inicial</u>				
Proteica (mg.mL ⁻¹)	31,98A	51,36B	8,77	0,0029
Açúcar redutor (μmol.mL ⁻¹)	0,506A	0,913B	2,76	<0,0001
<u>Ração inicial</u>				
Proteica (mg.mL ⁻¹)	66,57A	54,87B	7,44	0,0337
Açúcar redutor (μmol.mL ⁻¹)	0,567A	1,276B	1,66	<0,0001
Médias seguidas, na linha, de letras distintas diferem pelo teste F a 5%				

Os dados encontrados para o conteúdo de açúcar redutor nas rações pré-inicial e inicial mostram que a amilase agiu na quebra dos nutrientes das dietas, liberando mais energia para as aves.

Resultados semelhantes ao verificados neste trabalho, para a concentração de açúcar redutor, foram obtidos por MARQUES (2007) quando estudou a adição de complexo enzimático obtido de *Trichoderma harzianum* em rações à base de milho e farelo de soja e MINAFRA (2007) suplementando milho e farelo de soja com amilase. Esses resultados são importantes, pois comprova a especificidade da enzima pelo substrato (MARQUES, 2007). Além disso, a liberação de açúcar redutor tem efeito direto na melhoria da nutrição das aves (MINAFRA, 2007).

Em relação à concentração proteica, MARQUES (2007) não observou efeito da suplementação enzimática em rações com ingredientes de origem animal ou vegetal, coletadas no 7º e 21º dias de criação.

4. CONCLUSÕES

Os dados obtidos neste trabalho mostraram que a amilase produzida pelo fungo *Aspergillus awamori* apresentou estabilidade nos pHs fisiológicos e em temperatura que se assemelha a das aves.

REFERÊNCIAS

1. ALMEIDA, M. C. O.; CRUZ, M. L.; CARDOSO, J. L.; LIMA, W. J. N. **Análise da produção de amiloglucosidase e alfa-amilase por *Aspergillus awamori* através de fermentação batelada em frascos agitados**. 2009. Disponível em: <http://www.cobeqic2009.feq.ufu.br/uploads/media/78622101.pdf>. Acesso em: 16 de fev. 2013.
2. BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

3. BEAUCHEMIN, K. A.; COLOMBATTO, D.; MORGAVI, P. D.; YANG, Z. W. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. **Journal of Animal Science**, v. 81, supl. 2, p. 37-47, 2003.
4. BOLELI, I. C.; MAIORKA, A.; MACARI, M. Estrutura funcional do trato digestório. In: MACARI, M.; FURLAN, R. L.; GONZALES, E. (Eds). **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 2002. p. 75-95.
5. COLOMBATTO, D.; MOULD, F. L.; BHAT, M.K.; PHIPPS, R. H.; OWEN, E. In vitro evaluation of fibrolytic enzymes as additives for maize (*Zea mays* L.) silage III. Comparison of enzymes derived from psychrophilic, mesophilic or thermophilic sources. **Animal Feed Science and Technology**, v. 111, p. 145-159, 2003a.
6. COLOMBATTO, D.; MOULD, F. L.; BHAT, M. K.; PHIPPS, R. H.; OWEN, E. In vitro evaluation of fibrolytic enzymes as additives for maize (*Zea mays* L.) silage II. Effects on rate of acidification, fiber degradation during ensiling and rumen fermentation thermophilic sources. **Animal Feed Science and Technology**, v. 111, p. 129-143, 2003b.
7. COSTA, F. G. P.; CLEMENTINO, R. H.; JÁCOME, I. M. T. D.; NASCIMENTO, G. A. J.; PEREIRA, W. E. Utilização de um complexo multienzimático em dietas de frangos de corte. **Ciência Animal Brasileira**, v. 5, n. 2, p. 63-71, 2004.
8. CUI, Y. Q.; VAN DER LANS, R. G. J. M.; GIUSEPPIN, M. L. F.; LUYBEN, K. C. A. M. Influence of fermentation conditions and scale on the submerged fermentation of *Aspergillus awamori*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, p. 157-167, 1998.
9. FERREIRA, D. F. **Sisvar: sistema de análise de variância para dados balanceados, versão 5.1 Build 72**. Lavras: DEX/ UFLA, 2007.
10. GAUTHIER, R. **Organic acids and essential oils, let's not be chicken with antibiotic growth promoter free poultry!** Poultry Service Industry Workshop October 2nd - 4th, 2007. Disponível em: <http://poultryworkshop.com/uploads/PDFs/PSIW%20proceedings%202007.pdf>. Acesso em: 22 ago. 2013.
11. 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**, v.1, n. 4, p. 99-110, 2007.
12. LIMA, A. C. F.; MACARI, M.; PIZAURO JÚNIOR, J. M.; MALHEIROS, E. B. Atividade enzimática pancreática de frangos de corte alimentados com dietas contendo enzimas ou probióticos. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 4, n. 3, p. 1-9, 2002.
13. MARQUES, S. F. F. **Biotecnologia enzimática: produção de complexo multienzimático de *Trichoderma harzianum* e sua aplicação na alimentação de frangos de corte**. 2007. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade Federal de Goiás, Goiânia. Disponível em: http://ppgca.vet.ufg.br/uploads/67/original_Dissertacao2007_Sonaide_Marques.pdf. Acesso em: 23 fev. 2013.
14. MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

15. MINAFRA, C. S. **Produção e suplementação com α -amilase de *Cryptococcus flavus* e *Aspergillus niger* HM2003 na dieta de frangos de corte de um a 21 dias de idade.** 2007. 124 f. Tese (Doutorado em Bioquímica Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. Disponível em: http://www.tede.ufv.br/tedesimplificado/tde_arquivos/27/TDE-2008-02-29T125750Z-1054/Publico/texto%20completo.pdf. Acesso em: 09 maio 2013.
16. NEGI, S. & BANERJEE, R. Study of conformational changes in glucoamylase of *Aspergillus awamori* nakazawa in presence of denaturants through CD-spectroscopy. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 19, p. 7577-7580, 2010.
17. NEGI, S. & BANERJEE, R. Characterization of amylase and protease produced by *Aspergillus awamori* in a single bioreactor. **Food Research International**, v. 42, n. 4, p. 443-448, 2009.
18. PRAKASHAM, R. S.; SUBBA RAO, C. H.; SREENIVAS RAO, R.; SARMA, P. N. Enhancement of acid amylase production by an isolated *Aspergillus awamori*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 1, p. 204-211, 2007.
19. SOUZA-MOTTA, C. M.; CAVALCANTI, M. A. Q.; PORTO, A. L. F.; MOREIRA, K. A.; LIMA FILHO, J. L. *Aspergillus niveus* Blochwitz 4128URM: new source for inulinase production. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 3, p. 343-350, 2005.
20. STRADA, E. S. O.; ABREU, R. D.; OLIVEIRA, G. J. C.; COSTA, M. C. M. M.; CARVALHO, G. J. L.; FRANCA, A. S.; CLARTON, L.; AZEVEDO, J. L. M. Uso de enzimas na alimentação de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 34, n. 6, p. 2369-2375, 2005. (supl)

CAPÍTULO III

ADIÇÃO DE AMILASE PRODUZIDA POR *Aspergillus awamori* NAS DIETAS PRÉ-INICIAL E INICIAL DE FRANGOS DE CORTE: desempenho, metabolizabilidade dos nutrientes e viscosidade

RESUMO

Avaliou-se os efeitos da adição de amilase produzida por *Aspergillus awamori* em dietas pré-inicial e inicial sobre o desempenho, a metabolizabilidade dos nutrientes e as viscosidades das rações e das digestas de frangos de corte. Em cada experimento foram alojados 120 pintos de corte, machos, da linhagem Cobb, distribuídos em delineamento inteiramente casualizado, com dois tratamentos (ração com ou sem enzima), com seis repetições e 10 aves por unidade experimental. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade. Na fase pré-inicial, a suplementação das dietas com amilase aumentou o consumo de ração em 26,53%, piorou a conversão alimentar em 17,26% e não afetou o consumo de água, o peso final e o ganho de peso. Além disso, reduziu o balanço de nitrogênio em 15,44% e não afetou a metabolizabilidade da matéria seca e do extrato etéreo. Na fase inicial, a aplicação de amilase na ração reduziu o consumo de água em 4,47% e não afetou os outros parâmetros de desempenho. Ainda, nesse período, piorou a metabolizabilidade da matéria seca (1,54%), do extrato etéreo (0,67%) e o balanço de nitrogênio (11,64%). As viscosidades das rações e das digestas, nos dois experimentos, não foram afetadas pela aplicação de amilase nas rações. A aplicação de amilase produzida por *Aspergillus awamori* em dietas pré-inicial e inicial não se justifica tendo em vista os resultados dos parâmetros de desempenho e da metabolizabilidade das dietas para frangos de corte.

Palavras-chave: aves, enzima, farelo de soja, milho

CHAPTER III

ADDITION OF AMYLASE PRODUCED BY *Aspergillus awamori* TO PRE-STARTER AND STARTER DIETS FOR BROILERS: performance, nutrients metabolism and diets and digesta viscosity

ABSTRACT

We evaluated the effects of addition of amylase produced by *Aspergillus awamori* to pre-starter and starter diets on performance, nutrient metabolism and diets and digesta viscosity. In each experiment we housed 120 male Cobb broiler chicks, distributed in a completely randomized design with two treatments (diets with or without enzyme) and six replicates of 10 broilers per experimental unit. Data were submitted to analysis of variance by F-test at 5% probability. In pre-starter phase, diet supplementation of amylase increased feed intake in 26.53%, decreased feed conversion in 17.26%, but did not affect water consumption water, final weight and weight gain. Furthermore, it reduced nitrogen balance in 15.44% and did not affect the metabolism of dry matter and ether extract. In the starter phase, the addition of amylase to the diet reduced water intake in 4.47% and did not affect the other performance parameters. Moreover, in this stage, there was a decrease in metabolizability of dry matter (1.54%) and ether extract (0.67%) and in nitrogen balance (11.64%). The viscosity of diets and digesta in the two experiments was not affected by the addition of amylase to the diets. The addition of amylase produced by *Aspergillus awamori* to pre-starter and starter diets is not justified in view of the results of performance parameters and metabolism of diets for broilers.

Keywords: broilers, corn, enzyme, soybean meal

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, as rações para frangos são constituídas de alimentos de origem vegetal, principalmente o milho e o farelo de soja. A utilização dos nutrientes do milho pelas aves é considerada alta, mas nem todo conteúdo nutricional desse ingrediente é usado em sua totalidade (OLUKOSI et al., 2007). Fato semelhante ocorre com o farelo de soja, que apresenta substâncias antinutricionais importantes em sua composição, que limitam o uso em sua plenitude pelo organismo das aves, restringindo a capacidade de aproveitamento dos nutrientes (CARDOSO et al., 2011).

Na busca pela utilização dos ingredientes alimentares de forma mais eficiente, a suplementação de alguns aditivos nas rações, principalmente enzimas exógenas e probióticos, tem sido empregada como alternativa nas dietas para aves (TORRES et al., 2003; SANTOS et al., 2012).

As enzimas podem favorecer o desempenho dos animais por atuarem no aumento da metabolizabilidade de nutrientes e, conseqüentemente, na diminuição da excreção de minerais, favorecendo o aproveitamento de nutrientes das dietas, a redução de problemas ambientais (CAIRES, et al., 2008) e, com isso, melhora os resultados produtivos (FISCHER et al., 2002; TORRES et al., 2003).

A metabolizabilidade de nutrientes das rações pode ser influenciada pela presença de enzimas e/ou fatores relacionados às matérias-primas que constituem a ração, tais como: a fertilidade do solo, o genótipo, as práticas culturais adotadas, os fatores climáticos durante o desenvolvimento, a colheita, o recebimento, o processamento, o armazenamento e a amostragem (BRUM et al., 2000; RODRIGUES et al., 2001; PARSAIE et al., 2006).

Em relação às matérias-primas que compõem as dietas, o milho e o farelo de soja representam cerca de 90% (CARDOSO et al., 2011) e, por isso, influenciam significativamente na qualidade da ração. O milho contribui com aproximadamente 65% da energia metabolizável e cerca de 20% da proteína (CARVALHO, et al., 2004).

O milho contém cerca de 75% de amido (FREITAS et al., 2005), que é facilmente digerido pelas aves (OPALINSKI, et al., 2011). Esse amido é constituído, em média, de 28% de amilose e 72% de amilopectina (MINAFRA, 2007), sendo que a amilopectina é mais fácil de ser digerida que a amilose (PENZ JR., 1998).

Em aves, somente a enzima amilase produzida pelo pâncreas pode hidrolisar o amido a unidades menores, passíveis de serem absorvidas. Essa enzima atua nas ligações glicosídicas do tipo α -1,4 (CARDOSO et al., 2011), liberando unidades de glicose, maltose, maltotriose, maltopentose e dextrinas (MINAFRA, 2007).

Em relação à produção endógena de amilase, LIMA et al. (2007), relatam que, em pintos, por apresentarem o trato digestório imaturo ao nascer, a quantidade de amilase produzida pelo pâncreas é baixa nos primeiros sete dias de vida. No entanto, a alimentação das aves nessa fase estimula a secreção de amilase (TAVERNARI & MENDES, 2009), sendo que a maior atividade dessa enzima é aos 14 dias de idade, coincidindo com o maior crescimento do pâncreas (SAKAMOTO et al., 2011).

GRACIA et al. (2003) estudaram os efeitos da adição de amilase em rações à base de milho e farelo de soja sobre frangos de corte machos Cobb e verificaram que a suplementação enzimática melhorou o desempenho e a metabolizabilidade das dietas.

Pesquisas envolvendo a aplicação de amilase em dietas para aves são numerosas. Entretanto, os resultados esperados nem sempre são alcançados e, em alguns casos, não se conseguiu comprovar a eficiência dessa prática (BRUM et al. 2008).

Visto a importância desses aspectos, realizou-se dois experimentos com o objetivo de estudar os efeitos da adição de amilase produzida por *Aspergillus awamori* sobre o desempenho, a metabolizabilidade de nutrientes e as viscosidades das rações e das digestas de frangos de corte.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Procedimentos gerais

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, em 12 de maio de 2011, sob o número 006/2012.

A amilase foi produzida nos Laboratórios de Enzimologia e de Fisiologia da Digestão, do Instituto de Ciências Biológicas/ICB II, da Universidade Federal de Goiás, utilizando uma linhagem de *Aspergillus awamori* proveniente do Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília (UnB).

Os ensaios foram conduzidos em duas épocas, caracterizando dois experimentos distintos, um na fase pré-inicial (Experimento 1) e outro na fase inicial (Experimento 2) de criação dos frangos de corte. Em cada experimento foram utilizados 120 pintos de corte, machos, da linhagem Cobb, distribuídos em delineamento inteiramente casualizado, com dois tratamentos (ração com e sem amilase) e seis repetições com 10 aves por unidade experimental.

As aves foram mantidas em três baterias de aço galvanizado, com quatro andares e divisões de 0,80 x 0,75 x 0,25 m (c x l x h), comedouro e bebedouro lineares, instaladas em galpão de alvenaria, situado nas instalações do Setor de Avicultura do Instituto Federal Goiano - Câmpus Ceres, cercado por uma mureta de concreto com 0,50 m de altura e tela de arame, protegido na parte externa por uma cortina de plástico trançado. A altura da mureta até o telhado é de 1,80 m.

O manejo do galpão e das baterias de gaiolas, antes da chegada dos pintos, obedeceu às normas usuais de limpeza e desinfecção. Além disso, a temperatura e a umidade internas do galpão foram monitoradas diariamente por meio de um termômetro de mínima e de máxima (Incoterm[®]) e outro digital (Incoterm[®]). Quando necessário, foi realizado manejo de cortinas para manter a temperatura adequada às aves.

Dentro do galpão experimental, as temperaturas médias, no período de um a sete dias de criação dos frangos de corte, foram mínima de 25,7 e máxima de 33,2°C. Enquanto que de oito a 21 dias, a média mínima foi 25,6 e a máxima

de 31,8°C. A umidade interna do galpão experimental no período de um a sete dias (Experimento 1) variou de 31 a 67%. Já do oitavo ao 21º dias (Experimento 2) a umidade oscilou de 31 a 75%. Esses valores ficaram dentro da normalidade para a época e a região de Ceres-GO, local em que foram conduzidos os experimentos.

As rações experimentais (Tabela 1) foram formuladas à base de milho e farelo de soja, atendendo as recomendações nutricionais e composição dos alimentos propostas por ROSTAGNO et al. (2011) e preparadas na fábrica de rações da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás.

As rações pré-inicial (Exp. 1) e inicial (Exp. 2) foram fabricadas 24 horas antes do início de cada experimento para evitar a contaminação por fungos. Para cada experimento foram preparadas uma dieta controle, com todos os ingredientes (Tabela 1) e outra sem o farelo de soja. Nessa segunda, quando do fornecimento da dieta às aves, a amilase foi aspergida, diariamente, no farelo de soja, na proporção de 120 mL para cada quilograma de ração, e em seguida os outros ingredientes foram adicionados e homogeneizados.

As aves receberam água e ração à vontade nos dois experimentos. Os comedouros foram abastecidos três vezes ao dia e os bebedouros duas vezes. Bandejas metálicas foram usadas para a retirada das excretas.

2.1.1 Experimento 1 - Fase pré-inicial

As aves, no primeiro dia de vida, foram pesadas e, com os valores obtidos, foram calculados a média e o desvio padrão do lote. As aves apresentaram peso médio de $41,83 \pm 1,29$ g. Após a pesagem os animais foram distribuídos em gaiolas aquecidas por lâmpadas incandescentes de 100 W.

2.1.2 Experimento 2 - Fase inicial

Para a condução deste experimento, aves com um dia de vida foram criadas em gaiolas até o 7º dia de vida, recebendo ração pré-inicial (Tabela 1), sem enzima. No 8º dia, os pintos foram pesados e com os valores obtidos

calculou-se a média e o desvio padrão do lote. As aves apresentaram peso médio de $153,90 \pm 14,62$ g. Após a pesagem, as aves foram distribuídas em gaiolas aquecidas por lâmpadas incandescentes de 60 W.

TABELA 1 - Composição (%) e níveis nutricionais das rações pré-inicial e inicial

Ingrediente	Pré-Inicial (1 a 7 dias)	Inicial (8 a 21 dias)
Milho	55,24	59,35
Farelo de soja	38,26	34,78
Óleo vegetal	2,24	2,21
Fosfato bicálcico	1,91	1,51
Calcário	0,90	0,91
Sal comum	0,50	0,47
DL-Metionina	0,36	0,29
L-Lisina HCL	0,28	0,22
L-Treonina	0,11	0,06
Vitamina ¹	0,10	0,10
Mineral ¹	0,05	0,05
Anticoccidiano	0,05	0,05
Total	100,00	100,00
Nível nutricional calculado		
Proteína bruta (%)	22,2	20,8
EM (Mcal/kg)	2,95	3,00
Lisina dig. aves (%)	1,31	1,17
Treonina dig. aves (%)	0,85	0,76
Metionina + Cistina(%)	0,94	0,84
Triptofano dig. aves	0,25	0,23
Cálcio (%)	0,92	0,81
Fósforo disponível (%)	0,47	0,39
Cloro (%)	0,33	0,31
Sódio (%)	0,22	0,21

¹Suplementos vitamínico e mineral (garantia por kg de produto): Vitamina A 11.000.000 UI; Vit. D3 2.000.000 UI; Vit. E 16.000 UI; Vit. B1 1.200 mg; Vit. B2 4.500 mg; Vit. B6 2.000 mg; Vit. B12 16.000 mcg; Ácido Pantotênico 9.200 mg; Biotina 60 mg; Niacina 35.000 mg; Selênio 250 mg; Cobre 18.000 mg; Ferro 60.000 mg; Iodo 2.000 mg; Manganês 106.000 mg e Zinco 120.000 mg

2.2 Desempenho

No experimento 1, fase pré-inicial, as rações foram pesadas no 1° e no 7° dias de vida, enquanto que no experimento 2, fase inicial, no 8° e 21° dias. As variáveis de desempenho avaliadas nessas fases de criação dos frangos de corte foram:

- consumo de ração: calculado pela diferença entre a quantidade de ração fornecida às aves e as sobras;
- consumo de água: calculado pela diferença entre a quantidade de água fornecida aos frangos de corte e as sobras;
- peso final: obtido dividindo-se o peso total das aves da parcela pelo número de aves;
- ganho de peso: calculado pela diferença entre o peso médio final e o peso médio inicial dos frangos de corte;
- conversão alimentar: calculada pela relação entre o consumo de ração e o ganho de peso das aves.

2.3 Ensaio metabólico

Os ensaios de metabolizabilidade foram realizados na primeira e na terceira semanas de idade das aves, utilizando o método descrito por CAFÉ (1993). Os três primeiros dias de cada semana foram destinados à adaptação das aves às rações experimentais. Do quarto ao sétimo e do 17° ao 21° dias foram coletadas as excretas, realizadas duas vezes ao dia. As dietas experimentais e as excretas coletadas foram acondicionadas em sacos plásticos, identificados, congelados (-10°C) e, posteriormente, processadas e analisadas em laboratório.

As análises bromatológicas das rações e das excretas foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal, do Departamento de Produção Animal, da Escola de Veterinária e Zootecnia, da Universidade Federal de Goiás. Para preparar as amostras de excretas, visando à realização das análises, de acordo com a metodologia proposta por SILVA & QUEIROZ (2002), alíquotas foram coletadas, identificadas e submetidas à pré-secagem em estufa de ventilação forçada a 55°C. Paralelamente, amostras das rações experimentais foram coletadas para, em seguida, serem, juntamente com as excretas, moídas em moinho tipo *Wiley* e usadas para determinar:

- a matéria seca das excretas a 55°C: determinada em estufa de ventilação forçada com temperaturas em torno de 55°C ± 5°C por 72 horas, sendo as análises realizadas em duplicata;
- a matéria seca das rações e das excretas a 105°C: determinada em estufa regulada à temperatura de 105°C, por um período de 12 horas, sendo as análises realizadas em duplicata;
- os níveis de nitrogênio total nas rações e nas excretas foram determinados utilizando-se o método de micro Kjeldahl e posteriormente, calculados os valores de proteína bruta. Os valores obtidos foram utilizados para quantificar a quantidade e a retenção de proteína bruta.
- a retenção de matéria seca - obtida pela quantidade de matéria seca ingerida subtraída da quantidade de matéria seca excretada; e
- o extrato etéreo - obtido usando o extrator tipo goldfish.

Os valores obtidos foram tabulados e utilizados como base para cálculo dos coeficientes de metabolizabilidade da matéria seca, do extrato etéreo e o balanço de nitrogênio, usando a equação de MATTERSON et al. (1965) $CMN = [(N_{ing} - N_{exc})/N_{ing}] \times 100$, em que: CMN (%) = Coeficiente de Metabolizabilidade do Nutriente; N_{ing} = Nutriente ingerido; e N_{exc} = Nutriente excretado.

2.4 Viscosidades das rações e das digestas

As viscosidades das rações e das digestas foram determinadas no Laboratório de Físico-Química e Inorgânica, do Instituto de Química (IQ), da Universidade Federal de Goiás.

Para a realização das análises de viscosidade das rações foi pesado 0,5 g das rações pré-inicial e inicial, contendo ou não amilase, e adicionado 1,5 mL de água destilada. Em seguida, esse material foi centrifugado a 3000 rpm e retirado 0,5 mL do sobrenadante que foi diluído em 14,5 mL de água. Essa diluição foi necessária, pois, para medição no viscosímetro, necessita-se de volume constante e final de 15 mL.

Uma ave de cada repetição, representando a média do grupo, dos experimentos de um a sete dias (Exp. 1) e de oito a 21 dias de criação (Exp. 2), foi sacrificada, por deslocamento cervical, para a coleta da digesta e posterior determinação da viscosidade. Imediatamente após a pesagem dos intestinos o conteúdo foi retirado, comprimindo manualmente da região cranial para caudal, que corresponde ao início da alça duodenal até a junção colo-íleo cecal, acondicionado em recipiente, identificado por tratamento e ave. Em seguida, esse material foi centrifugado a 3000 rpm por três minutos, a 4°C, retirado 0,50 mL do sobrenadante e diluído em 14,5 mL de água destilada.

Para determinação das viscosidades das rações e das digestas foi utilizado viscosímetro Cannon-Fenske Routine, capilar de 150 mm, com banho regulado à temperatura de 37°C, próxima à temperatura interna das aves (MARQUES, 2007; MINAFRA, 2007). Foram realizadas três determinações por amostra e o valor do tempo de escoamento da amostra obtido pela sua média. A fórmula utilizada para calcular a viscosidade foi: $\eta = 0,0129T$, em que η = Viscosidade da amostra, T = Tempo de escoamento da amostra e 0,0129 o valor da constante do viscosímetro.

2.5 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software SISVAR (FERREIRA, 2007). Com os dados da viscosidade das rações foram calculados a média e o desvio padrão. Os valores referentes ao desempenho, ao ensaio metabólico e à viscosidade das digestas foram submetidos à ANOVA e teste F ao nível de 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Desempenho

Nos dois experimentos não houve morte de aves. Na fase pré-inicial, experimento 1, o consumo de ração aumentou 26,53%, a conversão alimentar piorou 17,46%, o peso final, o ganho de peso e o consumo de água não foram afetados pela adição de amilase à ração (Tabela 2).

TABELA 2 - Desempenho dos frangos de corte alimentados com rações suplementadas ou não com amilase de *Aspergillus awamori*, no período de um a sete dias de criação

Parâmetros	Tratamentos		CV (%)	P
	Controle	Ração + enzima		
Consumo de ração (g)	122,1 ± 7,3A	154,5 ± 6,1B	5,15	0,0005
Consumo de água (mL)	359,9 ± 25,3	355,1 ± 23,2	3,88	0,570
Peso final (g)	138,7 ± 7,7	146,6 ± 8,4	7,36	0,250
Ganho de peso (g)	96,9 ± 7,5	104,7 ± 8,4	10,28	0,250
Conversão alimentar (kg.kg ⁻¹)	1,26 ± 0,10A	1,48 ± 0,08B	6,48	0,0017

Médias seguidas, na linha, de letras distintas diferem pelo teste F a 5%

A aplicação de amilase na ração pré-inicial pode ter beneficiado o consumo de ração que passou de 122,1 para 154,5 g.ave⁻¹, já que é reduzida a produção endógena de enzimas nessa fase (MORAN JR., 1985; NOY & SKLAN, 1995). Além disso, a aplicação de 120 mL de amilase à ração aumentou o peso da dieta em aproximadamente 120 g. Como consequência, para cada 100 g de ração consumida, a ave ingeriu cerca de 10 g de água. Esses valores podem ter influenciado os cálculos da quantidade consumida e da conversão alimentar.

Resultados semelhantes aos obtidos neste estudo foram verificados por MARQUES (2007) para o consumo de ração, o ganho de peso e a conversão alimentar, quando avaliou a aplicação de enzimas em diferentes dietas pré-iniciais

para frangos de corte. Entretanto, as aves que receberam ração com enzimas consumiram menos água (4,5%), conflitando com os resultados deste trabalho.

Segundo BARBOSA et al. (2012), a adição de enzimas em dietas com níveis nutricionais adequados não proporciona efeitos sobre o desempenho das aves, não justificando a suplementação *over the top*.

Na fase inicial, experimento 2, houve diferença significativa entre a ração com e sem amilase somente para o consumo de água (Tabela 3). As aves que receberam ração com enzima consumiram 4,47% menos água. As reduções de 4% no ganho de peso médio das aves e de 17,6% no conteúdo de proteína da ração que recebeu amilase podem ter influenciado na redução do consumo de água nessa fase de criação, já que existe uma estreita relação entre ganho de peso, conteúdo de proteína na ração e consumo de água (BRUNO & MACARI, 2002; LARBIER & LECLERCQ, 1994).

TABELA 3 - Desempenho dos frangos de corte alimentados com rações suplementadas ou não com amilase de *Aspergillus awamori*, no período de oito a 21 dias de criação

Parâmetros	Tratamentos		CV (%)	P
	Controle	Ração + enzima		
Consumo de ração (g)	1046,4 ± 80,3	1112,9 ± 48,4	5,97	0,1336
Consumo de água (mL)	1886,7 ± 50,3A	1802,3 ± 93,1B	2,52	0,0257
Peso final (g)	813,0 ± 746,6	785,5 ± 38,2	4,48	0,2411
Ganho de peso (g)	659,1 ± 47,3	631,6 ± 36,0	5,48	0,2392
Conversão alimentar (kg.kg ⁻¹)	1,60 ± 0,22	1,76 ± 0,12	10,7	0,1362

Médias seguidas, na linha, de letras distintas diferem pelo teste F a 5%

No período de oito a 21 dias de criação, a adição de amilase na ração inicial não afetou o consumo de ração, o peso final, o ganho de peso e a conversão alimentar de frangos de corte.

Resultados semelhantes aos obtidos neste estudo foram verificados por MARQUES (2007) para consumo de ração, ganho de peso e conversão alimentar, quando avaliou a aplicação de enzimas em diferentes dietas para

frangos de corte, na fase inicial. Os valores para o consumo de água foram diferentes dos verificados neste trabalho. Entretanto, o mesmo autor, verificou numericamente, redução (1,3%) no consumo de água das aves que receberam ração suplementada com 100 mL de enzimas.kg⁻¹ de ração.

Ao estudar a adição de amilase isolada ou em associação com xilanase, β -glucanase, α -galactosidase e galactomananase em ração para frangos de corte, fêmeas, da linhagem Cobb, CARDOSO et al. (2011) observaram que o consumo de ração e o ganho das aves não foram afetados pela suplementação enzimática. Além disso, a pior conversão alimentar foi obtida pelas aves submetidas à ração com enzimas.

Resultados discordantes dos obtidos neste trabalho foram verificados por LEITE et al. (2008) quando avaliaram o efeito da adição de complexo enzimático (Allzyme Vegpro[®]), composto por amilase, celulase e protease, em ração à base de milho e farelo de soja, no desempenho de frangos de corte machos, da linhagem Cobb. Esses autores observaram que houve melhora na conversão alimentar e no ganho de peso com a suplementação enzimática.

3.2. Ensaio metabólico

Na fase pré-inicial, experimento 1, a adição da amilase na ração para frangos de corte não afetou a metabolizabilidade da matéria seca e do extrato etéreo. Entretanto, piorou o balanço de nitrogênio (Tabela 4).

Resultados diferentes dos encontrados neste trabalho foram verificados por BALAMURUGAN et al. (2013), quando pesquisaram os efeitos da suplementação com amilase, xilanase e protease na metabolizabilidade de nutrientes em frangos de corte na fase de um a sete dias de idade. Esses pesquisadores verificaram que a metabolizabilidade da matéria seca e do extrato etéreo aumentaram nos tratamentos com enzimas.

TABELA 4 - Valores (%) dos coeficientes de metabolizabilidade da matéria seca (CMMS), do extrato etéreo (CMEE) e de balanço de nitrogênio (BN) em frangos de corte alimentados com ração contendo ou não amilase produzida por *Aspergillus awamori*, no período de um a sete dias de criação

Parâmetros	Tratamento		CV (%)	P
	Controle	Ração + enzima		
CMMS	76,40 ± 2,77	76,05 ± 1,14	2,78	0,7767
CMEE	87,72 ± 1,94	89,97 ± 1,63	2,02	0,0551
BN	70,31 ± 4,89A	59,45 ± 5,41B	7,96	0,0045

Médias seguidas, na linha, de letras distintas diferem pelo teste F a 5%

Na fase de oito a 21 dias de criação, experimento 2, a suplementação com amilase piorou a metabolizabilidade da matéria seca, do extrato etéreo e o balanço total de nitrogênio (Tabela 5).

TABELA 5 - Valores (%) dos coeficientes de metabolizabilidade da matéria seca (CMMS), do extrato etéreo (CMEE) e de balanço de nitrogênio (BN) em frangos de corte alimentados com ração contendo ou não amilase produzida por *Aspergillus awamori*, no período de oito a 21 dias de criação

Parâmetros	Tratamento		CV (%)	P
	Controle	Ração + enzima		
CMMS	86,77 ± 1,12A	84,89 ± 0,69B	0,77	0,0006
CMEE	93,69 ± 1,12A	92,47 ± 0,94B	0,84	0,0218
BN	80,65 ± 1,20A	71,26 ± 2,09B	2,24	<0,0001

Médias seguidas, na linha, de letras distintas diferem pelo teste F a 5%

Esses resultados são semelhantes aos obtidos por PUCCI et al. (2010), quando estudaram os efeitos da suplementação de amilase, celulase e protease em dietas à base de milho e farelo de soja e verificaram diminuição da metabolizabilidade da matéria seca e do extrato etéreo.

ROMERO et al. (2013) avaliaram os efeitos de complexo enzimático, composto por α -amilase, xilanase e protease, na metabolizabilidade da energia em frangos alimentados com ração à base de milho e farelo de soja e idade de 21 dias e verificaram que a adição de enzimas aumentou a metabolizabilidade da matéria seca e a energia metabolizável aparente corrigida. Esses resultados confrontam os obtidos neste estudo.

Resultados discordantes ao deste trabalho foram verificados por SANTOS et al. (2012) quando estudaram os efeitos de probiótico e das enzimas amilase + β -glucanase e xilanase nos parâmetros de metabolizabilidade em dietas à base milho e farelo de soja, com dois níveis de energia e aves criadas no período de 32 e 35 dias de idade. Esses autores observaram que a dieta com enzimas, isoladas ou combinadas com probiótico, não foi capaz de aumentar a metabolizabilidade das dietas.

Ao contrário da fase pré-inicial, as aves já tem o trato digestório desenvolvido e, conseqüentemente, a produção de amilase aumentada, não necessitando, portanto, de suplementação exógena. Além disso, pode ter ocorrido competição por sítio ativo ou mesmo o ataque das enzimas endógenas nas exógenas, o que não traria nenhum benefício às aves (CARDOSO et al., 2011).

3.3 Viscosidades das rações e das digestas

Os dados de viscosidade das rações e das digestas, expressos em centipoise (cPs), nas fases pré-inicial (Experimento 1) e inicial (Experimento 2) são apresentados na Tabela 6. A aplicação de amilase produzida por *Aspergillus awamori* nas dietas dos frangos de corte não afetou as viscosidades das rações e das digestas. É importante salientar que as rações foram formuladas com milho e farelo de soja, alimentos de baixa viscosidade, ou seja, menos de 10 cPs (ZENELLA, 2001).

Resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho, para viscosidade da ração, foram verificados por ZANELLA et al. (1999) e MINAFRA (2007). No entanto, valores superiores foram observados por MARQUES (2007).

TABELA 6 - Viscosidades (cPs) das rações (Vração) e das digestas (Vdigesta) dos frangos de corte alimentados com rações que receberam ou não amilase produzida por *Aspergillus awamori*, nas fases pré-inicial e inicial

Parâmetros	Tratamentos		CV (%)	P
	Controle	Ração + enzima		
<u>Pré-inicial</u>				
Vração	1,97 ± 0,001	1,98 ± 0,0006	0,05	0,0892
Vdigesta	2,17 ± 0,037	2,14 ± 0,025	1,62	0,2346
<u>Inicial</u>				
Vração	1,98 ± 0,0006	1,98 ± 0,001	0,05	0,1554
Vdigesta	2,03 ± 0,033	2,07 ± 0,021	1,71	0,0843

Em relação à viscosidade da digesta, GRACIA et al. (2003) e CARVALHO (2006) obtiveram resultados semelhantes ao deste trabalho. Já MINAFRA (2007) e LU et al. (2009) observaram valores superiores. No entanto, não houve diferenças significativas entre as médias encontradas nesses trabalhos. Essas variações de resultados, segundo MINAFRA (2007), podem ser atribuídas à metodologia, aos equipamentos e ao modelo de viscosímetro.

4 CONCLUSÕES

Não se recomenda a adição de amilase produzida por *Aspergillus awamori* em rações pré-inicial e inicial para frangos de corte, tendo em vista os resultados dos parâmetros de desempenho e de metabolizabilidade das dietas.

REFERÊNCIAS

1. BALAMURUGAN, R.; CHANDRASEKARAN, D.; RAMESH, J.; KIRUBAKARAN, A. Effects of multi-enzyme supplementation on nutrient digestibility in broiler chickens. **International Journal of Livestock Research**, v. 3, n. 2, p. 141-146, 2013.

2. BARBOSA, N. A. A.; SAKOMURA, N. K.; BONATO, M. A.; HAUSCHILD, L.; OVIEDO-RONDON, E. Enzimas exógenas em dietas de frangos de corte: desempenho. **Ciência Rural**, v. 42, n. 8, p. 1497-1502, 2012.
3. BRUM, P. A. R.; ZANOTTO, D. L.; LIMA, G. J. M. M.; VIOLA, E. S. Composição química e energia metabolizável de ingredientes para aves. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 5, p. 995-1002, 2000.
4. BRUM, P. A. R.; LIMA, G. J. M. M.; ÁVILA, V. S.; COLDEBELLA, A.; ZANOTTO, D. L.; KLEIN, C. H. **Utilização de Complexos Enzimáticos em Dietas à Base de Milho e Farelo de Soja para Frangos de Corte**. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2008. 4p. (Comunicado Técnico 471).
5. BRUNO, L. D. G. & MACARI, M. Ingestão de água: Mecanismos regulatórios. In: MACARI, M.; FURLAN, R. L.; GONZALES, E. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 2002. 375p.
6. CAFÉ, M. B. **Estudo do valor nutricional da soja integral processada para aves**. 1993. 97p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
7. CAIRES, C. M.; FAGUNDES, N. S.; FERNANDES, E. A.; CARVALHO, A. P. Enzimas na alimentação de frangos de corte. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 5, n.1, p. 491-497, 2008.
8. CARDOSO, D. M.; MACIEL, M. P.; PASSOS, D. P.; SILVA, F. V.; REIS, S. T.; AIURA, F. S. Efeito do uso de complexo enzimático em rações para frangos de corte. **Archivos de Zootecnia**, v. 60, n. 232, p.1053-1064, 2011.
9. CARVALHO, D. C. O.; ALBINO, L. F. T.; ROSTAGNO, H. S. Composição química e energética de amostras de milho submetidas a diferentes temperaturas de secagem e períodos de armazenamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 2, p. 358-364, 2004.
10. CARVALHO, J. C. C. **Complexos enzimáticos em rações fareladas para frangos de corte**. 2006. 64 f. Dissertação (Mestrado em nutrição de Monogástricos) - Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Lavras, Lavras. Disponível em: http://www.dominiopublico.gov.br/pesquisa/DetalheObraForm.do?select_action=&co_obra=28690. Acesso em: 26 de mar. 2013.
11. FERREIRA, D. F. **Sisvar: sistema de análise de variância para dados balanceados, versão 5.1 Build 72**. Lavras: DEX/ UFLA, 2007.
12. FISCHER, G.; MAIER, J. C.; RUTZ, F. E.; BERMUDEZ, V. L. Desempenho de frangos de corte alimentados com dietas à base de milho e farelo de soja, com ou sem adição de enzimas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 1, p. 402-410, 2002.
13. FREITAS, E. R; SAKOMURA, N. K; NEME, R; BARBOSA, N. A. A. Valor nutricional do milho termicamente processado, usado na ração pré-inicial para frangos de corte . **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 4, p. 510-517, 2005.
14. GRACIA, M. I.; ARANÍBAR, M. J.; LÁZARO, R.; MEDEL, P.; MATEOS, G. G. α -amylase supplementation of broiler diets base on corn. **Poultry Science**, v. 82, p. 436-442, 2003.

15. LARBIER, M. & LECLERCQ, B. **Nutrition and feeding of poultry: Metabolism of water and minerals**. Nottingham: Nottingham University Press, 1994. p. 101-118.
16. LEITE, J. L. B.; RODRIGUES, P. B.; FIALHO, E. T.; FREITAS, R. T. F.; NAGATA, A. K.; CANTARELLI, V. S. Efeito da peletização e adição de enzimas e vitaminas sobre o desempenho e aproveitamento da energia e nutrientes em frangos de corte de 1 a 21 dias de idade. **Ciências Agrotécnicas**, v. 32, n. 4, p. 1292-1298, 2008.
17. 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**, v. 1, n. 4, p. 99-110, 2007.
18. LU, M.; LI, D.; GONG, L.; RU, Y.; RAVINDRAM, V. Effects of supplemental microbial phytase and xylanase on the performance of broilers fed diets based on corn and wheat. **Japan Poultry Science**, v. 46, n. 3, p. 217-223, 2009.
19. MARQUES, S. F. F. **Biotecnologia enzimática: produção de complexo multienzimático de *Trichoderma harzianum* e sua aplicação na alimentação de frangos de corte**. 2007. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade Federal de Goiás, Goiânia. Disponível em: http://ppgca.vet.ufg.br/uploads/67/original_Dissertacao2007_Sonaide_Marques.pdf. Acesso em: 23 fev. 2013.
20. MATTERSON, L. D.; POTTER, L. M.; STUTZ, M. W. The metabolizable energy of feed ingredients for chickens. **Research Report**, v. 7, p. 3-11, 1965.
21. MINAFRA, C. S. **Produção e suplementação com α -amilase de *Cryptococcus flavus* e *Aspergillus niger* HM2003 na dieta de frangos de corte de um a 21 dias de idade**. 2007. 124 f. Tese (Doutorado em Bioquímica Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. Disponível em: http://www.tede.ufv.br/tedesimplificado/tde_arquivos/27/TDE-2008-02-29T125750Z-1054/Publico/texto%20completo.pdf. Acesso em: 9 maio 2013.
22. MORAN JR., E. T. Digestion and absorption of carbohydrates in fowl and events through perinatal development. **The Journal of nutrition**, v. 115, n. 2, p. 665-671, 1985.
23. NOY, I. & SKLAN, D. Digestion and absorption in the young chick. **Poultry Science**, v. 74, p. 366-373, 1995.
24. 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, p. 77-86, 2007.
25. OPALINSKI, M.; ROCHA, C.; MAIORKA, A.; DAHLK, F.; SILVA, A. V. F.; BORGES, S. A. Impacto de enzimas e da granulometria sobre a metabolizabilidade da soja desativada para frangos de corte. **Archives of Veterinary Science**, v.16, n. 2, p. 84-90, 2011.
26. PARSAIE, S.; SHARIATMADARI, F.; ZAMIRI, M. J.; KHAJEH, K. Evaluation of starch, soluble and insoluble non-starch polysaccharides and metabolizable energy of 15 cultivars of Iranian wheat. **Journal of Agriculture & Social Sciences**, v. 2, n. 4, p. 260-263, 2006.

27. PENZ JR., A. M. Enzimas em Rações para Aves e Suínos. Aditivos na produção de não-ruminantes. In: REUNIÃO ANUAL DA SBZ, 35., 1998. Botucatu, SP. **Anais...** Botucatu : SBZ, 1998. 375p. p.165.
28. RODRIGUES, P. B.; ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T. Valores energéticos do milho, do milho e subprodutos do milho, determinados com frangos de corte e galos adultos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 6, p. 1767-1778, 2001.
29. ROMERO, L. F.; PARSONS, C. M.; UTTERBACK, P. L.; PLUMSTEAD, P. W.; RAVINDRAN, V. Comparative effects of dietary carbohydrases without or with protease on the ileal digestibility of energy and amino acids and AMEn in young broilers. **Animal Feed Science and Technology**, v. 181, p. 35-44, 2013.
30. ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; DONZELE J. L.; GOMES, P. C.; OLIVEIRA, R. F.; LOPES, D. C.; FERREIRA, A. S.; BARRETO, L. S. T.; EUCLIDES, R. F. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. 3ª ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2011. 252 p.
31. SAKAMOTO, M. I.; FARIA, D. E.; NAKAGI, V. S.; NEGRÃO, J. A.; ARAÚJO, R. B.; SOUZA, K. M. R.; PREVIERO, T. C. Utilização de glutamina, associada ao ácido glutâmico, sobre o desenvolvimento e a atividade enzimática em frangos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 4, p. 962-972, 2011.
32. SANTOS, I. I.; KESSLER, A. M.; MENDES, J. F.; GIANFELICI, M. F.; KRÁS, R. V. Probiótico e enzimas na alimentação de frangos de corte: efeitos na metabolizabilidade das dietas e produção de dejetos na fase de crescimento. **Biotemas**, v.115, n. 2, p. 187-191, 2012.
33. SILVA, D. J. & QUEIROZ, A. C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. Viçosa: UDV/DZO, 2002. 235p.
34. TAVERNARI, F. C. & MENDES, A. M. P. Desenvolvimento, crescimento e características do sistema digestório de aves. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 6, n. 6, p.1103-1115, 2009.
35. TORRES, D. M.; TEIXEIRA, A. S.; RODRIGUES, P. B. Eficiência das enzimas amilase, protease e xilanase sobre o desempenho de frangos de corte. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, p. 1401-1408, 2003.
36. ZANELLA, I. Suplementação enzimática em dietas avícolas. In: PRÉ-SIMPÓSIO DE NUTRIÇÃO ANIMAL: AVES E SUÍNOS, 2001, Santa Maria, RS. **Anais...** Santa Maria: Departamento de Zootecnia, UFSM, 2001. 69 p., p 37-49.
37. ZANELLA, I.; SAKOMURA, N. K.; SILVERSIDES, F. G.; FIQUEIRDO, A.; PACK, M. Effect of enzyme supplementation of broiler diets based on corn and soybeans. **Poultry Science**, v. 78, n. 4, p. 561-568, 1999.

CAPÍTULO IV

ADIÇÃO DE AMILASE DE *Aspergillus awamori* NA DIETA DE FRANGOS DE CORTE: parâmetros hematológicos e bioquímicos do sangue, biometria dos órgãos digestórios e atividades enzimáticas, conteúdo de proteína e peso absoluto do pâncreas

RESUMO

Realizou-se experimentos com o objetivo de avaliar os parâmetros hematológicos e bioquímicos do sangue, a biometria dos órgãos digestórios, as atividades enzimáticas, o conteúdo de proteína e o peso absoluto do pâncreas de frangos de corte alimentados com rações suplementadas com amilase de *Aspergillus awamori*. Utilizou-se 120 pintos, machos, da linhagem Cobb, alojados em baterias aquecidas, em cada experimento. O delineamento foi inteiramente ao acaso, com dois tratamentos (ração com e sem amilase), seis repetições e 10 aves em cada unidade experimental. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade. A adição de amilase às dietas não afetou os parâmetros hematológicos e bioquímicos do sangue, a biometria do trato gastrointestinal, o peso absoluto, as atividades das enzimas e o teor de proteína pancreáticas de pintos com sete dias de vida. Entretanto, a inclusão de amilase na ração reduziu a atividade de amilase e o teor de proteína do pâncreas das aves criadas no período de oito a 21 dias de idade. A aplicação de amilase nas rações pré-inicial e inicial não se justifica, considerando os resultados da atividade de amilase e o teor de proteína do pâncreas dos frangos de corte.

Palavras-chave: frangos, fungo, nutrição, sangue

CHAPTER IV

ADDITION OF AMYLASE FROM *Aspergillus awamori* TO THE DIET FOR BROILERS: hematological and biochemical parameters of blood, digestive organs biometry, enzymatic activities, protein content and pancreas absolute weight

ABSTRACT

We conducted the experiments to evaluate blood hematological and biochemical parameters, digestive organs biometry, enzyme activity, protein content and pancreas absolute weight of broilers receiving amylase produced by *Aspergillus awamori*, in the pre-starter and starter phases. We used 120 male Cobb chicks, in heated batteries in each experiment. The design was completely randomized with two treatments (diets with or without amylase) and six replicates of 10 broiler chicks per experimental unit. Data were submitted to analysis of variance by F-test at 5% probability. The enzyme supplementation to the diets of broilers did not affect the blood hematological and biochemical parameters, gastrointestinal tract biometry, absolute weight, enzyme activity, and protein content in the pancreas of chicks at seven days of age. However, the inclusion of amylase to the diet reduced amylase activity and protein content in the pancreas of the chicks from eight to 21 days of age. We do not recommend the addition of amylase to pre-starter and starter diets because of the results of amylase activity and the protein content in the pancreas of broilers.

Keywords: broilers, fungus, enzyme, nutrition

1 INTRODUÇÃO

A hematologia aviária se constitui ferramenta para orientar em diversas situações fisiológicas que, isoladas, nem sempre dão informações suficientes para determinar o que afeta o desenvolvimento dos animais (CHARLES NORIEGA, 2000).

Avanços nessa área ainda reservam oportunidades de pesquisas, principalmente em relação às espécies, raças, idade e outros fatores que podem ser importantes ao estudar os parâmetros hematológicos (CARDOSO & TESSARI, 2003; BORSA et al., 2006). No entanto, a determinação dos parâmetros sanguíneos devem ser traçados nas condições em que o animal foi criado (BORSA, 2006; KOHAYAGAWA et al., 2001; MINAFRA et al., 2010).

O sistema cardiovascular das aves é fechado e representa cerca de 7% do peso corporal (MACARI & LUQUETTI, 2002). Além disso, é particularmente sensível às mudanças fisiológicas e refletem as condições de saúde dos animais, assim como diversos fatores, como alimentação, clima e manejo, constituindo-se em importante indicador de respostas do metabolismo das aves (BORGES, 2001; MINAFRA, 2010).

Possivelmente, em virtude desses fatores, os valores dos parâmetros sanguíneos observados por diversos autores são bastante variáveis (BORSA, 2009). Nesse sentido, o hemograma constitui-se como ferramenta importante para se definir o diagnóstico da situação fisiológica dos animais. Segundo NAKAGE (2007), apenas recentemente é que o perfil hematológico das aves começou a receber maior atenção por parte dos pesquisadores.

AHMAD et al. (2013) avaliaram os efeitos da adição de xilanase a ração para frangos de corte Ross nos parâmetros bioquímicos séricos de aves com 28 dias de idade e observaram que a suplementação enzimática não influenciou os parâmetros analisados.

Contrariamente, ISMAIL et al. (2011) verificaram aumentos na concentração de proteína total e albumina no plasma de frangos de corte, enquanto que a concentração de colesterol no sangue e atividade de AST foram afetados negativamente, quando avaliaram a inclusão de enzimas (Natuzyne®) e probiótico (Bio-Nutra 200®) nas dietas.

No desenvolvimento e maturação do aparelho digestório, a taxa de crescimento excede a taxa de ganho de peso (JIN et al., 1998), influenciando os processos digestivos, inclusive a produção de enzimas e as atividades de digestão e de absorção de gorduras (UNI et al., 1995; UNI et al., 1998; UNI et al., 1999; RODRIGUES et al., 2001; LIMA et al., 2003). Nesse sentido, o papel do pâncreas é fundamental na produção de enzimas para a digestão de proteínas, de carboidratos e de gorduras. Outra função importante do pâncreas é a secreção de enzimas proteolíticas, principalmente a tripsina, que degradam as proteínas (FURLAN et al., 2002).

Segundo MORAN JR. (1985) e SAKOMURA et al. (2004), dentre os fatores que afetam a digestão de lipídios, destacam-se os processos de adaptação e de maturação das células absorptivas do intestino, a maturação dos órgãos para a produção e liberação de enzimas digestivas, os tipos de alimentos, a natureza, a composição química e a complexação entre os nutrientes.

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da aplicação de amilase produzida por *Aspergillus awamori* em rações pré-inicial e inicial sobre os parâmetros hematológicos e bioquímicos do sangue, a biometria dos órgãos digestivos e as atividades enzimáticas, o conteúdo de proteína e o peso absoluto do pâncreas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Procedimentos gerais

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, em 12 de maio de 2011, sob o número 006/2012.

A amilase foi produzida nos Laboratórios de Enzimologia e de Fisiologia da Digestão, do Instituto de Ciências Biológicas/ICB II, da Universidade Federal de Goiás, utilizando uma linhagem de *Aspergillus awamori* proveniente do Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília (UnB).

Foram utilizadas, em cada experimento, 120 aves da linhagem Cobb, machos, distribuídos em delineamento experimental inteiramente casualizado, com dois tratamentos, seis repetições e 10 pintos por unidade experimental. As aves apresentavam, no 1º (Experimento 1) e no 8º dias (Experimento 2), pesos médios de $41,83 \pm 1,28$ g e $153,9 \pm 14,6$ g, respectivamente. Os animais foram alojados em três baterias de aço galvanizado, com quatro andares e divisões de $0,80 \times 0,75 \times 0,25$ m (c x l x h), comedouro e bebedouro lineares, instaladas em galpão de alvenaria, situado nas instalações do Setor de Avicultura do Instituto Federal Goiano - Câmpus Ceres, cercado por uma mureta de concreto com 0,50 m de altura e tela de arame, protegido na parte externa por uma cortina de plástico trançado. A altura da mureta até o telhado é de 1,80 m.

O manejo do galpão e das gaiolas, antes da chegada dos pintos, obedeceu às normas usuais de limpeza e desinfecção. O aquecimento de cada andar das baterias foi feito com a instalação de lâmpada incandescente de 100 W no período de um a sete dias (Exp. 1) e de 60 W de oito a 21 dias (Exp. 2) de criação das aves. A temperatura e a umidade internas do galpão (Tabela 1) foram monitoradas diariamente por meio de um termômetro de mínima e de máxima (Incoterm®) e outro digital (Incoterm®). Quando necessário, foi realizado o manejo das cortinas para manter a temperatura adequada às aves. Os comedouros foram abastecidos três vezes ao dia e os bebedouros duas vezes. Bandejas metálicas foram usadas para a retirada das excretas.

TABELA 1 - Temperatura e umidade médias internas do galpão experimental nos períodos de 1 a 7 e de 8 a 21 dias de criação dos frangos de corte

Período (dias)	Temperatura (°C)		Umidade (%)	
	Mínima	Máxima	Mínima	Máxima
1 - 7	25,70	33,16	40,00	64,86
8 - 21	25,62	31,79	45,71	66,93
Média	25,66	32,47	42,85	65,89

As rações experimentais (Tabela 2) foram formuladas à base de milho e farelo de soja seguindo as recomendações nutricionais e composição dos alimentos propostas por ROSTAGNO et al. (2011) e preparadas na fábrica de rações da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás.

TABELA 2 - Composição (%) e níveis nutricionais das rações pré-inicial e inicial

Ingrediente	Pré-Inicial (1 a 7 dias)	Inicial (8 a 21 dias)
Milho	55,24	59,35
Farelo de soja	38,26	34,78
Óleo vegetal	2,24	2,21
Fosfato bicálcico	1,91	1,51
Calcário	0,90	0,91
Sal comum	0,50	0,47
DL-Metionina	0,36	0,29
L-Lisina HCL	0,28	0,22
L-Treonina	0,11	0,06
Vitamina ¹	0,10	0,10
Mineral ¹	0,05	0,05
Anticoccidiano	0,05	0,05
Total	100,00	100,00
Nível nutricional calculado		
Proteína bruta (%)	22,2	20,8
EM (Mcal/kg)	2,95	3,00
Lisina dig. aves (%)	1,31	1,17
Treonina dig. aves (%)	0,85	0,76
Metionina + Cistina(%)	0,94	0,84
Triptofano dig. aves	0,25	0,23
Cálcio (%)	0,92	0,81
Fósforo disponível (%)	0,47	0,39
Cloro (%)	0,33	0,31
Sódio (%)	0,22	0,21

¹Suplementos vitamínico e mineral (garantia por kg de produto): Vitamina A 11.000.000 UI; Vit. D3 2.000.000 UI; Vit. E 16.000 UI; Vit. B1 1.200 mg; Vit. B2 4.500 mg; Vit. B6 2.000 mg; Vit. B12 16.000 mcg; Ácido Pantotênico 9.200 mg; Biotina 60 mg; Niacina 35.000 mg; Selênio 250 mg; Cobre 18.000 mg; Ferro 60.000 mg; Iodo 2.000 mg; Manganês 106.000 mg e Zinco 120.000 mg.

As rações pré-inicial (Exp. 1) e inicial (Exp. 2) foram fabricadas 24 horas antes do início de cada experimento para evitar a contaminação por fungos. Para cada experimento foram preparadas uma dieta controle, com todos os

ingredientes (Tabela 2) e outra sem o farelo de soja. Nessa segunda, quando do fornecimento da dieta às aves, o farelo de soja foi aspergido, diariamente, com amilase, na proporção de 120 mL para cada quilograma de ração, e em seguida os outros ingredientes foram adicionados e homogeneizados. As aves receberam água e ração à vontade nos dois experimentos.

2.2 Parâmetros hematológicos e bioquímicos do sangue

Aos 21 dias de idade dos frangos foram coletados 4 mL de sangue, utilizando seringas e agulhas descartáveis, de duas aves por tratamento, representando a média do grupo, por venóclise da veia braquial, sendo 2 mL acondicionados em tubo com EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) para contagem de leucócitos totais, eritrócitos, trombócitos, mensuração da hemoglobina e volume globular, e 2 mL acondicionados em tubo com ativador de coágulo para separação do soro e realização de bioquímicas séricas.

As análises foram realizadas no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás.

O volume globular foi obtido preenchendo tubos capilares com sangue até 2/3 de seu volume. Em seguida, os tubos foram selados com chama, utilizando bico de Bunsen, e submetidos à força centrífuga de 15.000 rpm, durante cinco minutos. Logo após, os capilares, com sangue sedimentado, foram colocados sobre um cartão de leitura calibrado de 0 a 100 (%) e realizada a leitura.

A hemoglobina foi mensurada pelo método cianometahemoglobina, utilizando o reagente Hemoglobina Labtest® e analisador bioquímico semiautomático BIO-2000 Bioplus®.

Na contagem de leucócitos totais, eritrócitos e trombócitos foram diluídos 20µL da amostra de sangue em 1,98 mL de solução de Natt-Herrick e após cinco minutos realizados a homogeneização da suspensão e o preenchimento da câmara de Neubauer. As células foram contadas em microscópio óptico com aumento de 40X.

A partir dos valores obtidos para o número de hemácias, da taxa de hemoglobina e do volume globular foram calculados o Volume Corpuscular Médio (VCM), a Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) e a Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM).

O volume corpuscular médio (VCM) avalia a média do tamanho (volume) das hemácias, em fentolitros (fL). A hemoglobina corpuscular média (HCM) reflete o peso médio de hemoglobina na hemácia, em picogramas (pg). A concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) avalia a hemoglobina encontrada nas hemácias, em porcentagem (%).

Das amostras de soro foi realizada a dosagem de proteína total, albumina, colesterol, triglicérides, ácido úrico, creatinina, cálcio ASX, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), α -amilase, fósforo, magnésio e cloretos, utilizando os reagentes da empresa Biotécnica® e analisador bioquímico automatizado COBAS MIRA Plus, Roche®.

2.3 Biometria dos órgãos digestórios

No sétimo e 21º dias de idade, uma ave de cada repetição, representando a média de peso da unidade experimental, foi separada do lote e submetida a jejum de seis horas. Em seguida foi sacrificada por deslocamento cervical e as vísceras que compõem o trato gastrintestinal (TGI) foram pesadas e medidas da seguinte forma:

- peso do fígado - dado pelo peso do fígado com a vesícula;
- peso do pâncreas - após a sua separação da alça duodenal;
- peso do intestino delgado - porção que compreende o início do duodeno até o íleo;
- peso do intestino grosso - dado pelo peso dos cecos, do cólon e do reto;
- peso da moela (com conteúdo remanescente) - separada após medida do comprimento do TGI;
- peso do pró-ventrículo - separado após medida do comprimento do TGI;
- comprimento do intestino delgado - medido desde o final do estômago muscular até o início dos cecos; e

- comprimento do intestino grosso - medido considerando o comprimento do cólon e reto.

Os valores obtidos foram utilizados no cálculo do peso relativo de cada órgão, pela fórmula: $\text{Peso relativo do órgão} = (\text{peso do órgão} / \text{peso vivo}) \times 100$.

2.4 Atividades enzimáticas, conteúdo de proteína e peso absoluto do pâncreas

Os pâncreas dos animais sacrificados para a biometria foram utilizados para a determinação das atividades das enzimas amilase e lipase, do conteúdo de proteína e peso absoluto do pâncreas. Imediatamente após a coleta, as vísceras foram congeladas em nitrogênio líquido. Posteriormente o pâncreas de cada animal foi triturado e homogeneizado o tecido com 1 mL de água destilada. A amostra foi centrifugada a 8000 rpm a 40°C por 10 minutos. Foi coletado o sobrenadante e dosado, em triplicata, o teor proteico e as atividades enzimáticas. Todas as operações foram realizadas em banho de gelo e com água destilada. As análises foram realizadas no Laboratório de Enzimologia e de Fisiologia da Digestão do Instituto de Ciências Biológicas da UFG, segundo metodologias dos kits Doles®.

2.5 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software SISVAR (FERREIRA, 2007). Os dados dos parâmetros hematológicos e bioquímicos do sangue, da biometria dos órgãos digestivos, das atividades enzimáticas, do conteúdo de proteína e do peso absoluto do pâncreas foram submetidos à ANOVA e teste F ao nível de 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Parâmetros hematológicos e bioquímicos do sangue

A suplementação da ração inicial com amilase produzida por *Aspergillus awamori* não afetou os parâmetros hematológicos (Tabela 3) e bioquímicos (Tabela 4) do sangue dos frangos de corte com 21 dias de idade.

TABELA 3 - Parâmetros hematológicos dos frangos de corte alimentados com rações contendo ou não amilase produzida por *Aspergillus awamori*, aos 21 dias de idade

Parâmetros	Tratamentos		CV (%)	P
	Controle	Ração + enzima		
Hemácias ($\times 10^6$ cel.mm ⁻³)	1,86 $\pm$ 0,10	1,81 $\pm$ 0,14	8,42	0,4251
Hematócrito (%)	27,7 $\pm$ 0,93	26,2 $\pm$ 1,33	7,80	0,1173
Hemoglobina (g.dL ⁻¹)	9,33 $\pm$ 0,24	8,89 $\pm$ 0,57	8,07	0,1677
Leucócitos totais ($\times 10^3$ cel.mm ⁻³)	9,09 $\pm$ 1,76	8,91 $\pm$ 1,90	29,33	0,8665
Trombócitos ($\times 10^3$.mm ⁻³)	28,3 $\pm$ 3,51	31,0 $\pm$ 2,23	12,79	0,1011
VG (%) ¹	27,67 $\pm$ 1,33	26,25 $\pm$ 0,93	4,26	0,0585
VCM (fL) ²	148,69 $\pm$ 7,12	145,17 $\pm$ 5,76	4,41	0,3684
HCM (pg) ³	50,13 $\pm$ 2,08	49,15 $\pm$ 1,74	3,86	0,3993
CHCM (%) ⁴	33,72 $\pm$ 0,41	33,87 $\pm$ 0,44	1,27	0,5701

¹Volume Globular, ²Volume Corpuscular Médio, ³Hemoglobina Corpuscular Média (pg),

⁴Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média

Os valores de leucócitos totais, determinados neste trabalho, foram superiores aos citados por MACARI & LUQUETTI (2002), mas semelhantes ao encontrados por BORSA (2009) e inferiores aos obtidos por TALEBI et al. (2005), CARDOSO et al. (2009), EGBUNIKE et al. (2009) e RHAGAVAN et al. (2012). É importante salientar que a quantidade dessas células pode variar em função do sexo, da idade, das condições de estresse e de doença (MACARI & LUQUETTI, 2002).

Os dados relacionados às hemácias, hematócrito e hemoglobina são semelhantes aos citados por MACARI & LUQUETTI (2002), TALEBI et al. (2005), BORSA (2009), CARDOSO et al. (2009) e EGBUNIKE et al. (2009).

Os níveis de hemoglobina, determinados neste trabalho, foram semelhantes aos encontrados por OBIKAONU et al. (2012), quando avaliaram quatro níveis de farelo de folha de neem (*Azadirachta indica*) em ração para aves.

AHMAD et al. (2013) avaliaram os efeitos da adição de xilanase na ração para frangos de corte, da linhagem Ross, nos parâmetros hematológicos e bioquímicos séricos em aves com 28 dias de idade e verificaram que a suplementação enzimática não afetou os parâmetros estudados.

TABELA 4 - Parâmetros bioquímicos do sangue dos frangos alimentados com rações contendo ou não amilase produzida por *Aspergillus awamori*, aos 21 dias de idade

Parâmetros	Tratamentos		CV (%)	P
	Controle	Ração + enzima		
Ácido úrico (mg.dL ⁻¹)	8,28 ± 1,01	8,52 ± 1,14	16,86	0,6894
Albumina (g.dL ⁻¹)	0,78 ± 0,14	0,74 ± 0,16	23,46	0,5927
ALT (U.L ⁻¹) ¹	3,42 ± 0,92	3,00 ± 1,41	73,57	0,6709
AST (U.L ⁻¹) ²	237,8 ± 91,28	209,7 ± 72,15	38,34	0,4324
Cálcio (mg.dL ⁻¹)	5,11 ± 0,71	4,92 ± 0,33	11,47	0,4256
Cloreto (mg.dL ⁻¹)	102,2 ± 8,74	101,3 ± 4,18	12,28	0,8596
Colesterol (mg.dL ⁻¹)	81,7 ± 12,91	78,2 ± 12,21	26,70	0,6929
Creatinina (mg.dL ⁻¹)	0,34 ± 0,03	0,32 ± 0,03	21,41	0,4795
Fósforo (mg.dL ⁻¹)	4,24 ± 0,76	4,26 ± 0,79	25,52	0,9719
Magnésio (mg.dL ⁻¹)	3,48 ± 0,30	3,09 ± 0,25	19,80	0,1555
Proteína sérica (g.dL ⁻¹)	2,78 ± 0,49	2,73 ± 0,23	18,77	0,7818
Triglicérides (mg.dL ⁻¹)	32,0 ± 6,55	37,0 ± 8,88	39,55	0,3819
α-amilase (U.dL ⁻¹)	271,72 ± 150,04	378,2 ± 99,57	52,08	0,1418

¹ Alanina aminotransferase, ² Aspartato aminotransferase

Os parâmetros bioquímicos séricos de aves com 28 dias de idade foram estudados por AHMAD et al. (2013) quando adicionaram xilanase na ração para frangos de corte Ross. Os autores observaram que a adição de enzima não afetou os parâmetros analisados, como verificado neste trabalho.

As médias de proteína verificadas neste estudo foram semelhantes, enquanto que colesterol mais triglicérides inferiores às obtidas por ABUDABOS (2012) quando avaliou o efeito da inclusão de α -amilase, protease, pectinase, amiloglicosidase, celulase, fitase e células de *Aspergillus awamori* em ração para frangos de corte Cobb 500, machos, com 42 dias de idade.

Os níveis séricos de cálcio, colesterol, albumina, creatinina e ALT, encontrados neste trabalho foram inferiores aos encontrados por OBIKAONU et al. (2012), enquanto que de cloreto e AST foram superiores, de fósforo e de proteína, semelhantes.

MINAFRA et al. (2010) encontraram valores semelhantes para os níveis de cálcio, fósforo e cloreto para frangos de corte alimentados com ração suplementadas com α -amilase, na fase de oito a 21 dias de criação. Entretanto, o nível de atividade sérica de α -amilase foi cerca de 50% superior ao deste trabalho. Os níveis séricos verificados anteriormente por MINAFRA et al. (2009) em frangos de corte criados com diferentes níveis de proteína e com 21 dias de idade foram semelhantes para AST e cloro e superiores em ALT e magnésio, em relação aos deste estudo.

Os valores dos parâmetros hematológicos e bioquímicos observados nos trabalhos com frangos de corte, independentemente da linhagem, sexo, alimentação, condições ambientais, manejo, local da coleta do sangue, tipo de kit laboratorial, dos equipamentos, são muito variáveis, mas tidos como dentro do padrão para a espécie. Nesse sentido, os resultados deste trabalho contribuem para a determinação dos valores de referência dos parâmetros hematológicos e bioquímicos do sangue de frango de corte para as condições brasileiras.

3.2 Biometria dos órgãos digestórios

A suplementação da ração com amilase de *Aspergillus awamori* não afetou os parâmetros biométricos do trato digestório dos frangos de corte nas fases pré-inicial (Tabela 5) e inicial (Tabela 6).

TABELA 5 - Pesos relativos (%) do fígado, do pâncreas, dos intestinos, da moela, do pró-ventrículo e comprimento (cm) dos intestinos dos frangos de corte alimentados com rações contendo ou não amilase produzida por *Aspergillus awamori*, aos sete dias de idade

Parâmetros	Tratamentos		CV (%)	P
	Controle	Ração + enzima		
Fígado	3,83 ± 0,44	3,96 ± 0,38	10,48	0,5933
Pâncreas	0,48 ± 0,09	0,47 ± 0,12	22,38	0,8523
Intestino delgado	2,37 ± 0,22	2,39 ± 0,26	10,03	0,9831
Intestino grosso	6,75 ± 2,59	6,63 ± 2,55	38,41	0,9380
Moela	6,52 ± 0,51	7,01 ± 0,65	8,55	0,5277
Pró-ventrículo	1,31 ± 0,26	1,35 ± 0,09	14,67	0,7403
Intestino delgado (cm)	94,57 ± 7,5	91,77 ± 3,75	5,57	0,3925
Intestino grosso (cm)	11,07 ± 1,87	11,42 ± 0,54	11,26	0,6521

MINAFRA (2007), avaliando o efeito da suplementação das dietas de frango de corte com amilase produzida por *Cryptococcus flavus* e *Aspergillus Níger* sobre a biometria dos órgãos digestórios, verificou que a enzima não afetou o comprimento do trato gastrintestinal, os pesos relativos do esôfago e papo, do pró-ventrículo e moela, dos intestinos delgado e grosso e do fígado das aves com sete dias de vida. Esses resultados foram semelhantes ao deste trabalho. Entretanto, nessa fase, o peso relativo do pâncreas foi menor nas aves que receberam ração com amilase, resultado discordante do obtido neste estudo.

Corroborando os resultados verificados neste trabalho, MARQUES (2007) observou que não houve diferença no tamanho do trato gastrintestinal (TGI), no peso relativo do pâncreas e nas variáveis esôfago e papo, pró-ventrículo

+ moela e intestino grosso, quando avaliou o efeito da aplicação de complexo enzimático em ração para frango de corte na fase pré-inicial.

TABELA 6 - Pesos relativos (%) do fígado, do pâncreas, dos intestinos, da moela, do pró-ventrículo e comprimento (cm) dos intestinos dos frangos de corte alimentados com rações contendo ou não amilase produzida por *Aspergillus awamori*, aos 21 dias de idade

Parâmetros	Tratamentos		CV (%)	P
	Controle	Ração + enzima		
Fígado	2,52 ± 0,27	2,60 ± 0,35	12,29	0,6632
Pâncreas	0,29 ± 0,09	0,32 ± 0,05	24,25	0,4328
Intestino delgado	4,99 ± 0,49	5,08 ± 0,27	7,91	0,7197
Intestino grosso	0,97 ± 0,17	1,02 ± 0,23	20,56	0,7020
Moela	3,47 ± 0,46	3,54 ± 0,44	12,85	0,7932
Pró-ventrículo	0,58 ± 0,07	0,70 ± 0,14	17,12	0,0870
Intestino delgado (cm)	160,33 ± 13,20	156,0 ± 9,51	7,40	0,5495
Intestino grosso (cm)	20,00 ± 2,28	21,5 ± 1,22	10,72	0,2956

Nas aves de corte com 21 dias de idade, MINAFRA (2007) observou que a aplicação de amilase nas rações não afetou o comprimento do trato gastrointestinal e nem os pesos relativos do esôfago + papo, do pró-ventrículo + moela e dos intestinos delgado e grosso. No entanto, os pesos relativos do fígado e do pâncreas diminuíram nos frangos alimentados com ração suplementada com enzima. Segundo esse autor, com a utilização de amilase exógena, o pâncreas reduz a produção endógena dessa enzima e, conseqüentemente, sua funcionalidade, afetando o seu tamanho.

MARQUES (2007) observou que a suplementação da dieta com enzimas não afetou o tamanho do TGI, os pesos relativos do proventrículo + moela e do intestino delgado de frangos de corte na fase inicial de criação. Entretanto, o peso relativo do esôfago + papo aumentou, do intestino grosso diminuiu e os fígados das aves que não receberam enzimas ficaram cerca de 10% mais pesados.

Utilizando dietas com farinha de batata doce em substituição parcial ao milho, com ou sem adição de complexo enzimático (amilase, fitase, protease, xilanase, β -glucanase, celulase e pectinase) NUNES et al. (2011) não verificaram diferença na biometria intestinal das aves criadas até 28 dias de idade.

NASCIMENTO (2011) avaliou o efeito de complexo enzimático, composto por fitase e carbohidrolases, associado aos níveis de sódio, suplementado à dieta sobre a morfometria intestinal de frangos machos, da linhagem Cobb, aos 18 dias de idade e observou que a aplicação das enzimas na ração não afetou o peso relativo do estômago, o peso e o comprimento relativo do intestino delgado, o peso relativo do intestino grosso e do fígado.

3.3 Atividades enzimáticas, conteúdo de proteína e peso absoluto do pâncreas

A adição de amilase obtida de *Aspergillus awamori* à ração pré-inicial (Exp. 1) não afetou as atividades enzimáticas, o conteúdo de proteína e o peso absoluto do pâncreas dos frangos de corte com sete dias de idade. Na fase inicial (Exp. 2), a suplementação enzimática reduziu a atividade de amilase pancreática e aumentou o conteúdo de proteína no pâncreas dos frangos de corte com 21 dias de idade (Tabela 7).

A redução da atividade de amilase pancreática na fase inicial dos frangos de corte pode ser atribuída à aplicação dessa enzima na ração à base de milho e farelo de soja, já que ocorre diminuição da síntese endógena (ZANELLA, 1998).

SAKOMURA et al. (2004) investigaram o efeito da idade de aves na produção de enzimas digestivas do pâncreas e observaram que as atividades das enzimas amilase e lipase aumentaram com a idade das aves, assim como o crescimento alométrico do pâncreas. Esses comportamentos foram semelhantes aos verificados neste trabalho.

TABELA 7 - Atividades enzimáticas, conteúdo de proteína e peso absoluto do pâncreas dos frangos de corte alimentados com rações pré-inicial e inicial contendo ou não amilase produzida por *Aspergillus awamori*

Parâmetros	Tratamentos		CV (%)	P
	Controle	Ração + enzima		
<u>Ração pré-inicial</u>				
Amilase (U.mg ⁻¹ .10 ⁻³)	319,846	256,798	45,47	0,4243
Lipase (U.mg ⁻¹ .10 ⁻³)	14,544	16,178	34,50	0,6049
Proteína (mg.mL ⁻¹)	2,808	2,573	27,56	0,5953
Peso absoluto (g)	0,67	0,68	13,32	0,7387
<u>Ração inicial</u>				
Amilase (U.mg ⁻¹ .10 ⁻³)	388,38A	156,59B	54,70	0,0226
Lipase (U.mg ⁻¹ . 10 ⁻³)	47,58	28,07	46,93	0,0861
Proteína (mg.mL ⁻¹)	1,90A	3,31B	36,58	0,0282
Peso absoluto (g)	2,35	2,54	27,05	0,6456

Médias seguidas, na linha, de letras distintas diferem pelo teste F a 5%

Valores divergentes aos desta pesquisa foram observados por MINAFRA (2007), o qual verificou que a adição de enzimas nas rações pré-inicial e inicial reduziu significativamente as atividades de amilase aos sete (5,23%) e aos 21 dias (17,45%). Além disso, o autor relata que isso pode ter ocorrido devido ao menor peso absoluto do pâncreas das aves que não receberam amilase.

Resultados semelhantes ao deste estudo foram encontrados por MARQUES (2007) quando trabalhou com a aplicação de complexo enzimático em ração para frango de corte. O autor observou, que nas fases pré-inicial e inicial, não houve diferença nas atividades de amilase e no peso absoluto do pâncreas. Entretanto, as médias dos valores foram maiores do que os encontrados neste trabalho. Esse fato pode ter relação com o tamanho do pâncreas, uma vez que foram encontrados valores menores neste estudo.

4 CONCLUSÕES

A suplementação das rações pré-inicial e inicial com amilase produzida por *Aspergillus awamori* não se justifica, considerando os dados obtidos da atividade de amilase e do teor de proteína do pâncreas das aves criadas no período de oito a 21 dias de idade.

Os resultados dos parâmetros hematológicos e bioquímicos do sangue dos frangos de corte com 21 dias de idade poderão servir como referência para a comunidade científica, tendo em vista as poucas informações que temos para frangos de corte criados sob as condições brasileiras.

REFERÊNCIAS

1. AHMAD, Z.; BUTT, M. S.; HUSSAIN, R.; AHMED, A.; RIAZ, M. Effect of oral application of xylanase on some hematological and serum biochemical parameters in broilers. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 33, n. 3, p. 388-390, 2013.
2. BORGES, S. A. **Balanço eletrolítico e sua interrelação com o equilíbrio ácido-base em frangos de corte submetidos a estresse calórico**. 2001. 97 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. Disponível em: <http://www.qgn.com.br/items/131/390>. Acesso em: 4 maio 2013.
3. BORSA, A. Valores hematológicos em frangos de corte de criação. **Colloquium Agrariae**, v. 5, n. 1, p. 25-31, 2009.
4. BORSA, A.; KOHAYAGAWA, A.; BORETTI, L. P.; SAITO, M. E.; KUIBIDA, K. Níveis séricos de enzimas de função hepática em frangos de corte de criação industrial clinicamente saudáveis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 4, p. 675-677, 2006.
5. CARDOSO, A. L. S. P. & TESSARI, E. N. C. Estudo dos parâmetros hematológicos em frangos de corte. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 70, n. 4, p. 419-424, 2003.
6. CARDOSO, V. S.; LIMA, C. A. R.; LIMA, M. E. F.; DORNELES, L. E. G.; TEIXEIRA FILHO, W. L.; LISBOA, R. S.; GUEDES JUNIOR, D. S.; DIREITO, G. M.; DANELLI, M. G. M. Administração oral de piperina em frangos de corte. **Ciência Rural**, v. 39, p. 1521-1526, 2009.
7. CHARLES NORIEGA, M. L. V. C. **Apuntes de hematología aviar: material didático para curso de hematología aviária**. Universidad Nacional Autónoma de México. Departamento de producción animal: Aves. México, 2000. 70p. (Apostila).

8. EGBUNIKE, G. N.; AGIANG, E. A.; OWOSIBO, A. O.; FATUFE, A. A. Effect of protein on performance and haematology of broilers fed cassava peel-based diets. **Archives de Zootechnia**, v. 58, n. 224, p. 655-662, 2009.
9. FERREIRA, D. F. **Sisvar: sistema de análise de variância para dados balanceados, versão 5.1 Build 72**. Lavras: DEX/ UFLA, 2007.
10. FURLAN, R. L.; MACARI, M.; SUGETA, S. M. Secreções gastrointestinais. In: MACARI, M.; FURLAN, R. L.; GONZALES, E. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. 2. ed., Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 2002. p. 105-111.
11. JIN, S. H.; CORLESS, A.; SELL, J. L. Digestive system development in post-hatch poultry. **World's Poultry Science**, v. 54, n. 4, p. 335-345, 1998.
12. KOHAYAGAWA, A.; SAUKAS, T. N.; BORETTI, L. P.; BORSA, A.; KUIBIDA, K. V. Valores hematológicos em frangos de corte de criação industrial no Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, supl. 3, p. 82, 2001.
13. MACARI, M. & LUQUETTI, B. C. Fisiologia Cardiovascular. In: MACARI, M.; FURLAN, R. L.; GONZALES, E. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 2002. p. 17-36.
14. MARQUES, S. F. F. **Biotecnologia enzimática: produção de complexo multienzimático de *Trichoderma harzianum* e sua aplicação na alimentação de frangos de corte**. 2007. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade Federal de Goiás, Goiânia. Disponível em: http://ppgca.vet.ufg.br/uploads/67/original_Dissertacao2007_Sonaide_Marques.pdf. Acesso em: 23 fev. 2013.
15. MINAFRA, C. S.; MARQUES, S. F. F.; STRINGHINI, J. H.; ULHOA, C. J.; REZENDE, C. S. M.; SANTOS, J. S.; MORAES, G. H. K. Perfil bioquímico do soro de frangos de corte alimentados com dieta suplementada com alfa-amilase de *Cryptococcus flavus* e *Aspergillus niger*. **Revista Brasileira de Zootechnia**, v. 39, n. 12, p. 2691-2696, 2010.
16. MINAFRA, C. S.; MORAES, G. H. K.; LOPES, A. C. C.; LOPES JÚNIOR, C. S. O.; VIEITES, F. M.; REZENDE, C. S. M.; VIU, M. A. O. Balanço eletrolítico e proteico dietéticos sobre as aminotransferases hepáticas, renais e séricas e teores séricos de magnésio e cloro de frangos de corte. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 2, p. 425-437, 2009.
17. MINAFRA, C. S. **Produção e suplementação com α -amilase de *Cryptococcus flavus* e *Aspergillus niger* HM2003 na dieta de frangos de corte de um a 21 dias de idade**. 2007. 124 f. Tese (Doutorado em Bioquímica Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. Disponível em: http://www.tede.ufv.br/tedesimplificado/tde_arquivos/27/TDE-2008-02-29T125750Z-1054/Publico/texto%20completo.pdf. Acesso em: 09 maio 2013.
18. MORAN JR., E. T. Digestion and absorption of carbohydrates in fowl and the events through perinatal development. **The Journal of Nutrition**, v. 115, p. 665-674, 1985.

19. NAKAGE, E. S. **Respostas fisiológicas de pintos submetidos a diferentes períodos de jejum: parâmetros hematológicos e intestinais**. 2007. 86 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. Disponível em: <http://www.fcav.unesp.br/download/pgtrabs/zoo/d/1766.pdf>. Acesso em: 15 jun. 2013.
20. NASCIMENTO, I. M. S. O. **Efeito do complexo enzimático associado ao balanço Eletrolítico ou níveis de sódio para Frangos**. 2011. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal do Paraná, Curitiba. Disponível em: <http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/handle/1884/26206>. Acesso em: 15 jun. 2013.
21. NUNES, J. K.; GONÇALVES, F. M.; DALLMANN, H. M.; GENTILINI, F. P.; ANCIUTI, M. A.; RUTZ, F.; MAIER, J. C.; SILVA, J. G. C. Desenvolvimento do sistema digestório de frangos de corte alimentados com farinha de batata doce. **Archivos de Zootecnia**, v. 60, n. 232, p. 1105-1114, 2011.
22. OBIKAONU, H. O.; OKOLI, I. C.; OPARA, M. N.; OKORO, V. M. O.; OGBUEWU, I. P.; ETUK, E. B.; UDEDIBIE, A. B. I. Haematological and serum biochemical indices of starter broilers fed leaf meal of neem (*Azadirachta indica*). **Journal of Agricultural Technology**, v. 8, n. 1, p. 71-79, 2012.
23. RAGHAVAN, R. P.; PANICKER, S. K.; VAKAYIL, B. Effect of stress on the production performance, hematology and gastrointestinal enzymes in broilers. **Philippine Journal Veterinary Animal Sciences**, v. 38, n. 2, p. 134-140, 2012.
24. RODRIGUES, A. C. P.; MORAES, G. H. K.; OLIVEIRA, M. G. A.; ALBINO, L. F. T.; FONSECA, C. C.; ROSTAGNO, H. S.; SILVA, F. A.; FANCHIOTTI, F. E.; MINAFRA, C. S. Activities of chymo lipase, α -amylase and trypsin and small intestinal morphology of chickens from birth to 21 days of age. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA, 30, Caxambu, 2001. **Resumos...** Caxambu: Sociedade Brasileira de Bioquímica, 2001. p.119.
25. ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; DONZELE J. L.; GOMES, P. C.; OLIVEIRA, R. F.; LOPES, D. C.; FERREIRA, A. S.; BARRETO, L. S. T.; EUCLIDES, R. F. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. 3ª ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2011. 252 p.
26. SAKOMURA, N. K.; BIANCHI, M. D.; PIZAURO JR., J. M.; CAFÉ, M. B.; FREITAS, E. R. Efeito da idade dos frangos de corte sobre a atividade enzimática e metabolizabilidade dos nutrientes do farelo de soja e da soja integral. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 4, p. 924-935, 2004.
27. TALEBI, A.; ASRI-REZAEI, S.; ROZEH-CHAI, R.; SAHRAEI, R. Comparative studies on haematological values of broiler strains (Ross, Cobb, Arbor-acres and Arian). **International Journal of Poultry Science**, v. 4, n. 8, p. 573-57, 2005.
28. UNI, Z.; NOY, Y.; SKLAN, D. Post hatch development of small intestinal function in the poultry. **Poultry Science**, v. 78, p. 215-222, 1999.
29. UNI, Z.; GANOT, S.; D. SKLAN. Posthatch development of mucosal function in the broiler small intestine. **Poultry Science**, v. 77, p. 75-82, 1998.

30. UNI, Z.; NOY, Y.; SKLAN, D. Posthatch changes in morphology and function of the small intestines in heavy- and light-strain chicks. **Poultry Science**, v. 74, n. 10, p. 1622-1629, 1995.
31. ZANELLA, I. **Suplementação enzimática em dietas a base de milho e soja processadas sobre a digestibilidade de nutrientes e desempenho de frangos de corte**. 1998. 179 f. Tese (Doutorado em Zootecnia - Produção Animal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

CAPÍTULO V

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para que este trabalho acontecesse percorri por três caminhos: uma revisão da literatura sobre produção, mercado e uso de enzimas na alimentação de frangos de corte; o segundo, produção e caracterização de amilase produzida pelo fungo *Aspergillus awamori*; e, por fim, a avaliação dos efeitos da adição dessa enzima nas rações pré-inicial e inicial para frangos de corte.

A análise dos resultados, obtidos neste estudo, permite concluir que:

- ✓ Não é recomendável a suplementação das rações para frangos de corte com amilase produzida pelo fungo *Aspergillus awamori*.
- ✓ Novas pesquisas devem ser realizadas com a amilase de *Aspergillus awamori*, considerando a completa caracterização bioquímica do extrato enzimático, mais tempo de fermentação e outras dosagens enzimáticas.