

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

**PROTEASE MONOCOMPONENTE DE *Bacillus liqueniformis* NAS
DIETAS DE FRANGOS DE CORTE**

Larissa Paula Silva Gomides
Orientador: Prof. Dr. José Henrique Stringhini

GOIÂNIA

2018



**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
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), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, 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. Identificação do material bibliográfico: ☒ **Dissertação** ☐ **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do autor: Larissa Paula Silva Gomides

Título do trabalho: Protease monocomponente de *Bacillus liqueniformis* nas dietas de frangos de corte

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ **SIM** ☐ **NÃO**¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

Larissa Paula Silva Gomides²

Ciente e de acordo:

José Henrique Stringhini²

Data: 16 / 04 / 2018

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.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² A assinatura deve ser escaneada.

LARISSA PAULA SILVA GOMIDES

**PROTEASE MONOCOMPONENTE DE *Bacillus liqueniformis* NAS
DIETAS DE FRANGOS DE CORTE**

Dissertação apresentada para obtenção
do título de mestre em Zootecnia junto
à Escola de Veterinária e Zootecnia da
Universidade Federal de Goiás.

Área de concentração:
Produção Animal

Orientador:

Prof. Dr. José Henrique Stringhini

Comitê de orientação:

Prof^a. Dr^a. Nadja Susana M. Leandro - EVZ/UFG

Prof. Dr. Marcos Barcellos Café – EVZ/UFG

GOIÂNIA
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Paula Silva Gomides, Larissa
Protease Monocomponente de *Bacillus liqueniformis* nas dietas de
frangos de corte [manuscrito] / Larissa Paula Silva Gomides. - 2018.
68 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. José Henrique Stringhini ; co-orientadora
Dra. Nadja Susana Mogyca Leandro ; co-orientador Dr. Marcos
Barcellos Café.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Escola
de Veterinária e Zootecnia (EVZ), Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia, Goiânia, 2018.

Bibliografia.

Inclui siglas, abreviaturas, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. digestibilidade . 2. enzima exógena . 3. nutrição . I. Stringhini ,
José Henrique, orient. II. Título.

CDU 635

ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA



1 ATA NÚMERO 51 DA SESSÃO DE JULGAMENTO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
2 MESTRADO DO (A) ALUNO **Larissa Paula Silva Gomides** do Programa de Pós-Graduação
3 em Zootecnia da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás. Aos
4 **28/03/2018**, a partir das **14h00min**, na sala de Reuniões do Departamento de Zootecnia da
5 Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, nesta Capital, realizou-se
6 a sessão pública de Defesa de Dissertação intitulada "**Protease monocomponente de *Bacillus***
7 **liqueniformis nas dietas de frangos de corte**", apresentado para obtenção do título de **Mestre**
8 **em Zootecnia**, junto à área de Concentração: Produção Animal. Os trabalhos foram instalados
9 pelo (a) Presidente da Comissão Julgadora, Orientador (a) **Prof. Dr José Henrique Stringhini**,
10 com a participação dos demais membros da Banca Examinadora, **Dr. Roberto de Moraes**
11 **Jardim Filho - SSA** e **Prof. Dra. Fabyola Barros de Carvalho**. Iniciando os trabalhos, a
12 Presidente concedeu a palavra ao (a) candidato (a) **Larissa Paula Silva Gomides**, para
13 exposição em **QUARENTA MINUTOS** do seu trabalho. A seguir, o senhor Presidente
14 concedeu a palavra, pela ordem, aos demais membros da banca, os quais passaram a arguir o
15 (a) candidato (a), durante o prazo máximo de **VINTE MINUTOS**, assegurando-se ao mesmo,
16 igual prazo para responder aos Senhores Membros da Banca Examinadora. Ultimada a
17 arguição, que se desenvolveu nos termos regimentais, a Comissão, em sessão secreta,
18 expressou seu Julgamento, considerando o (a) candidato (a) **APROVADA**
19 (aprovado/reprovado) pelos seus membros. Proclamados os resultados da Banca Examinadora,
20 foram encerrados os trabalhos e, para constar lavrou-se a presente ata que, após lida e achada
21 conforme vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

22 A Banca Examinadora aprovou a seguinte modificação no título da dissertação:

23 _____
24 _____
25 _____
26 _____
27 _____
28 _____
29 _____



Prof. Dr José Henrique Stringhini
(Presidente da Banca)



Dr. Roberto de Moraes Jardim Filho - SSA



Prof. Dra. Fabyola Barros de Carvalho

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por tanta luz, sabedoria, proteção, fé e graças nesses dois anos de mestrado e em toda a minha caminhada até aqui.

Aos meus pais, Emerson e Olinda, aos meus irmãos e toda a minha família, que me apoiaram financeiramente, compreenderam minhas ausências, auxiliaram nos experimentos, seguraram a barra nos momentos difíceis e respeitaram minhas escolhas, orando por mim e demonstrando seu amor sempre.

Ao Ranyere, meu namorado, por todo apoio emocional, pelo companheirismo e por ser essa pessoa espetacular escolhida por Deus para compartilhar, comigo, a vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Henrique Stringhini, que nesses cinco anos de trabalho tem me tratado como filha, me ensinando a ser uma profissional e uma pessoa melhor a cada dia, me protegendo, me apoiando, me ouvindo, aconselhando e trabalhando muito ao meu lado para podermos desenvolver um bom trabalho.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Marcos Barcellos Café, por toda ajuda durante a execução dos experimentos e durante todo o mestrado, pela prontidão, eficiência e amizade. À minha co-orientadora, Prof. Dra. Nadja Susana Mogyca Leandro, pelo auxílio e pela amizade e a todos os meus professores da EVZ, por todo ensinamento, paciência, orientação e críticas.

Ao Éder e ao Miron, por terem me auxiliado nas análises no Laboratório de Análise de Alimentos. Aos funcionários do Departamento de Zootecnia, aos funcionários da fábrica de ração e do setor de avicultura, em especial, Charles, Kelly e Felipe.

A DSM, especialmente ao Dimitri Freitas e Levy Teixeira e a Nutrial, especialmente ao Mihayr Moraes e a Maria Inês, pelo investimento e possibilidade de realização dos experimentos. A São Salvador Alimentos, ao Roberto Moraes e Maira Matos, que sempre apoiam os nossos experimentos.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos e a Funape pelo suporte financeiro ao desenvolvimento do trabalho.

Aos meus colegas de mestrado, a turma da PPGZ da avicultura e aos estagiários do setor de avicultura, em especial, Caniggia Lacerda, Letícia Souza, Fernanda Meneses, Adriano Crozara, Emizael Menezes, Bruno Mazini, Thaynara Martins, Lindolfo Dorcino, Julyana Machado, Miliane Alves, Pedro Rezende, Tiago Vieira, Dannielle Migoto, Genilson Bezerra, Lucas Batista, Amanda Rabelo, Billy Noronha, Marcella Fernanades, Lais de Melo e Itallo Faria.

Meus sinceros agradecimentos!

“ Tudo quanto fizerdes, fazei-o de todo coração, como
para o Senhor e não para homens, cientes de que
recebereis do Senhor a recompensa da herança. A
Cristo, o Senhor, é que estais servindo”
(Cl 3.34,24)

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS	16
FISIOLOGIA DA DIGESTÃO PROTEICA DAS AVES	17
ENZIMAS	18
PROTEASE.....	20
FATORES QUE AFETAM A UTILIZAÇÃO DA PROTEASE PELAS AVES	23
REFERÊNCIAS	25
CAPÍTULO 2. DESEMPENHO E RENDIMENTO DE CARCAÇA DE FRANGOS DE CORTE ALIMENTADOS COM DIETAS CONTENDO PROTEASE COM VALORIZAÇÃO DA MATRIZ NUTRICIONAL.....	29
INTRODUÇÃO.....	31
MATERIAL E MÉTODOS.....	32
CAPÍTULO 3. HISTOMORFOMETRIA INTESTINAL E METABOLIZABILIDADE DE NUTRIENTES DE FRANGOS DE CORTE ALIMENTADOS COM DIETAS CONTENDO PROTEASE E COM VALORIZAÇÃO DA MATRIZ NUTRICIONAL	46
INTRODUÇÃO.....	48
MATERIAL E MÉTODOS.....	49
RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
CONCLUSÃO.....	65
REFERÊNCIAS	65
CAPÍTULO 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	68

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 3

- FIGURA 1- Mensurações da altura da vilosidade do duodeno de frangos de corte machos suplementados com enzima protease na fase pré-inicial e inicial..... 55
- FIGURA 2- Mensurações da profundidade da cripta do duodeno de frangos de corte machos suplementados com enzima protease na fase pré-inicial e inicial..... 55
- FIGURA 3- Gráfico com os dois primeiros componentes principais para as variáveis de histomorfometria intestinal aos 7 dias de idade e a metabolizabilidade dos nutrientes aos 21 dias de idade de frangos de corte suplementados com protease..... 62
- FIGURA 4- Gráfico com os dois primeiros componentes principais para as variáveis de histomorfometria intestinal e a metabolizabilidade dos nutrientes aos 21 dias de idade de frangos de corte suplementados com protease 64

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

TABELA 1- Composição percentual e nutricional da ração experimental para a fase pré inicial de frango de corte	34
TABELA 2- Composição percentual e nutricional da ração experimental para a fase inicial de frango de corte	35
TABELA 3- Composição percentual e nutricional da ração experimental para a fase de crescimento de frango de corte	36
TABELA 4- Composição percentual e nutricional da ração experimental para a fase de abate de frango de corte	37
TABELA 5- Médias de peso inicial, peso médio final, ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar no período de 1 aos 7 dias de idade.....	39
TABELA 6- Médias de peso inicial, peso médio final, ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar no período de 1 a 21 dias de idade	40
TABELA 7- Médias de peso inicial, peso médio final, ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar no período de 1 a 35 dias de idade	41
TABELA 8- Médias de peso inicial, peso médio final, ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar no período de 1 a 42 dias de idade	42
TABELA 9- Rendimento de Carcaça e Cortes comerciais em relação ao peso da carcaça de frangos alimentados com diferentes valorizações e inclusão de protease aos 42 dias de idade	42
TABELA 10- Peso de órgãos de frangos alimentados com diferentes valorizações e inclusão de protease aos 42 dias de idade.....	43

CAPÍTULO 3

TABELA 1- Composição percentual e nutricional da ração experimental para a fase pré inicial de frango de corte	51
TABELA 2- Composição percentual e nutricional da ração experimental para a fase inicial de frango de corte	52
TABELA 3- Coeficientes de metabolizabilidade da matéria seca, do nitrogênio, balanço de nitrogênio e nitrogênio retido para rações de frangos alimentados com dietas contendo protease no período de 17 a 21 dias de idade.....	57
TABELA 4- Altura de vilo, profundidade de cripta e relação vilo:cripta do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) de frangos alimentados com dietas contendo protease aos 7 dias de idade	58
TABELA 5- Altura de vilo, profundidade de cripta e relação vilo:cripta do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) de frangos alimentados com dietas contendo protease aos 21 dias de idade	59
TABELA 6- Matriz de correlação entre as variáveis de histomorfometria intestinal aos 7 dias de idade e a metabolizabilidade dos nutrientes aos 21 dias de idade de frangos de corte suplementados com protease	61
TABELA 7- Matriz de correlação entre as variáveis de histomorfometria intestinal e a metabolizabilidade dos nutrientes aos 21 dias de idade de frangos de corte suplementados com protease	63

LISTA DE QUADROS**CAPÍTULO 2**

QUADRO 1- Descrição dos tratamentos experimentais32

QUADRO 2- Matriz de valorização da enzima protease (ProAct)33

CAPÍTULO 3

QUADRO 1- Descrição dos tratamentos experimentais49

QUADRO 2- Matriz de valorização da enzima protease (ProAct)50

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

HCl	- Ácido Clorídrico
pH	- Potencial Hidrogeniônico
ANOVA	- Análise de Variância
NH ₃	- Amônia
PO ₄	- Fostato
SO ₄	- Sulfato
CO ₂	- Dióxido de carbono
NO	- Óxido de Nitrogênio

RESUMO

Foram realizados dois experimentos com o objetivo de avaliar o efeito da adição da enzima protease 0,02% (Ronozyme ProAct) em dietas valorizadas a base de milho e farelo de soja para frangos de corte. Em ambos os experimentos foram utilizados os mesmos tratamentos: T1- ração controle, T2- uma valorização da matriz nutricional proposta pela enzima mas sem o aditivo, T3- o dobro da valorização proposta em T2 sem enzima, T4- T2 com enzima, T5- T3 com enzima. No primeiro experimento, para a determinação do desempenho e rendimento de carcaça e cortes, foram alojados 1200 pintos de corte de 1 dia de idade, distribuídos em delineamento inteiramente casualizado, totalizando 5 tratamentos, com 8 repetições e 30 aves por box. No segundo experimento para a determinação dos coeficientes de metabolizabilidade e histomorfometria intestinal, foi utilizado o método de coleta total de excretas e coleta dos seguimentos intestinais em 300 pintos de corte alojados em gaiolas de aço galvanizado com 1 dia de idade, distribuídos em delineamento inteiramente casualizado, submetidos à 5 tratamentos e 6 repetições de 10 aves cada. Em ambos experimentos, a análise de dados foi realizada utilizando-se a análise de variância (ANOVA). No primeiro experimento, quando os dados foram estatisticamente diferentes a 10% de probabilidade, foram comparados pelo Teste de Scott Knott e no segundo experimento, quando os dados foram estatisticamente diferentes a 5% foram comparados pelo Teste de Scott Knott. No segundo experimento também foi realizada análise multivariada de componentes principais e estimadas as correlações de Pearson. Frangos alimentados com o tratamento de uma valorização e inclusão da protease obtiveram o mesmo peso final e ganho de peso do tratamento controle até os 35 dias de idade. As aves que receberam o tratamento controle apresentaram maior rendimento de carcaça, e no peso dos cortes, não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos com protease. As dietas que continham protease apresentaram maior coeficiente de metabolizabilidade da matéria seca (CMMS) e coeficiente de metabolizabilidade do nitrogênio (CMN), demonstrando que a suplementação da enzima foi eficaz. Houve maior altura de vilo e relação vilo:cripta do íleo em frangos alimentados com dietas suplementadas com protease aos 7 dias de idade, entretanto, aos 21 dias a inclusão da protease não foi superior ao tratamento controle. Foi observado forte correlação positiva e significativa entre as variáveis de metabolizabilidade e histomorfometria intestinal. Portanto, recomenda-se a utilização da protease em dietas para frangos de corte.

Palavras-chave: digestibilidade, desempenho, enzima exógena, nutrição

ABSTRACT

Two experiments were carried out to evaluate the effect of the addition of 0.02% protease enzyme (Ronozyme ProAct) on diets based on corn and soybean meal for broilers. In both experiments, the same treatments used: T1- control ration, T2- a value of the nutritional matrix proposed by the enzyme but without the additive, T3- twice the value proposed in T2 without enzyme, T4- T2 with enzyme, T5- T3 with enzyme. In the first experiment, to determine the performance and yield of carcass and cuts were housed 1200 broiler chicks of 1 day of age, distributed in a completely randomized design, totaling 5 treatments, with 8 replicates and 30 birds per box. In the second experiment for the determination of metabolizable coefficients and intestinal histomorphometry, the method of total collection of excreta and intestinal tract collection was used in 300 chicks housed in galvanized steel cages at 1 day of age, distributed in a completely randomized design, submitted to 5 treatments and 6 replicates of 10 birds each. In both experiments, data analysis was performed using analysis of variance (ANOVA). In the first experiment, when the data were statistically different at 10% probability, they were compared by the Scott Knott Test and in the second experiment, when the data were statistically different at 5%, they were compared by the Scott Knott Test. In the second experiment we also performed a multivariate analysis of the main components and estimated the Pearson correlations. Chickens fed the one valued with enzyme treatment obtained the same final weight and weight gain as the control until 35 days of age. The birds that received the control treatment presented higher carcass yield, and in the weight of the cuts, there were no statistical differences between the protease treatments. Diets with protease showed higher dry matter metabolizable coefficient and nitrogen metabolizable coefficient, demonstrating that enzyme supplementation was effective. There was higher villus height and villus ratio: ileus crypt in broilers fed diets supplemented with protease at 7 days of age, however, at 21 days protease inclusion was not superior to the control treatment. A strong positive and significant correlation was observed between metabolizable and intestinal histomorphometry variables. Therefore, recommended to use protease in broiler diets.

Keywords: digestibility, exogenous enzyme, nutrition, performance

CAPÍTULO 1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O crescimento da avicultura ocorreu principalmente pelo melhoramento genético que aliado à nutrição, técnicas de biossegurança, ambiência e manejo específico permitiu ao frango de corte maior ganho de peso, melhor rendimento de carcaça e eficiência alimentar num menor período de criação. Porém, a melhora destes índices produtivos levou a exigência de maior aporte nutricional, principalmente em energia e proteína. Os custos com alimentação estão em torno de 60 a 75% e a proteína contribui com cerca de 45% dos custos totais da ração.

A principal fonte de proteína atualmente utilizada nas dietas é o farelo de soja, e é um ingrediente considerado oneroso para o custo final da dieta. Completa-se com esse fato, que variáveis quantidades de proteína bruta e aminoácidos podem ser encontrados no íleo e na excreta das aves³, sugerindo uma incompleta digestão e absorção, justificado pela não produção ou produção insuficiente de determinadas enzimas necessárias para quebra de ligações, além dos fatores antinutricionais presentes nos alimentos que indisponibilizam a utilização de energia e nutrientes pelo animal. Uma das alternativas para aumentar a metabolizabilidade e absorção de proteínas no trato gastrointestinal das aves é a inclusão de enzima protease nas dietas.

Nos últimos anos, o uso de enzimas evoluiu consideravelmente em função do custo crescente dos ingredientes das formulações para as aves e pelo aumento da oferta de produtos que atuam em diferentes substratos. Em dietas formuladas com milho e farelo de soja existem várias oportunidades para ganho de eficiência.

Numerosos estudos com suplementação enzimática em dietas de aves têm sido publicados recentemente, principalmente com frangos de corte, entretanto, poucos estudos tem sido publicados usando enzimas monocomponentes. Os principais efeitos benéficos da suplementação de proteases nas dietas são a melhora do desempenho dos animais e aumento da digestibilidade aparente da proteína bruta e dos aminoácidos, a redução ou eliminação dos fatores antinutricionais presentes nos grãos, a potencialização da ação das proteases endógenas e a diminuição da poluição ambiental causado pelos nutrientes excretados⁴.

Deste modo, objetivou-se avaliar dietas valorizadas, suplementadas ou não por enzima protease (0,02%) nos parâmetros de desempenho, rendimento de cortes comerciais, metabolizabilidade dos nutrientes e histomorfometria intestinal de frangos de corte.

FISIOLOGIA DA DIGESTÃO PROTEICA DAS AVES

A digestão proteica do frango de corte inicia-se no proventrículo. Esse órgão secreta ácido clorídrico e pepsinogênio produzido nas células parietais e principais. O ácido ou a pepsina transformam o pepsinogênio em pepsina (forma ativa) e o pH ácido é o ideal para a enzima funcionar. Portanto, no proventrículo, as proteínas em meio ácido se desnaturam e sofrem a ação da pepsina⁵. A pepsina é uma endopeptidase, que cliva rapidamente resíduos de fenilalanina, triptofano e leucina, já os resíduos de ácido glutâmico, ácido aspártico, cistina e alanina são pontos de clivagem mais lentos. O aminoácido-alvo é clivado na extremidade nitrogênio ou carboxila⁶.

Através da motilidade proventrículo-moela, o alimento vai sendo triturado e digerido, dessa forma, as proteínas parcialmente digeridas passam para o duodeno. A eficácia da digestão proteica depende da característica física da proteína ingerida e do tempo de permanência no proventrículo-moela, pois a hidrólise péptica cessa quando o pH do quimo é aumentado no duodeno⁵.

A chegada da ingesta no duodeno vai estimular a produção de hormônios (gastrina, colecistoquinina, secretina) e estes a liberação da bile e do suco pancreático (rico em proteases, carboidrases, lipases e bicarbonato de sódio), pelo fígado e pelo pâncreas, respectivamente⁷. As proteases que agem no intestino delgado podem ser divididas em três grupos: endopeptidases e exopeptidases secretadas pelo pâncreas, e aminopeptidases secretadas pela mucosa intestinal⁸. As principais enzimas proteolíticas do pâncreas são: tripsina, quimiotripsina, carboxipeptidases A e B e elastase. O pâncreas secreta zimogênios inativos que serão ativados no lúmen intestinal. O tripsinogênio é ativado pela enteroquinase secretada pelo próprio intestino, transformando-se em tripsina que autorregula a ativação do tripsinogênio, bem como os demais zimogênios⁵.

A tripsina, a quimiotripsina e a elastase são endopeptidases que atuam no interior da cadeia, produzindo vários oligopeptídeos, já as carboxipeptidases A e B, são exopeptidases que hidrolisam a proteína pelos aminoácidos da extremidade carboxi-terminal⁹.

A digestão proteica no intestino delgado é muito mais rápida e intensa devido à ação das enzimas pancreáticas responsáveis pela digestão no lúmen intestinal e pelas enzimas presentes na mucosa intestinal. Porém há evidências que pequenas porções peptídicas são resistentes a hidrólise luminal. A digestão dos peptídeos provenientes da ação das enzimas gástricas e pancreáticas até aminoácidos são completadas pelas múltiplas peptidases produzidas pelas células das vilosidades das porções iniciais do intestino delgado. As peptidases mais

importantes são as aminopolipeptidases e as dipeptidases, que desdobram os peptídeos remanescentes em tripeptídeos e dipeptídeos e alguns aminoácidos¹⁰.

ENZIMAS

Biologicamente, enzimas são proteínas globulares específicas, com uma complexa estrutura tridimensional, que funcionam como catalisadores biológicos de determinado substrato, funcionando em soluções aquosas sob condições ótimas de temperatura, pH e umidade¹¹.

Uma enzima exógena, é definida como um aditivo contendo material enzimático processado e padronizado, formado com a finalidade de ser comercializado para uso em alimentos ou matérias primas para consumo animal¹². As enzimas exógenas utilizadas nas rações avícolas são produzidas industrialmente em laboratórios por meio de culturas aeróbias, sendo derivadas principalmente da fermentação bacteriana, ou fúngica ou de leveduras destacando-se bactérias do gênero *Bacillus* e fungos do gênero *Aspergillus*¹³.

No Brasil, o uso de enzimas exógenas iniciou-se devido ao custo elevado das fontes de fósforo e a viabilidade econômica da enzima fitase. Posteriormente, outras enzimas como as proteases e carboidrases começaram a ser adicionadas nas rações de frangos visando complementar as enzimas que são produzidas pelo próprio animal, melhorando o aproveitamento dos nutrientes e a eficiência nutricional da ração ocasionando em redução no custo de produção¹⁴. As carboidrases compreendem as amilases, pectinases, β -glucanases, arabinoxilanases, celulasas e hemicelulasas, que possuem como substratos, respectivamente, o amido, pectinas, β -glucanos, arabinoxilanos, celulose e hemicelulose. As proteases, por sua vez, incluem as proteases ácidas e alcalinas, cujos substratos específicos são as proteínas¹⁵.

Para se obter melhores resultados com a suplementação enzimática, as enzimas utilizadas precisam ser capazes de resistir a condições desfavoráveis durante o processo de preparações das rações que possui alterações de temperatura e umidade na peletização, extrusão e no armazenamento¹⁶. Sabendo disso, a termoestabilidade da enzima é um fator que afeta sua ação catalítica, pois depende do tipo de micro-organismo que produz a enzima, sendo menos resistentes (até 75°C) aquelas produzidas por fungos e mais resistentes (80 a 90°C) as produzidas por bactérias¹⁷. Outro ponto a ser considerado, é a resistência da enzima no trato gastrointestinal dos animais, já que ocorre ação das enzimas proteolíticas e do ácido clorídrico no estômago, alta variação de pH e umidade, presença de co-enzimas e inibidores no local em que ocorrerá a reação e concentração do substrato e da enzima^{18,19}. O conhecimento do substrato

é fator chave na utilização de enzimas, por isso a suplementação deve ser direcionada em fases específicas que contenham quantidade de substrato passível de atuação por parte das mesmas²⁰. O grau de melhora a ser obtido com a inclusão de enzimas na dieta também depende de diversos fatores que afetam a digestibilidade dos ingredientes, dentre os principais, a espécie do animal (aves respondem melhor à inclusão que suínos), a idade do animal, condição sanitária, sistema de criação, concentração de enzimas utilizadas, tipo de matéria prima das rações, produção de enzimas endógenas e a capacidade de ingestão de ração.

Existem três formas de se adicionar enzimas nas rações, a primeira é conhecida como “over the top”, que consiste em suplementar a enzima sobre uma formulação padrão, sem alterar os níveis nutricionais da dieta²¹. A adição da enzima dessa forma aumentará o custo de formulação, uma vez que se o animal estiver com suas exigências nutricionais supridas pela ração, a adição da enzima produzirá um excesso de nutrientes que se forem aproveitados pelo animal serão convertidos em gordura ou serão excretados²². A outra forma da inclusão das enzimas consiste adicionar enzimas exógenas em dietas com nutrientes reduzidos, onde a adição das enzimas irá restaurar o valor nutricional da dieta padrão, obtendo o mesmo desempenho de uma dieta com os níveis nutricionais recomendados, visando assim, a diminuição no custo das formulações²¹.

Alguns estudos que demonstram a utilização de enzimas nas dietas, comprovam que seus efeitos são mais pronunciados quando as dietas são formuladas com baixos níveis de proteína²³. A terceira forma de se adicionar enzima nas dietas considera superestimação de um nutriente, porém mais comumente de energia metabolizável de um ou mais ingredientes da ração para adição da enzima exógena²⁴. Deve-se, portanto, ter cautela com a forma de suplementação escolhida para que a enzima possa exercer seu efeito eficientemente⁹.

Segundo Bedford e Partridge²⁵, os benefícios de se incluir enzimas na ração são:

- A melhora na eficiência alimentar e redução do custo pela destruição dos fatores anti-nutricionais, tornando os nutrientes mais disponíveis para absorção;
- a melhora da absorção de nutrientes, reduzindo o volume de excreta produzida e diminuindo a excreção de fósforo e nitrogênio;
- a redução da variação nutricional nos ingredientes alimentares, resultando em crescimento animal mais uniforme e produção de ovos;
- a manutenção da saúde intestinal - ao melhorar a digestibilidade dos nutrientes, poucos nutrientes estão disponíveis no intestino dos animais para o potencial crescimento de bactérias causadoras de doenças.

Diversos estudos avaliam a inclusão de enzimas em programas enzimáticos, onde são adicionados *blends*, ou seja, misturas de diversas enzimas²⁶. Esses trabalhos encontram efeitos satisfatórios na digestibilidade e no desempenho do animal, pois há um efeito sinérgico entre as enzimas, como por exemplo, o uso da xilanase, que diminui a viscosidade da dieta, possibilitando maior superfície de contato da digesta e ação das demais enzimas¹⁸. Carvalho et al.²⁷, trabalhando com enzimas (xilanase, amilase e protease), em dietas para frangos a base de milho e farelo de soja, ainda com inclusão de farinha de carne e ossos, encontraram que os melhores resultados de conversão alimentar foram obtidos com o uso de complexo enzimático principalmente na recuperação do desempenho das aves alimentadas com rações com 3% menos energia metabolizável.

Apesar se haver grandes efeitos na utilização de *blends*, torna-se necessário o estudo de enzimas monocomponentes, para se conhecer o real efeito isolado de cada uma e até onde os seus efeitos podem ser considerados.

PROTEASE

Proteases são enzimas que degradam proteína, são produzidas de forma endógena pelos animais e de forma exógena por microrganismos. Na forma exógena, são adicionadas às rações experimentais como aditivos alimentares. As proteases exógenas podem ser produzidas por diversos microrganismos, como bactérias²⁸ e fungos²⁹. As proteases podem ser classificadas em três grupos: proteases ácidas, com atividade em pH variando de 2,0 a 5,0; as neutras, com atividade ótima em pH entre 6,0 e 9,0; e as alcalinas, com atividade entre pH 9,0 e 11,0³⁰. Entretanto, Pant et al.³¹ consideram as proteases com pH ótimo de 7,4 como alcalinas.

A maioria das pesquisas realizadas, especificamente com frangos de corte, utilizam proteases exógenas de serina, tais como as enzimas endógenas, quimiotripsina, tripsina e elastase. Entretanto, diferem dessas por serem endopeptidases relativamente sem especificidade quanto à hidrólise de ligações peptídicas e, portanto, com potencial de ação sobre todas as proteínas³². Ghazi et al.³³, observaram diferenças entre fontes de protease, e, que estas proteases poderiam aumentar a energia metabolizável verdadeira e a digestibilidade de nitrogênio em frangos. Ghazi et al.³⁴, notaram melhora no desempenho de frangos de corte quando incluíram uma protease específica (produzida a partir de cepas de *Aspergillus*) em dietas à base de farelo de soja. No entanto, o desempenho das aves não melhorou quando se utilizou outra protease específica, produzida a partir de cepas de *Bacillus*.

A protease exógena tem sido alvo de avaliações científicas e comerciais de enzimas nos últimos 15-20 anos, mas ficou disponível como enzima monocomponente apenas nos últimos 5-10 anos³⁵. A motivação para o uso de protease exógena na nutrição de monogástricos é tipicamente a redução do custo da alimentação. Este objetivo geralmente é alcançado com a diminuição de fontes de proteína e aminoácidos de alto custo na dieta com a atribuição de uma matriz de nutrientes na formulação com a enzima ao menor custo. Os estudos iniciais sobre a sua utilização, considerou importante os efeitos positivos no desempenho e rendimento de carcaça de frangos de corte, seguido pela digestibilidade de nitrogênio. A partir destes resultados, pesquisadores iniciaram as avaliações de digestibilidade ileal de aminoácidos e nutrientes alternativos³⁵⁻³⁷. Além disso, avaliaram a interação da protease com vários ingredientes dietéticos.

Recentemente, há estudos dos demais efeitos resultantes da suplementação da protease, incluindo benefícios ambientais, gerenciamento de lixo, recuperação entérica, uniformidade e estabilidade microbiana. Embora esses efeitos “secundários” possam não ser o principal motivador para o uso de proteases na produção animal, eles são cada vez mais visíveis. Além disso, as respostas, se entendidas, permitem tradução positiva para medidas de produtividade, como consumo de ração reduzido e ganho de peso aumentado³⁸.

A origem do efeito benéfico da protease na saúde intestinal não é clara, mas pode ser uma combinação de vários fatores que se interagem. Tais fatores podem incluir uma redução na fermentação da proteína no intestino grosso^{39,40}, hidrólise de fatores antinutricionais e proteínas antigênicas^{33,42}, uma mudança no local da digestão macro-nutriente para segmentos mais proximais do intestino⁴², viscosidade reduzida no lúmen intestinal⁴³, retenção melhorada de cálcio e fósforo⁴⁴, maior disponibilidade de aminoácidos para a síntese de mucina³⁸ e integridade das vilosidades intestinais⁴¹.

A fermentação da proteína no trato gastrointestinal distal possui consequências importantes que dependem da extensão do refluxo e da composição de aminoácidos da proteína fermentada. De acordo com estimativas aproximadas, os lactobacilos do intestino delgado podem assimilar 3-6% do total de aminoácidos da dieta. Se a proteína é altamente digerível e os aminoácidos são amplamente absorvidos no intestino delgado superior, local em que o crescimento bacteriano é suprimido, a proporção capturada pelo hospedeiro pode ser maior. As enzimas exógenas que promovem a digestão protéica proporcionam uma vantagem competitiva ao frango, oferecendo menor potencial de crescimento para bactérias dependentes de aminoácidos nos cecos. A fermentação de proteínas geram subprodutos que incluem aminas, indóis, fenóis, cresol e amônia, que podem afetar negativamente a saúde do hospedeiro ou das

células⁴⁰. A fermentação de aminoácidos de cadeia ramificada (valina, isoleucina, leucina) geram ácidos graxos de cadeia ramificada tais como isobutirato, isovalerato e 2-metilbutirato. O metabolismo de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina, triptofano) por bactérias no intestino produz compostos fenólicos e indólicos. A fermentação de mucoproteínas e aminoácidos que contêm enxofre (metionina, cistina e taurina) resulta na produção de sulfato de hidrogênio³⁹. Todas as ações para reduzir a quantidade de proteína no íleo também podem reduzir a produção de metabólitos tóxicos de fermentação de proteínas no ceco⁴⁰.

A adição de proteases exógenas aumenta o potencial desejável para a inativação de fatores antinutricionais, como lecitinas, proteínas antigênicas e inibidores de tripsina, presentes, particularmente, nas leguminosas, podendo também auxiliar na atividade proteolítica das enzimas endógenas dos animais jovens. Além de auxiliar na inativação dos fatores antinutricionais, podem degradar proteínas de armazenamento como conglicina, β -conglicina e karfirina⁹.

O envolvimento de mucina nos efeitos da protease exógena foi demonstrado por Cowieson e Roos³⁸. Observou-se correlação significativa do efeito da protease e a digestibilidade de aminoácidos e o perfil de aminoácidos da mucina intestinal. A partir desta relação, é possível observar que uma parte do efeito benéfico da protease na digestibilidade de aminoácidos seja obtida pela redução na perda de mucoproteína do intestino, colaborando com a saúde intestinal. Peek et al.⁴⁵ testaram o efeito de uma dieta de milho-trigo-soja suplementada com protease em frangos de corte desafiados com *Eimeria* spp. e relataram que a suplementação dietética com protease reduziu o impacto negativo da infecção por coccidiose no ganho de peso e a camada de mucina do intestino foi significativamente mais espessa.

Kalmendal e Tauson⁴⁶, avaliando dietas para frangos de corte a base de trigo e farelo de soja suplementadas com anticoccidiano ionóforo e uma serina protease, perceberam que as dietas suplementadas com protease sem o uso de anticoccidiano aumentou o tamanho do jejuno e do íleo, isso refletiu em melhor conversão alimentar das aves.

As proteases aumentam os coeficientes de digestibilidade de diversos aminoácidos³⁷ e muitas vezes aumentam a digestibilidade de nutrientes não-protéicos o que pode estar associado a mudanças na macroestrutura da matriz do nutriente após a proteólise, alteração da taxa de passagem do alimento pelo trato gastrointestinal ou melhora da saúde intestinal. Cowieson et al.⁴¹ observaram que a adição de protease a dietas à base de milho e farelo de soja aumentou a energia metabolizável aparente de 3130 kcal/kg para 3261 kcal/kg. Stefanello et al.⁴⁷ relataram que a suplementação de uma dieta à base de milho e farelo de soja para frangos com protease exógena aumentou significativamente a digestibilidade ileal de Arg,

Lis, Leu, Treo, e Met em 3,1%, 3,1%, 4,8%, 3,3% e 1,9% respectivamente, e, de energia metabolizável aparente de 13,22 MJ/Kg para 13,46 MJ/Kg.

O uso da protease em dietas de frangos de corte pode resultar em benefício ambiental, além da redução do nitrogênio das excretas, melhora na qualidade da cama e diminuição da amônia. Oxemboll et al.⁴⁸ demonstraram que a inclusão de protease em dietas de frango de corte com base de milho e farelo de soja e teor de proteína bruta reduzido, diminuiu a emissão de NH₃ e NO_x nas excretas e quando avaliado o consumo de ração, puderam observar redução da eutrofização (g PO₄ equivalentes), acidificação (g SO₄ equivalentes) e aquecimento global (kg CO₂ equivalentes). Leinonen e Williams⁴⁹ relataram que o uso de protease nas dietas de frangos de corte reduziu os impactos ambientais da produção das matérias primas utilizadas nas rações e na produção de frangos. Sendo na produção de frangos, principalmente pela redução das emissões de amônia que tem um benefício substancial na indústria avícola.

FATORES QUE AFETAM A UTILIZAÇÃO DA PROTEASE PELAS AVES

A atividade enzimática é compreendida como a atividade catalítica necessária para converter uma quantidade específica de substrato em uma quantidade específica de um produto, por unidade de tempo sob uma condição específica. É neste contexto que as enzimas são avaliadas quanto a sua atividade. Mas, na prática, as condições de tempo de passagem e até mesmo condições físico-químicas do trato digestório dos animais podem sofrer alterações, em consequência ao tipo de dieta (granulometria, fibras, extrato etéreo, pH e efeito tampão do alimento, dentre outros), condições ambientais (alcalose respiratória e acidose metabólica), qualidade físico-química da água (pH, teor e tipo de minerais presentes), além de outros aspectos⁵⁰.

O principal fator que promove a digestibilidade das dietas está relacionado com a digestibilidade inerente de aminoácidos na dieta ou do alimento em questão. Em meta-análise publicada por Cowieson e Roos³⁸, foi relatado que parte considerável (47%) da variabilidade no efeito da protease exógena na digestibilidade de aminoácidos ileais foi explicada pela digestibilidade inerente à dieta controle. Quando a digestibilidade inerente dos aminoácidos na dieta controle foi superior a 90%, houve melhoria da digestão de cerca de 2% mediada pela protease³⁸. Isso demonstra que um dos fatores que podem determinar a real eficácia da protease é a qualidade da dieta utilizada. Portanto, refere-se ao maior cuidado que deve-se ter nos controles de qualidade das fábricas de ração, na formulação das dietas com ingredientes íntegros e com alto padrão de qualidade.

Outros fatores que podem promover o efeito da protease exógena na digestibilidade de aminoácidos ileais estão relacionados com a estrutura terciária da proteína digerida e as suas características, como por exemplo, globular, fibroso, hidrofóbico ou polar etc. e também a presença de fatores antinutricionais, que podem alterar o fluxo de proteínas endógenas⁵¹. Diversos autores discutem os métodos mais eficazes para determinar a digestibilidade de proteínas e aminoácidos. Ainda não se sabe se os métodos para determinar a digestibilidade de proteínas e aminoácidos também são os melhores métodos para determinar a eficácia das proteases exógenas. Hoje, as proteases são avaliadas por digestibilidade aparente, padronizada ou verdadeira de aminoácidos ileais. No entanto, o desenvolvimento de um ensaio mais adequado para avaliar uma protease deve ser considerado no futuro¹¹.

Alguns relatos demonstram que a quantidade de energia na dieta e a inclusão de óleo afeta a digestibilidade de aminoácidos. Cowieson et al.⁵², observaram que a redução da gordura adicionada em uma dieta inicial de frangos de corte em 20 g/kg resultou em redução significativa (3-4%) na digestibilidade de aminoácidos ileal medida aos 21 dias de idade. Presumivelmente, a adição de óleo na dietas promove maior tempo de retenção do alimento no sistema digestório, pois, segundo Swenson e Reece⁵³, a gordura dietética estimula a liberação do hormônio colicistoquinina, que diminui a velocidade de esvaziamento do sistema digestório, portanto, a gordura adicionada na ração aumentará o tempo de exposição da proteína dietética à pepsina e ao HCl, aumentando a conversão de proteínas de alto peso molecular em polipeptídeos solúveis de menor peso molecular, o que, por sua vez, aumenta disponibilidade de substrato para ação das proteases exógenas e também endógenas.

O uso da protease em dietas de frangos de corte em doses aumentadas ainda é pouco estudado, entretanto estudos de Angel et al.³⁷ e Freitas et al.³⁶ sugerem que os efeitos benéficos da protease são aumentados por elevadas concentrações de inclusão de forma linear³⁷ ou quadrática³⁶. A curva de resposta a dose de qualquer enzima estará ligada à disponibilidade de substrato e o resultado esperado, e é provável que estas respostas sejam diferentes, de acordo com a composição da dieta, a idade da ave, entre outras. No entanto, a maioria das enzimas exógenas seguem uma curva de resposta a dose linear e é provável que isso também seja verdade para a protease exógena⁵¹.

REFERÊNCIAS

- 1- Fischer G, Maier JC, Rutz F, Bermudez VL. Desempenho de Frangos de Corte Alimentados com Dietas à Base de Milho e Farelo de Soja, com ou sem Adição de Enzimas. Revista Brasileira Zootecnia. 2002;31(1):402-410
- 2-Teixeira M. Anátomo-clínica e biologia em frangos de corte experimentalmente infectados com *eimeria acervulina* e suplementados com betaína. [Tese]. Seropédica: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; 2007.
- 3- Parsons CM, Castanon F, Han Y. Protein and amino acid quality of meat and bone meal. Poultry Science. 1997;76:361-368
- 4- Utimi NBP. Efeitos da adição de complexo multienzimático sobre o desempenho de frangos de corte. [Dissertação]. Pirassununga: Universidade de São Paulo, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos; 2012
- 5- Macari M, Furlan RL, Gonzales E. Fisiologia Aviária Aplicada a Frango de Corte. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 2002.
- 6- Dozier WA. Fisiologia da digestão de proteína em aves. II Fórum de Enzimas; 2008 Anais p. 3- 7.
- 7- Argenzio R.A. Funções Secretórias do Trato Gastrointestinal. In: Swenson MJ, Reece WO. Dukes: Fisiologia dos Animais Domésticos. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1993. p.319-329.
- 8- Champe PC, Harvey RA. Bioquímica Ilustrada. 2.ed. Porto Alegre: Artes Máficas Sul; 1996. p. 446.
- 9- Sakomura NK, Silva JHV, Costa FGP, Fernandes JBK, Hauschild L. Nutrição de Não Ruminantes. Jaboticabal: Funep, 2014. p.678
- 10- Peluzio M.CG, Batista ES. Proteínas. In: Costa NMB, Peluzio MCG. Nutrição Básica e Metabolismo. Viçosa: Editora UFV; 2008. p. 120- 154.
- 11- Angel R, Sorbara JOB. Why is it important to understand substrates if we are to optimize exogenous enzyme efficacy? Poultry Science. 2014;93: 2375–2379,.
- 12- Dessimoni GV. Planos nutricionais com suplementação de protease em dietas de frangos de corte. [Dissertação], Diamantina: Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri; UFVJM, 48 p. 2011.
- 13- Lima UA, Aquarone E, Borzani W, Schmidell W. Coleção Biotecnologia Industrial. Processos Fermentativos e Enzimáticos. São Paulo: Edgard Blücher; 2001.p. .593.
- 14- Leite PRSC. Digestibilidade dos nutrientes da ração e desempenho de frangos de corte alimentados com rações formuladas com milheto ou sorgo e suplementadas com enzimas.

[Dissertação] Goiânia: Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia; 2009.

- 15- Oliveira MC, Moraes VMB. Mananoligossacarídeos e enzimas em dietas à base de milho e farelo de soja para aves. *Ciência Animal Brasileira*. 2007;8(3):339- 357.
- 16- McCleary BV. Analysis of feed enzymes. In: Bedford MR. and Partridge GG. *Enzymes in farm animal nutrition*. Oxford: Cab Publishing; 2001.
- 17- Officer DI. Feed enzymes. In: D'Mello JPF. *Farm animal metabolism and nutrition*. Edinburgh: Cab International; 2000. p.405-426.
- 18- Campestrini E, Silva VTM, Appelt MD. Utilização de enzimas na alimentação animal. *Revista Eletrônica Nutritime*. 2005;6(2):254-267.
- 19- Borges CAQ. Avanços nutricionais para otimização de resultados na avicultura. *Fórum Internacional de Avicultura*; 2005; Foz do Iguaçu, Brasil. *Anais. Animalworld*; 2005; 185-193.
- 20- Araújo JÁ, Silva JHV, Amâncio ALL, Lima MR, Lima, CB. Uso de Aditivos na alimentação de aves. *Acta Veterinária Brasílica*. 2007;1(3):69-77.
- 21- Barbosa NAA, Sakomura NK, Fernandes JBK, Dourado LRB. Enzimas exógenas no desempenho e na digestibilidade ileal de nutrientes em frangos de corte. *Pesq. Agro. Bras*. 2008;43(6):755-762.
- 22- Lecznieski JL. Considerações práticas do uso de enzimas. *Seminário Internacional de Aves e Suínos*; 2006; Florianópolis, Brasil. *Anais. Florianópolis: AVESUI*. p. 34-46.
- 23- Wang JJ, Garlich JD, Shih JCH. Beneficial effects of Versazyme, a keratinase feed additive, on body weight, feed conversion, and breast yield of broiler chickens. *J. Appl. Poult. Res*. 2006;15:544–550.
- 24- Brum PAR, Lima GJMM, Avila, VS, Coldebella A, Zanotto DL, Rosa PS. Uso da alfa-amilase em dietas, superestimando ou não a energia metabolizável do farelo de soja, no desempenho de frangos de corte. *Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia*; 2007; Jaboticabal, Brasil. São Paulo: Sociedade Brasileira de Zootecnia; 2007.
- 25- Bedford MR and Partridge, G.G. *Enzymes in farm animal nutrition*. 2nd ed. Oxford: Cab Publishing; 2011.
- 26- Olukosi OA, Beeson LA, Englyst K, Romero LF. Age-related influence of a cocktail of xylanase, amylase, and protease or phytase individually or in combination in broilers. *Poultry Science*. 2007; 86:77-86.
- 27- Carvalho JCC, Bertechini AG, Fassani EJ. 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*. 2009;38(2):292-298

- 28- Silva CR, Delatorre AB, Martins MLL. Effect of the culture conditions on the production of an extracellular protease by thermophilic *Bacillus* sp. and some properties of the enzymatic activity. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2007; 38:253-258.
- 29- Gottschalk G. Catabolic activities of aerobic heterotrophs. *Bacterial metabolism*. Ed. Springer, sd edition; 1985. p.144.
- 30- Guerra JB. Melhoramento de *Bacillus* produtores de alfa-amilases, por fusão de protoplastos. [Dissertação]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 1991.
- 31- Pant G, Prakash A, Pavani JVP, Bera S, Deviram GVNS, Kumar A, Panchpuri M, Prasuna RG. Production, optimization and partial purification of protease from *Bacillus subtilis*. *Journal of Taibah University for Science*. 2015; 9:50-55.
- 32- Meneghetti C. Associação de enzimas em rações para frangos de corte. [Tese]. Lavras: Universidade Federal de Lavras, Departamento de Zootecnia; 2013.
- 33- Ghazi S, Rooke JA, Galbraith H, Bedford MR. The potential for the improvement in the nutritive value of soybean meal by different proteases in broiler chicks and broiler cockerels. *Brasilian Poultry Science*. 2002;43:70-77.
- 34- Ghazi S, Rooke JA, Galbraith H, Morgan A. Effect of adding protease and alphagalactosidase enzyme to soybean meal on nitrogen retention and true metabolisable energy in broilers. *British Poultry Science*. 1997;38:528-531.
- 35- Fru-Nji F, Klueenter AM, Fischer M, Pontoppidan K. A feed serine protease improves broiler Performance and energy digestibility. *The Journal of Poultry Science*. 2011;48(10):239–246.
- 36- Freitas DM, Vieira SL, Angel CR, Favero A, Maiorka A. Performance and nutrient utilization of broilers fed diets Supplemented with a novel monocomponent protease. *Journal Applied Poultry Research*. 2011;20:347–352.
- 37- Angel CR, Saylor W, Vieira SL, Ward N. Effects of a monocomponent protease on performance and protein utilization in 7- to 22- day-old broiler chickens. *Poultry Science*. 2011; 90:2281–2286.
- 38- Cowieson AJ, Roos FF. Bioefficacy of a mono-component protease in the diets of pigs and poultry: a meta-analysis of effect on ileal amino acid digestibility. *J. Appl. Anim. Nutr*. 2014; 2: 13–21.
- 39- Windey K, De Preter V, Verbeke K. Relevance of protein fermentation to gut health. *Mol. Nutr. Food Res*. 2012; 56:184-196.
- 40- Apajalahti J, Vienola K. Interaction between chicken intestinal microbiota and protein digestion. *Anim. Feed Sci. Tech*. 2016; 221: 323-330.
- 41- Cowieson AJ, Lu H, Ajuwon K, Knap I, Adeola O. Interactive effects of dietary protein source and exogenous protease on growth performance, immune competence and jejunal

health of broiler chickens. *Anim. Prod. Sci.* 2016 [citado 4 fev 2018]. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1071/AN15523>

- 42- Liu SY, Selle PH, Court SG, Cowieson AJ. Protease supplementation of sorghum-based broiler diets enhances amino acid digestibility coefficients in four small intestinal sites and accelerates their rates of digestion. *Anim. Feed Sci. Technol.* 2013;183:175–183.
- 43- Barekatain MR, Antipatis C, Choct M, Iji PA. Interaction between protease and xylanase In broiler chicken diets containing sorghum distillers dried grains with solubles. *Anim. Feed Sci. Technol.* 2013;182:71–81.
- 44- Olukosi OA, Beeson LA, Englyst K, Romero LF. Effects of exogenous proteases without or with carbohydrases on nutrient digestibility and disappearance of non-Starch polysaccharides in broiler chickens. *Poult. Sci.* 2015;94: 2662–2669.
- 45- Peek HW, Van der Klis JD, Vermeulenc B, and Landmana WJM. Dietary protease can alleviate negative effects of a coccidiosis infection on production performance in broiler chickens. *Animal feed Science and Technology.* 2009;150:151-159.
- 46- Kalmendal R, Tauson R. Effects of a xylanase and protease, individually or in combination, and an ionophorecoccidiostat on performance, nutrient utilization, and intestinal Morphology in broiler chickens fed a wheat-soybean meal-based diet. *Poultry Science.* 2012;91:1387–1393.
- 47- Stefanello C, Vieira SL, Rios HV, Simões CT, Sorbara JOB. Energy and nutrient utilization of broilers fed soybean meal from two different Brazilian production areas with an exogenous protease. *Anim. Feed Sci. Technol.* 2016;221:267–273.
- 48- Oxenboll KM, Pontoppidan K, Fru-Nji F. Use of a protease in poultry feed offers promising environmental benefits. *Int. J. Poultry Sci.* 2011;10:842–848.
- 49- Leinonen I, Williams AG. Effects of dietary protease on nitrogen emissions from broiler production: a holistic comparison using Life Cycle Assessment. *J Sci Food Agric.* 2015; 95:3041–3046.
- 50- Avila VS, de Gopinger E, Bottcher A, Rigo AP, Krabbe EL. Efeito do uso de protease na dieta de frangos de corte sobre rendimento de carcaça. Seminário técnico científico de aves e suínos; Feira da Indústria Latino-Americana de Aves e Suínos; 2017; Florianópolis, Brasil. Santa Catarina: Gessulli; 2017.
- 51- Cowieson AJ, Roos FF. Toward optimal value creation through the application of exogenous mono-component protease in the diets of non-ruminants. *Anim. Feed Sci. Tech.* 2016;221:331–340
- 52- Cowieson AJ, Bedford MR, Ravindran V. Interactions between xylanase and glucanase in maize-soy-based diets for broilers. *Br. Poult. Sci.* 2010;51:246–257.
- 53- Swenson MJ, Reece WO. *Dukes: Fisiologia dos animais domésticos.* Rio de Janeiro: Guanabara; 1996.p.856.

CAPÍTULO 2. DESEMPENHO E RENDIMENTO DE CARÇA DE FRANGOS DE CORTE ALIMENTADOS COM DIETAS CONTENDO PROTEASE COM VALORIZAÇÃO DA MATRIZ NUTRICIONAL

RESUMO

Este estudo foi conduzido para avaliar os efeitos da suplementação da enzima protease monocomponente (Ronozyme ProAct, elaborada a partir de *Bacillus licheniformis*), no desempenho e no rendimento de carcaça e cortes, em frangos de corte de 1 a 42 dias de idade, alimentados com dietas com a valorização da matriz nutricional da enzima a base de milho e farelo de soja. Foram alojados 1200 pintos de corte em boxes móveis de um galpão industrial de pressão negativa, distribuídos em delineamento inteiramente casualizado, totalizando 5 tratamentos, com 8 repetições e 30 aves por box. Os tratamentos foram: T1- ração controle, T2- uma valorização da matriz nutricional proposta pela enzima mas sem o aditivo, T3- o dobro da valorização proposta em T2 sem enzima, T4- T2 com enzima, T5- T3 com enzima. A inclusão da enzima foi de 0,02%. Foram realizadas as medidas de desempenho com as pesagens dos frangos e da ração no dia do alojamento e em todas as semanas subsequentes até os 42 dias de idade, determinando, peso médio, ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar. Aos 42 dias, 80 aves foram sacrificadas para realizar o rendimento de carcaça e cortes. A análise dos dados foi realizada utilizando-se a análise de variância (ANOVA), e quando estatisticamente diferentes a 10% de probabilidade, foram comparados pelo Teste de Scott Knott. Frangos alimentados com o tratamento de uma valorização e inclusão da protease obtiveram o mesmo peso final e ganho de peso do tratamento controle até os 35 dias de idade. As aves que receberam o tratamento controle apresentaram maior rendimento de carcaça, e no peso dos cortes, não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos com protease. Portanto, recomenda-se a suplementação da enzima protease em dietas valorizadas uma vez até a fase de crescimento de frangos de corte.

Palavras-chave: aves, enzima monocomponente, nutrição, proteína

CHAPTER 2. PERFORMANCE AND CARCASS YIELD OF BROILERS FED DIETS CONTAINING PROTEASE WITH VALUATION OF NUTRITIONAL MATRIX

ABSTRACT

A study was conducted in order to evaluate the effects of supplementation of a monocomponent protease enzyme (Ronozyme ProAct, elaborated from *Bacillus licheniformis*) on performance and carcass yield and cuts in broiler chickens from 1 to 42 days of age fed diets with the valorization of the nutritional matrix of the enzyme based on corn and soybean meal. 1200 broilers were housed in a negative pressure industrial shed, distributed in a completely randomized design, totaling 5 treatments, with 8 replicates and 30 birds per box. The treatments were: T1- control ration, T2- a value of the nutritional matrix proposed by the enzyme but without the additive, T3- twice the value proposed in T2 without enzyme, T4- T2 with enzyme, T5- T3 with enzyme. The inclusion of the enzyme was 0.02%. Performance measurements were performed with broiler and feed weighing on the day of housing and on all subsequent weeks up to 42 days of age, determining, mean weight, weight gain, feed intake and feed conversion. At 42 days, 80 birds sacrificed to perform the carcass yield and cuts. Data analysis performed using analysis of variance (ANOVA), and when statistically different from 10% probability, compared by the Scott Knott test. Chickens fed the one valued with protease and inclusion treatment obtained the same final weight and control weight gain of the control treatment until 35 days of age. The birds that received the control treatment presented higher carcass yield, and in the weight of the cuts, there were no statistical differences between the protease treatments. Therefore, it is recommend supplementing the protease enzyme in diets valued once until the growth stage of broilers.

Key words: poultry, monocomponent enzyme, nutrition, protein

INTRODUÇÃO

Em 2017, o produtor de frangos de corte demandou 16,5 milhões de toneladas de rações¹. Sabe-se que os gastos com alimentação giram em torno de 60 a 75% do custo total de produção e a fim de diminuir estes custos, pesquisadores buscam alternativas para substituição parcial da matéria-prima e inclusão de aditivos que otimizem a utilização dos nutrientes da ração. Estudos sobre o uso de enzimas exógenas nas dietas de frangos de corte estão em execução e muitos produtos comerciais estão disponíveis na indústria de avicultura.

O uso de enzimas exógenas nas dietas de frangos de corte foi iniciado com a fitase, seguido pela utilização de *blends* enzimáticos. *Blends* enzimáticos são produtos que contêm a combinação de várias enzimas monocomponentes e o emprego destes tem sido proposto em dietas à base de milho e farelo de soja, no intuito de melhorar o desempenho de aves². Devido ao fato das enzimas serem muito específicas, os produtos comerciais que contêm apenas uma enzima não são considerados suficientes para produzir máximo benefício, entretanto, não se conhece exatamente o efeito das interações entre enzimas, que pode gerar resultados controversos o uso de complexos enzimáticos³.

De acordo com Marquardt e Bedford⁴, as características desejáveis na produção de enzimas são: atividade altamente específica; que sejam resistentes à inativação por calor, baixo pH e enzimas proteolíticas, ausência de interações com a matriz do alimento para facilitar a determinação quantitativa de enzima na dieta completa; e especificidade em promover efeitos esperados.

As proteases produzidas pelo organismo não são suficientes para otimizar a utilização de proteínas, visto que valores de digestibilidade de proteína bruta e amino ácidos para frangos de corte, demonstram que grandes quantidades de proteína passam pelo trato gastrointestinal sem ser digeridas⁵. Esse fato representa uma oportunidade para a suplementação de protease exógena nas dietas de frangos de corte. Estudos com esse tipo de aditivo tem demonstrado uma melhora no desempenho e rendimento de cortes em frangos de corte⁶. As hipóteses se referem ao aumento do coeficiente de digestibilidade da proteína e energia, a diminuição dos fatores antinutricionais dos ingredientes utilizados nas matérias-primas e a melhora na qualidade intestinal.

O presente trabalho foi conduzido para avaliar os efeitos de uma serina protease monocomponente em dietas valorizadas, no desempenho e no rendimento de cortes comerciais em frangos de corte.

MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi realizado no Aviário Escola da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, Goiânia – Goiás, Brasil. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA, inscrito sob o protocolo nº 003/17.

Manejo experimental e instalações

Foram alojados 1200 pintos machos da linhagem Cobb500®, com um dia de idade e uma média de peso de 42,20g em boxes móveis compostos de tela plástica resistente e canos de PVC, com cama de palha de arroz, montados na área central em um galpão industrial com sete exaustores, sistema de nebulização e entrada de ar com placa evaporativa. A densidade de alojamento em cada boxe foi de 12 aves/m² (30 aves/Box).

Antes da chegada do lote, o galpão e os boxes móveis e demais equipamentos foram lavados e desinfetados e deixados em vazio sanitário por um período de 15 dias. Cada boxe possuía uma linha de bebedouro tipo *nipple* (10 *nipples*/Box) e um comedouro tubular. As aves foram vacinadas no incubatório comercial contra Marek e bronquite infecciosa e aos 15 dias de idade foi ministrada a vacina contra Gumboro na água de bebida. A iluminação artificial foi feita por lâmpadas de led espalhadas no galpão. O aquecimento interno do galpão na fase inicial foi realizado por aquecedor a óleo diesel. O manejo diário incluiu o abastecimento dos comedouros uma vez ao dia e monitoramento da qualidade da água.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com 5 tratamentos e 8 repetições de 30 aves cada, totalizando 1200 aves. Aves foram submetidas a dietas com e sem a adição de protease, com e sem a valorização da matriz nutricional da enzima nas dietas e tratamento controle. A descrição dos tratamentos é observada no Quadro 1

QUADRO 1- Descrição dos tratamentos experimentais

Tratamentos	Descrição
T1	Ração controle
T2	Ração com uma valorização da matriz nutricional proposta pela enzima mas sem o aditivo
T3	Ração com o dobro da valorização proposta em T2 sem enzima
T4	Ração T2 com enzima
T5	Ração T3 com enzima

Dietas experimentais

A protease utilizada neste estudo foi uma enzima comercial produzida por fermentação submergida de *Bacillus licheniformis* contendo genes transcritos de *Nocardiopsis prasina*. A atividade enzimática para esta protease é medida em unidades PROT, com uma unidade definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de p-nitroanilina de 1 μM de substrato (Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pnitroanilina) por minuto a pH 9,0 e 37 ° C.

As dietas experimentais fareladas a base de milho e farelo de soja, suplementos vitamínicos e mineral e produtos de origem animal foram formuladas segundo exigências nutricionais da São Salvador Alimentos SA. As reduções nutricionais dos tratamentos experimentais foram realizadas com a valorização de acordo com a matriz nutricional do produto em uma e duas vezes. As dietas foram calculadas para terem a mesma composição nutricional, considerando a enzima como um ingrediente, e nos tratamentos sem a inclusão da enzima, a mesma foi substituída por um ingrediente inerte para que não ocorresse o desbalanceamento da dieta. Nas dietas com uma valorização, foi considerada a matriz conforme indicada pelo fabricante da enzima (Quadro 2), já na dieta com duas valorizações foi realizada a multiplicação dos valores do Quadro 2 por dois.

Baseado nesses valores, foi adicionada 200 mg/kg (15.000 unidades PROT/kg) de enzima nas rações experimentais.

QUADRO 2- Matriz de valorização da enzima protease

Descrição	Unidade	PROACT INICIAL	PROACT CR	PROACT ABATE
Volume	%	100	100	100
Umidade	%	2	2	2
Matéria Seca	%	98	98	98
Proteína Bruta	%	4405	3890	3124
Arginina Digestível Aves	%	236	191	142
Lisina Digestível Aves	%	192	176	146
Metionina Digestível Aves	%	105	90	75
Metionina + Cistina Digestível Aves	%	273	242	173
Treonina Digestível Aves	%	299	275	197
Triptofano Digestível Aves	%	17	15	8
Isoleucina Digestível Aves	%	164	144	108
Leucina Digestível Aves	%	96	89	67
Valina Digestível Aves	%	196	179	124

Fonte: Ronozyme ProAct (DSM).

TABELA 1- Composição percentual e nutricional da ração experimental para a fase pré inicial de frango de corte

Ingredientes	Controle	1 Val. s/ protease	2 Val. s/protease	1 Val. c/ protease	2 Val. c/ protease
Milho	56,84	59,12	59,95	59,12	59,95
Farelo soja	34,36	32,31	31,77	32,31	31,77
Óleo de soja	0,53	0,33	0,33	0,33	0,33
Farinha de Carne e Ossos	3,20	3,33	3,66	3,33	3,66
Farinha de vísceras	2,80	2,53	2,00	2,53	2,00
Calcario	0,833	0,966	0,966	0,966	0,966
Sal	0,353	0,346	0,353	0,346	0,353
Bicarbonato de sódio	0,158	0,168	0,158	0,168	0,158
DL Met	0,374	0,334	0,282	0,334	0,282
L- Lis HCl	0,158	0,176	0,153	0,176	0,153
Cloreto de Colina	0,058	0,066	0,071	0,066	0,071
L Treonina	0,070	0,037	-	0,037	-
Valina	0,003	-	-	-	-
Fitase	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Prebiótico	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
Bacitracina de Zn	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
Nicarbazina	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
Premix Vitamínico Inicial ¹	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Premix Mineral ²	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06
Protease*	-	-	-	0,02	0,02
Amido	-	0,02	0,04	-	0,02
Total	100	100	100	100	100
Composição Nutricional Calculada					
Energia Metabolizável Aves kcal	2.910	2.910	2.910	2.910	2.910
Proteína Bruta %	23,95	23,11	22,23	23,11	22,23
Arginina Digestível Aves %	1,453	1,416	1,369	1,416	1,369
Lisina Digestível Aves %	1,290	1,251	1,213	1,251	1,213
Metionina Digestível Aves %	0,687	0,686	0,665	0,686	0,665
Metionina + Cistina Digestível %	0,980	0,926	0,871	0,926	0,871
Treonina Digestível Aves %	0,826	0,766	0,706	0,766	0,706
Triptofano Digestível Aves %	0,241	0,237	0,234	0,237	0,234
Cálcio %	0,980	0,980	0,980	0,980	0,980
Fósforo Total %	0,713	0,713	0,713	0,713	0,713
Fósforo Disponível %	0,490	0,490	0,490	0,490	0,490
Balanço Eletrolítico mEq/kg	252	252	252	252	252
Colina ppm	1.800	1.800	1.800	1.800	1.800

¹ Val= 1 valorização 2 Val= 2 valorizações ¹Suplemento vitamínico (por kg do produto): vit A, 20.000.000 UI; vit D3, 5.000.000UI; vit E, 50.000 UI; vit K3, 4.000mg; vit B1, 5.000mg; vit B2, 13.000mg, vit B6, 7.000mg; vit B12, 36.000mcg; ác. Pant. 30.000mg; ác. Nicot. 84.000mg; ác. Fólico, 2.400mg; Biotina 160.000mcg; Antioxidante 166mg; Selênio 600mg.

²Suplemento mineral (kg/produto): Manganês, 150000mg; Zinco, mg; Ferro, 100000mg; Cobre, 16000mg; Iodo, 2000mg.

* contribuição proposta da matriz nutricional da enzima disponíveis no Quadro 2.

TABELA 2- Composição percentual e nutricional da ração experimental para a fase inicial de frango de corte

Ingredientes	Controle	1 Val. s/ protease	2 Val. s/protease	1 Val. c/ protease	2 Val. c/ protease
Milho	60,80	63,60	66,18	63,60	66,18
Farelo soja	29,88	27,48	25,22	27,48	25,22
Óleo de soja	1,40	0,93	0,53	0,93	0,53
Farinha de Carne e Ossos	2,73	2,80	2,80	2,80	2,80
Farinha de vísceras	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
Calcario	0,900	0,900	0,966	0,900	0,966
Sal	0,346	0,346	0,306	0,346	0,306
Bicarbonato de sódio	0,070	0,070	0,143	0,070	0,143
DL Met	0,329	0,293	0,256	0,293	0,256
L- Lis HCl	0,160	0,186	0,208	0,186	0,208
Cloreto de Colina	0,068	0,075	0,081	0,075	0,081
L Treonina	0,075	0,048	0,018	0,048	0,018
Fitase	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Prebiótico	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
Bacitracina de Zn	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
Anticoccidiano	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Premix Vitamínico inicial ¹	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Premix Mineral ²	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Protease*	-	-	-	0,02	0,02
Amido	-	0,02	0,04	-	0,02
Total	100	100	100	100	100

Composição Nutricional Calculada

Energia Metabolizável Aves kcal	3.010	3.010	3.010	3.010	3.010
Proteína Bruta %	22,10	21,21	20,33	21,21	20,33
Arginina Digestível Aves %	1,409	1,361	1,314	1,361	1,314
Lisina Digestível Aves %	1,180	1,141	1,103	1,141	1,103
Metionina Digestível Aves %	0,707	0,686	0,665	0,686	0,665
Metionina + Cistina Digest %	0,980	0,925	0,870	0,925	0,870
Treonina Digestível Aves %	0,767	0,707	0,647	0,707	0,647
Triptofano Digestível Aves %	0,241	0,237	0,234	0,237	0,234
Cálcio %	0,920	0,920	0,920	0,920	0,920
Fósforo Total %	0,663	0,663	0,663	0,663	0,663
Fósforo Disponível %	0,450	0,450	0,450	0,450	0,450
Balanço Eletrolítico mEq/kg	202	202	202	202	202
Colina ppm	1.780	1.780	1.780	1.780	1.780

¹ Val= 1 valorização 2 Val= 2 valorizações ³Suplemento vitamínico (por kg do produto): vit A, 20.000.000 UI; vit D3, 5.000.000UI; vit E, 50.000 UI; vit K3, 4.000mg; vit B1, 5.000mg; vit B2, 13.000mg, vit B6, 7.000mg; vit B12, 36.000mcg; ác. Pant. 30.000mg; ác. Nicot. 84.000mg; ác. Fólico, 2.400mg; Biotina 160.000mcg; Antioxidante 166mg; Selênio 600mg.

²Suplemento mineral (por kg do produto): Manganês, 150000mg; Zinco, mg; Ferro, 100000mg; Cobre, 16000mg; Iodo, 2000mg.

* contribuição proposta da matriz nutricional da enzima disponíveis no Quadro 2.

TABELA 3- Composição percentual e nutricional da ração experimental para a fase de crescimento de frango de corte

Ingredientes	Controle	1 Val. s/ protease	2 Val. s/protease	1 Val. c/ protease	2 Val. c/ protease
Milho	68,72	72,11	72,87	72,11	72,87
Farelo soja	20,73	16,97	16,38	16,97	16,38
Óleo de Soja	1,66	1,06	1,00	1,06	1,00
Farinha de Carne e Ossos	2,13	2,06	2,06	2,06	2,06
Farinha de vísceras	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
Farinha de Penas	1,53	2,53	2,53	2,53	2,53
Calcario	0,900	0,933	0,933	0,933	0,933
Sal	0,266	0,266	0,266	0,266	0,266
Bicarbonato de sódio	0,140	0,130	0,130	0,130	0,130
DL Met	0,270	0,228	0,184	0,228	0,184
L- Lis HCl	0,247	0,304	0,278	0,304	0,278
Cloreto de Colina	0,068	0,079	0,08	0,079	0,080
L Treonina	0,086	0,059	0,011	0,059	0,011
Fitase	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Prebiótico	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Bacitracina de Zn	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
Salinomicina	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Premix vitamínico Cresc. ¹	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Premix Mineral ²	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Protease*	-	-	-	0,02	0,02
Amido	-	0,02	0,04	-	0,02
Total	100	100	100	100	100
Composição Nutricional Calculada					
Energia Metabolizável kcal/kg	3.170	3.170	3.170	3.170	3.170
Proteína Bruta %	19,45	18,67	17,89	18,67	17,89
Arginina Digestív Aves %	1,128	1,089	1,051	1,089	1,051
Lisina Digestível Aves %	1,030	0,994	0,959	0,994	0,959
Metionina Digestí Aves %	0,518	0,500	0,482	0,500	0,482
Metionina + Cist Digest %	0,795	0,746	0,698	0,746	0,698
Treonina Digestív Aves %	0,680	0,625	0,570	0,625	0,570
TriptofanoDigestAves %	0,175	0,172	0,169	0,172	0,169
Cálcio %	0,840	0,840	0,840	0,840	0,840
Fósforo Total %	0,604	0,604	0,604	0,604	0,604
Fósforo Disponível %	0,410	0,410	0,410	0,410	0,410
Balanço Eletrolítico mEq/kg	177	177	177	177	177
Colina ppm	1.600	1.600	1.600	1.600	1.600

1 Val= 1 valorização 2 Val= 2 valorizações ¹Suplemento vitamínico (por kg do produto): vit A, 16.000.000UI; vit D3, 3.800.000UI; vit E, 40.000 UI; vit K3, 3.600mg; vit B1, 3.600mg; vit B2, 11.000mg, vit B6, 5.200mg; vit B12, 30.000mcg; ác. Pant. 26.000mg; ác. Nicot. 70.000mg; ác. Fólico, 1.800mg; Biotina 100.000mcg; Antioxidante 166mg; Selênio 600mg.

²Suplemento mineral (por kg do produto): Manganês, 150000mg; Zinco, mg; Ferro, 100000mg; Cobre, 16000mg; Iodo, 2000mg.

* contribuição proposta da matriz nutricional da enzima disponíveis no Quadro 2.

TABELA 4- Composição percentual e nutricional da ração experimental para a fase de abate de frango de corte

Ingredientes	Controle	1 Val. s/ protease	2 Val. s/protease	1 Val. c/ protease	2 Val. c/ protease
Milho	70,36	71,87	72,52	71,87	72,52
Farelo soja	19,12	16,69	16,17	16,69	16,17
Óleo de Soja	2,33	2,00	1,93	2,00	1,93
Farinha de Carne e Ossos	1,46	1,26	1,26	1,26	1,26
Farinha de vísceras	3,00	3,53	3,53	3,53	3,53
Farinha de Penas	1,60	2,53	2,53	2,53	2,53
Calcario	0,900	0,966	0,966	0,966	0,966
Sal	0,260	0,273	0,273	0,273	0,273
Bicarbonato de sódio	0,150	0,130	0,130	0,130	0,130
DL Met	0,233	0,182	0,143	0,182	0,143
L- Lis HCl	0,208	0,216	0,192	0,216	0,192
Cloreto de Colina	0,052	0,055	0,056	0,055	0,056
L Treonina	0,070	0,024	-	0,024	-
Fitase	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Prebiótico	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Bacitracina de Zn	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
Salinomicina	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Premix Vitamínico Abate ¹	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Premix Mineral ²	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Protease*	-	-	-	0,02	0,02
Amido	-	0,02	0,04	-	0,02
Total	100	100	100	100	100
Composição Nutricional Calculada					
Energia Metabolizável Ave kcal	3.230,00	3.230,00	3.230,00	3.230,00	3.230,00
Proteína Bruta %	18,50	17,87	17,25	17,87	17,25
Arginina Digest Aves %	1,040	1,011	0,983	1,011	0,983
Lisina Digestível Aves %	0,950	0,920	0,891	0,920	0,891
Metionina Digest Aves %	0,512	0,497	0,482	0,497	0,482
Metionina + CistDigest %	0,742	0,707	0,672	0,707	0,672
Treonina Digest Aves %	0,636	0,596	0,557	0,596	0,557
TriptofanoDigest Aves %	0,165	0,163	0,161	0,163	0,161
Cálcio %	0,770	0,770	0,770	0,770	0,770
Fósforo Total %	0,560	0,560	0,560	0,560	0,560
Fósforo Disponível %	0,370	0,370	0,370	0,370	0,370
Balanço Eletrolítico mEq/kg	179	179	179	179	179
Colina ppm	1.450	1.450	1.450	1.450	1.450

1 Val= 1 valorização 2 Val= 2 valorizações ¹Suplemento vitamínico (por kg do produto): vit A, 8.000.000UI; vit D3, 1.600.000UI; vit E, 16.000 UI; vit K3, 2.000mg; vit B1, 2.000mg; vit B2, 6.000mg, vit B6, 3.000mg; vit B12, 14.000mcg; ác. Pant. 18.000mg; ác. Nicot. 50.000mg; ác. Fólico, 900mg; Biotina 40.000mcg; Antioxidante 166mg; Selênio 400mg.

²Suplemento mineral (por kg do produto): Manganês, 150000mg; Zinco, mg; Ferro, 100000mg; Cobre, 16000mg; Iodo, 2000mg.

* contribuição proposta da matriz nutricional da enzima disponíveis no Quadro 2.

Medidas de desempenho

No decorrer do experimento, foram realizadas pesagens no 1, 7, 14, 21, 35 e 42 dias de idade dos frangos, além da pesagem da ração fornecida e sobra e registro da mortalidade diária com o peso dos frangos mortos.

As variáveis de desempenho zootécnicas avaliadas no experimento foram:

- Peso médio (kg), calculado pelo peso total dos frangos da parcela, dividido pelo número de frangos;
- Ganho de peso (kg), que é a diferença entre o peso médio inicial e o peso médio final dos frangos obtido pelas pesagens, durante o experimento e no período total;
- Consumo de ração (kg), dado pela diferença entre os valores de ração oferecida no início e as sobras ao final, sendo contabilizado o número de frangos mortos como critério para correção dos valores do consumo e
- Conversão alimentar (g/g), resultado da relação entre ganho de peso e consumo de ração, corrigido pelo peso dos frangos mortos em cada período experimental.

Rendimento de carcaça e cortes

Aos 42 dias de idade, um total de 80 aves, duas aves por repetição representantes do peso médio da unidade foram selecionadas e abatidas, após jejum de 8 horas. As aves foram abatidas através de corte na artéria jugular após insensibilização por corrente elétrica e, em seguida, procedida à sangria, escaldagem, depena e evisceração. As carcaças quentes foram pesadas e, em seguida, realizados os cortes para se avaliar o rendimento da carcaça, das partes (peito, coxa+sobrecoxa, asa e gordura abdominal) e dos órgãos internos (fígado, moela e coração).

O rendimento de carcaça foi calculado em relação ao peso vivo, sendo:

$$\%RC = (\text{peso carcaça} \times 100 / \text{peso vivo})$$

O rendimento das partes da carcaça, peito, coxa e sobrecoxa, asa e gordura abdominal em função do peso da carcaça:

$$\%RP = (\text{peso da parte} \times 100 / \text{peso carcaça}).$$

As medidas da carcaça foram tomadas sem cabeça e pés.

Foi realizada também a pesagem em balança de precisão (0,001g) do coração, fígado e moela das aves.

Análise estatística dos dados

A análise dos dados foi realizada utilizando-se a análise de variância (ANOVA) e os dados, quando estatisticamente diferentes a 10% de probabilidade, foram comparados pelo Teste de Scott Knott. Para auxílio nas análises estatísticas utilizou-se o *software* R⁷ e pacote *easyanova*⁸.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 5, são apresentados os resultados de desempenho de 1 a 7 dias de idade. Houve diferenças ($p \leq 0,10$) para as variáveis de peso médio final e ganho de peso avaliadas. Observa-se que os tratamentos com uma valorização e o controle obtiveram diferença estatística em relação aos tratamentos com duas valorizações com ou sem a inclusão da protease.

Nesse caso, sugere-se que a diferença estatística se deu pela redução nutricional, e, que a inclusão da enzima não influenciou no desempenho. Esses dados corroboram com Kamendal e Tauson⁹ que avaliaram dietas a base de milho e farelo de soja suplementadas com protease e xilanase para frangos de corte, e, não encontraram diferenças estatísticas de 1 a 7 dias de idade no ganho de peso e consumo de ração. Os resultados também são confirmados em Cowieson et al.¹⁰, que não encontraram diferenças significativas para ganho de peso e consumo de ração para frangos de corte alimentados com dietas a base de milho, farelo de soja e farelo de canola suplementadas com protease até sete dias de idade.

TABELA 5- Médias de peso inicial, peso médio final, ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar no período de 1 aos 7 dias de idade

Tratamento	PMF(g)	GP(g)	CR(g)	CA
Controle	174,4a	132,1a	145,2	1,08
1 Valorização s/Protease	171,3a	129,2a	146,0	1,10
2 Valorizações s/Protease	167,2b	124,9b	137,6	1,10
1 Valorização c/Protease	171,7a	129,5a	140,8	1,08
2 Valorizações c/Protease	168,7b	126,6b	146,6	1,12
Valor de p	0,08	0,07	0,46	0,38
CV (%)	3,06	4,03	8,02	4,12

* Médias seguidas de letras distintas, dentro de cada coluna, diferem estatisticamente pelo Teste de Scott Knott * ($P < 0,10$).
 Legenda: PI (peso inicial), PMF (peso médio final), GP (ganho de peso), CR (consumo de ração) e CA (conversão alimentar= consumo de ração/ Ganho de peso)

Analisando os resultados de desempenho de 1 a 21 dias de idade (Tabela 6), observam-se diferenças ($p \leq 0,10$) para peso médio final e ganho de peso e para as variáveis de

consumo de ração e conversão alimentar não se verificou efeito ($p>0,10$). As aves que consumiram a dieta com uma valorização com a suplementação de protease apresentaram valores semelhantes à dieta controle. Isso demonstra que a protease foi eficaz na formulação indicada pelo fabricante (uma valorização + 200 ppm de protease), já que houve redução nos níveis de proteína bruta e aminoácidos, indicando a possível diminuição do custo de produção sem alterar o desempenho. O tratamento com duas valorizações e inclusão da protease obteve resultados superiores de peso médio final e ganho de peso das aves em relação ao tratamento de duas valorizações sem a inclusão da enzima, isso demonstra que a enzima foi eficaz nesse tratamento, mas com tal redução de proteína bruta, não conseguiu se igualar aos tratamentos controle e uma valorização.

TABELA 6- Médias de peso inicial, peso médio final, ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar no período de 1 a 21 dias de idade

Tratamento	PMF(g)	GP(g)	CR(g)	CA
Controle	1015,5a	973,2a	1288,2	1,40
1 Valorização s/Protease	987,1b	945,0b	1272,8	1,41
2 Valorizações s/Protease	962,2c	919,9c	1265,0	1,44
1 Valorização c/Protease	1002,5a	960,3a	1294,0	1,42
2 Valorizações c/Protease	986,6b	944,6b	1262,6	1,41
Valor de p	0,00	0,00	0,71	0,38
CV (%)	1,90	1,99	4,19	3,00

* Médias seguidas de letras distintas, dentro de cada coluna, diferem estatisticamente pelo Teste de Scott Knott * ($P<0,10$).
 Legenda: PI (peso inicial), PMF (peso médio final), GP (ganho de peso), CR (consumo de ração) e CA (conversão alimentar= consumo de ração/ Ganho de peso)

Diversos estudos indicam resultados satisfatórios com a utilização da protease na fase inicial para frangos de corte¹²⁻¹⁵. Wang et al.¹⁶, exploraram os efeitos interativos da fonte de proteína (farelo de soja ou farinha de semente de algodão) e protease exógena sobre o desempenho de frangos de corte. Os efeitos da protease foram positivos, embora maiores na fase inicial (1 a 21 dias) do que na fase final, especialmente para o ganho de peso e consumo de ração. Os dados também estão de acordo com Cowieson et al.¹⁰ que encontraram diferenças estatísticas para ganho de peso de frangos de corte alimentados com dietas à base de milho e farelo de soja com a suplementação de protease tanto no período de 14 a 21 dias quanto de 7 a 21 dias. Angel et al.¹⁷ avaliaram a sensibilidade à dose da mesma protease utilizada nesse estudo em pintinhos alimentados com uma dieta à base de milho e farelo de soja que havia sido reduzida em proteína bruta e aminoácidos digestíveis em cerca de 10%. A adição da protease mono-componente aumentou o ganho de peso de 661g para 708g de uma maneira dose-dependente, estatisticamente semelhante ao controle. O ganho de peso ótimo e as respostas de

conversão alimentar foram melhores na inclusão de 200 g/t do produto, que é semelhante a dose utilizada no presente estudo.

Aos 35 dias de idade (Tabela 7), observaram-se diferenças ($p \leq 0,10$) para as variáveis de peso médio final, ganho de peso e conversão alimentar, e, não houve diferença ($p > 0,10$) para consumo de ração. Na fase de crescimento, assim como na fase inicial, o tratamento com uma valorização e adição da enzima obteve o mesmo desempenho que o controle.

Esses resultados também foram encontrados por Kamendal and Tauson⁹, que observaram melhora na conversão alimentar em dietas contendo xilanase, protease e na interação entre as duas em relação a um tratamento controle aos 34 dias de idade em frangos de corte e por Fru-Nij et al.¹¹, avaliando o desempenho de frangos de corte machos e fêmeas, com dietas a base milho e farelo de soja, sem redução nutricional, suplementadas à mesma protease exógena deste estudo, obtiveram aumento do ganho de peso e melhora da conversão alimentar nos machos no período de 1 a 35 dias de idade das aves.

TABELA 7- Médias de peso inicial, peso médio final, ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar no período de 1 a 35 dias de idade

Tratamento	PMF(g)	GP(g)	CR(g)	CA
Controle	2407,2a	2364,8a	3448,9	1,57b
1 Valorização s/Protease	2321,1b	2279,0b	3435,7	1,59b
2 Valorizações s/Protease	2314,2b	2271,9b	3399,7	1,61a
1 Valorização c/Protease	2412,2a	2370,6a	3529,1	1,57b
2 Valorizações c/Protease	2312,3b	2270,2b	3429,9	1,61a
Valor de p	0,00	0,00	0,19	0,01
CV (%)	2,71	2,76	2,87	1,82

* Médias seguidas de letras distintas, dentro de cada coluna, diferem estatisticamente pelo Teste de Scott Knott * ($P < 0,10$).
 Legenda: PI (peso inicial), PMF (peso médio final), GP (ganho de peso), CR (consumo de ração) e CA (conversão alimentar = consumo de ração / Ganho de peso).

Considerando todo o período experimental, 1 a 42 dias (Tabela 8) foram observadas diferenças ($p \leq 0,10$) para as variáveis de peso médio final e ganho de peso avaliadas. Os resultados nessa fase demonstram que a diferença estatística encontrada ocorreu pela valorização, e não pela inclusão da enzima. Os efeitos mais pronunciados nas fases até 21 e 35 dias, comprovam o fato que a inclusão de enzimas exógenas em animais jovens promove melhora no aproveitamento de nutrientes, pois esses animais estão com produção de enzimas endógenas ainda em quantidade insuficiente¹².

TABELA 8- Médias de peso inicial, peso médio final, ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar no período de 1 a 42 dias de idade

Tratamento	PMF(g)	GPM(g)	CRM(g)	CA
Controle	3219,5a	3177,2a	5038,6	1,67b
1 Valorização s/Protease	3117,5a	3135,4a	5064,5	1,67b
2 Valorizações s/Protease	3149,2b	3106,9b	5069,5	1,70b
1 Valorização c/Protease	3193,0a	3150,8a	5160,3	1,68b
2 Valorizações c/Protease	3095,1b	3052,9b	5052,4	1,73a
Valor de p	0,07	0,07	0,80	0,01
CV (%)	2,63	2,67	4,19	2,00

* Médias seguidas de letras distintas, dentro de cada coluna, diferem estatisticamente pelo Teste de Scott Knott * ($P < 0,10$).

Legenda: PI (peso inicial), PMF (peso médio final), GP (ganho de peso), CR (consumo de ração) e CA (conversão alimentar= consumo de ração/ Ganho de peso).

Ao avaliar os resultados do rendimento de carcaça (Tabela 9) houve diferenças estatísticas entre os tratamentos. As aves que receberam o tratamento controle apresentaram maior rendimento de carcaça ($p \leq 0,10$) em comparação aos demais tratamentos, essa resposta é possível pois a dieta controle apresentava o nível mais alto de proteína bruta, consequentemente, a inclusão da enzima protease não mostrou respostas. No peso dos órgãos (Tabela 10), não observamos diferenças estatísticas ($p > 0,10$). Os resultados deste estudo concordam com diversos estudos¹⁸⁻²¹ que não constataram diferença no rendimento de carcaça e cortes em experimentos executados com aves que receberam tratamentos com inclusão de protease. Da mesma forma Freitas et al.¹³, não encontraram diferenças estatísticas para as variáveis de rendimento de carcaça, gordura abdominal, peito, coxa e sobrecoxa em frangos alimentados com diferentes doses de protease.

TABELA 9- Rendimento de Carcaça e Cortes comerciais em relação ao peso da carcaça de frangos alimentados com diferentes valorizações e inclusão de protease aos 42 dias de idade

Tratamento	Carc (%)	Peito (%)	Cx+Sb (%)	Asa (%)	G.abd (%)
Controle	72,9a	30,8	33,9	12,1	1,9
1 Valorização s/Protease	72,0b	30,3	34,9	11,7	2,2
2 Valorizações s/Protease	72,0b	29,5	34,9	12,3	2,0
1 Valorização c/Protease	71,4b	29,1	35,2	11,8	2,3
2 Valorizações c/Protease	72,5b	30,0	34,9	11,0	2,4
Valor de p	0,07	0,13	0,29	0,18	0,19
CV(%)	1,82	5,77	4,34	5,22	24,58

Médias seguidas de letras distintas, dentro de cada coluna, diferem estatisticamente pelo Teste de Scott Knott * ($P < 0,10$).

Legenda: Carc (rendimento de carcaça sem cabeça, pés e pescoço), C+Sb (coxa e sobrecoxa) e G.abd (gordura abdominal).

TABELA 10- Peso de órgãos de frangos alimentados com diferentes valorizações e inclusão de protease aos 42 dias de idade

Tratamento	Fígado (g)	Moela (g)	Coração (g)
Controle	54,9	37,7	14,1
1 Valorização s/Protease	55,6	42,1	14,9
2 Valorizações s/Protease	53,4	38,8	14,9
1 Valorização c/Protease	55,4	39,7	14,2
2 Valorizações c/Protease	52,3	40,1	13,2
Valor de p	0,8767	0,274	0,2209
CV (%)	15,32	12,46	13,78

Médias seguidas de letras distintas, dentro de cada coluna, diferem estatisticamente pelo Teste de Scott Knott * ($P < 0,10$).

CONCLUSÃO

O peso médio final e ganho de peso das aves foi semelhante ao controle, quando as aves foram submetidas ao tratamento de uma valorização da matriz nutricional e inclusão de protease até os 35 dias de idade. A inclusão da enzima protease não melhora o rendimento de carcaça e cortes.

REFERÊNCIAS

- 1- Sindicato Nacional da Indústria de Alimentação Animal. Boletim informativo-Dezembro/2017.[acesso 07 Fev 2018]. Disponível em: <http://sindiracoes.org.br/>
- 2- Brum PAR, Ávila VS, Lima GJMM, Coldebella A, Scheuermann G, Usinguer F, Toigo GC. Efeito da utilização de alfa-amilase em dietas a base de milho e farelo de soja na digestibilidade da energia das rações e no desempenho de frangos de corte. Concórdia: Embrapa – CNPSA, 2006;3.
- 3- Albino L, Buzen S, Rostagno HS. Ingredientes promotores de desempenho para frangos de corte. Seminário de Aves e Suínos; 2007; Belo Horizonte, Brasil. Minas Gerais: AVESUI; 2007. p.73-90.
- 4- Marquardt RR, Bedford MR. Future horizons. In: Bedford MR, Partridge GG. Enzymes in farm animal nutrition. Oxford: CAB Publishing; 2001. p.389- 398.
- 5- Lemme A, Ravindran V, Bryden WL. Ileal digestibility of amino acids in feed ingredients for broilers. World's Poultry Science Journal, Ithaca. 2004;60:423-437.
- 6- Wang JJ, Garlich JD, Shih JCH. Beneficial effects of Versazyme, a keratinase feed additive, on body weight, feed conversion, and breast yield of broiler chickens. J. Appl. Poult. Res. 2006;15:544–550.

- 7- R Core Team R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria; 2013. [acesso 5 jun 2017]. Disponível em: <http://www.R-project.org/>.
- 8- Arnhold E. Package in the R environment for analysis of variance and complementary analyses. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 2013;50(6):488-492.
- 9- Kalmendal R, Tauson R. Effects of a xylanase and protease, individually or in combination, and an ionophore coccidiostat on performance, nutrient utilization, and intestinal Morphology in broiler chickens fed a wheat-soybean meal-based diet. *Poultry Science*. 2012;91:1387–1393.
- 10- Cowieson AJ, Lu H, Ajuwon K, Knap I, Adeola O. Interactive effects of dietary protein source and exogenous protease on growth performance, immune competence and jejunal health of broiler chickens. *Anim. Prod. Sci*. 2016 [citado 4 fev 2018]. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1071/AN15523>
- 11- Fru-Nji F, Kluentner AM, Fischer M, Pontoppidan K. A feed serine protease improves broiler Performance and energy digestibility. *The Journal of Poultry Science*. 2011;48(10):239–246.
- 12- Sakomura NK, Silva JHV, Costa FGP, Fernandes JBK, Hauschild L. *Nutrição de Não Ruminantes*. Jaboticabal: Funep, 2014. p.678
- 13- Freitas DM, Vieira SL, Angel CR, Favero A, Maiorka A. Performance and nutrient utilization of broilers fed diets Supplemented with a novel monocomponent protease. *Journal Applied Poultry Research*. 2011;20:347–352.
- 14- Odetallah NH, Wang JJ, Garlich JD, Shih JC. Keratinase in starter diets improves growth of broiler chicks. *Poult. Sci*. 2003;82:664–670.
- 15- Barekatain MR, Antipatis C, Choct M, Iji P.A. Interaction between protease and xylanase in broiler chicken diets containing sorghum distillers dried grains with solubles. *Anim. Feed Sci. Technol*. 2013;182:71–81.
- 16- Wang H, Guo Y, Shih JCH. Effects of dietary supplementation of keratinase on growth performance, nitrogen retention and intestinal morphology of broiler chickens fed diets with soybean and cottonseed meals. *Anim. Feed Sci. Technol*. 2008;140:376–384.
- 17- Angel CR, Saylor W, Vieira SL, Ward N. Effects of a monocomponent protease on performance and protein utilization in 7- to 22- day-old broiler chickens. *Poultry Science*. 2011;90:2281–2286.
- 18- Zanella IN, Sakomura K, Silverside FG, Figueirido A, Pack M. Effect of enzyme supplementation of broiler diets based on corn and soybeans. *J. Poult. Sci*. 1999;78:561–568.
- 19- Souza RM, Bertechini AG, Souz RV, Rodrigues PB, Carvalho JCC, Brito JAG. Efeito da suplementação enzimática e da forma física da ração sobre o desempenho e as características de carcaça de frangos de corte. *Revista Ciência e Agrotecnologia*, 2008;32(2):584-590.

- 20- Kamel NF, Naela, Ragaa M, El-Banna RA, Mohamed FF. Effects of a Monocomponent Protease on Performance Parameters and Protein Digestibility in Broiler Chickens. *Agriculture and Agricultural Science*. 2015;6:216 – 225.
- 21- Avila VS, de Gopinger E, Bottcher A, Rigo AP, Krabbe EL. Efeito do uso de protease na dieta de frangos de corte sobre rendimento de carcaça. Seminário técnico científico de aves e suínos; Feira da Indústria Latino-Americana de Aves e Suínos; 2017; Florianópolis, Brasil. Santa Catarina: Gessulli; 2017.

CAPÍTULO 3. HISTOMORFOMETRIA INTESTINAL E METABOLIZABILIDADE DE NUTRIENTES DE FRANGOS DE CORTE ALIMENTADOS COM DIETAS CONTENDO PROTEASE E COM VALORIZAÇÃO DA MATRIZ NUTRICIONAL

RESUMO

Este estudo foi conduzido com o objetivo de avaliar efeitos da suplementação da enzima protease monocomponente (Ronozyme ProAct, elaborada a partir de *Bacillus licheniformis*), na determinação dos coeficientes de metabolizabilidade e histomorfometria intestinal em frangos de corte de 1 a 21 dias de idade, alimentados com dietas valorizadas a base de milho e farelo de soja. Foram alojados 300 pintos de 1 dia de idade em gaiolas de aço galvanizado distribuídos em delineamento inteiramente casualizado, submetidos à 5 tratamentos e 6 repetições de 10 aves cada. Os tratamentos foram T1- ração controle, T2- uma valorização da matriz nutricional proposta pela enzima mas sem o aditivo, T3- o dobro da valorização proposta em T2 sem enzima, T4- T2 com enzima, T5- T3 com enzima. A inclusão da enzima foi de 0,02%. Para a metabolizabilidade dos nutrientes, foi realizada a coleta total de excretas de 17 a 21 dias, sendo determinados o balanço de nitrogênio, coeficiente de metabolizabilidade da matéria seca e do nitrogênio e retenção de nitrogênio. Para análise do desenvolvimento intestinal, 60 aves foram eutanasiadas, ao sétimo e 21 dias de idade. Foram colhidos os segmentos do duodeno, jejuno e íleo para confecção de lâminas histológicas, que posteriormente foram fotografadas e medidas. A análise dos dados foi realizada utilizando-se a análise de variância (ANOVA), e quando estatisticamente diferentes a 5% de probabilidade, foram comparados pelo Teste de Scott Knott. Também foi realizada análise multivariada de componentes principais, e, estimadas correlações de Pearson entre as variáveis de metabolizabilidade dos nutrientes e histomorfometria intestinal aos 7 e 21 dias. As dietas que continham protease apresentaram maior coeficiente de metabolizabilidade da matéria seca (CMMS) e coeficiente de metabolizabilidade do nitrogênio (CMN), demonstrando que a suplementação da enzima foi eficaz. Houve maior altura de vilo e relação vilo:cripta do íleo em frangos alimentados com dietas suplementadas com protease aos 7 dias de idade, entretanto, aos 21 dias a inclusão da protease não foi superior ao tratamento controle. Foi observado forte correlação positiva e significativa entre as variáveis de metabolizabilidade e histomorfometria intestinal. A inclusão da protease na dieta melhorou a metabolizabilidade dos nutrientes na fase inicial e estimulou o desenvolvimento das vilosidades intestinais na fase pré- inicial.

Palavras-chave: digestibilidade, enzima exógena, histologia

CHAPTER 3. INTESTINAL HISTOMORPHOMETRY AND NUTRIENTS METABOLIZABILITY FOR BROILER DIETS WITH PROTEASE AND VALUATION OF NUTRITIONAL MATRIX

ABSTRACT

A study was conducted with the objective to evaluate effects of supplementation of a monocomponent protease enzyme (Ronozyme ProAct, elaborated from *Bacillus licheniformis*), in the determination of metabolizable coefficients and intestinal histomorphometry in broilers from 1 to 21 days of age fed with diets based on corn and soybean meal. A total of 300 chicks at 1 days old were housed in galvanized steel cages distributed in a completely randomized design, submitted to 5 treatments and 6 replicates of 10 birds each. The treatments were: T1- control ration, T2- a value of the nutritional matrix proposed by the enzyme but without the additive, T3- twice the value proposed in T2 without enzyme, T4- T2 with enzyme, T5- T3 with enzyme. The inclusion of the enzyme was 0.02%. To determine the metabolizability of nutrients, total excreta were collect from 17 to 21 days, and the nitrogen balance, dry matter and nitrogen metabolizable coefficient and nitrogen retention were determined. For analysis of intestinal development, 60 birds were sacrifice at seventh and 21 days of age. Segments of the duodenum, jejunum and ileum were collect for the preparation of histological slides, which were subsequently photograph and measure. The analysis of the data was performed using the analysis of variance (ANOVA), and when statistically different than 5% probability, were compared by the Scott Knott test. Multivariate analysis of major components was also perform, and Pearson correlations estimated between nutrient metabolizable variables and intestinal histomorphometry at 7 and 21 days. Diets with protease showed higher dry matter metabolizable coefficient and nitrogen metabolizable coefficient , demonstrating that enzyme supplementation was effective. There was higher villus height and villus ratio: ileus crypt in broilers fed diets supplemented with protease at 7 days of age, however, at 21 days protease inclusion was not superior to the control treatment. A strong positive and significant correlation was observed between metabolizable and intestinal histomorphometry variables. The inclusion of protease in the diet improved the metabolizability of the nutrients in the initial phase and stimulated the development of the intestinal villi in the pre-initial phase.

Key words: digestibility, exogenous enzyme, histology

INTRODUÇÃO

Os ingredientes alimentares têm aumentado o custo nos últimos anos, principalmente dos alimentos proteicos, que possuem alto efeito no custo total de produção dos frangos de corte. As preocupações do público com o impacto ambiental da agricultura e da produção animal também levaram a regulamentos que exigem reduções nas emissões sólidas e gasosas geradas¹. Todos esses fatores sugerem uma mudança nas formulações das rações das aves, com a busca de alternativas que visam melhorar o aproveitamento dos nutrientes da dieta.

A utilização das enzimas exógenas na nutrição de monogástricos obteve grandes avanços nas últimas décadas, decorrentes principalmente do aumento do número de empresas e produtos lançados no mercado, além do elevado número de pesquisas realizadas na área esclarecendo os benefícios da utilização das enzimas na fisiologia da digestão, na redução de problemas digestivos e na redução de efeitos provocados pelos fatores antinutricionais presentes em alguns tipos de alimentos².

As proteases exógenas são enzimas que degradam proteína, e podem ser produzidas por micro-organismos ou plantas. Uma protease eficaz pode não só reduzir os custos de produção para o produtor, aumentando a eficiência da utilização dos alimentos pelos animais, mas também reduzirá o teor total de nitrogênio na excreta, e, assim, atenderá à demanda social por uma diminuição da excreção de nitrogênio³.

Vários modos de ação potenciais foram sugeridos para explicar os efeitos benéficos das proteases nas dietas das aves. As proteases podem aumentar a produção de peptidases endógenas, reduzindo o requerimento de aminoácidos e energia ou melhorando a digestibilidade das proteínas e energia. Adicionalmente, podem hidrolisar anti-nutrientes baseados em proteínas, tais como lecitinas ou inibidores da tripsina, melhorando a eficiência com que a ave utiliza aminoácidos⁴. Há uma falta considerável de conhecimento sobre o modo de ação das proteases exógenas, por isso recentemente, há pesquisas sobre a aplicabilidade da protease para efeitos chamados "extra-proteináceos", fatores que podem determinar respostas para melhora da digestibilidade e desempenho dos animais. Há evidência de que as proteases alterem de forma benéfica a saúde intestinal através de mudanças na integridade mucosa intestinal e transporte de aminoácidos⁵.

Devido a esses fatores, objetivou-se com este trabalho avaliar os efeitos de uma serina protease monocomponente, em dietas valorizadas, na metabolizabilidade dos nutrientes e na histomorfometria intestinal e a correlação entre as duas variáveis, de frangos de corte até 21 dias de idade.

MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi realizado no Aviário Experimental da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO, Brasil. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA, inscrito sob o protocolo nº 003/17.

Manejo experimental e instalações

Foram alojados 300 pintos machos da linhagem Cobb500, com um dia de idade em baterias de aço galvanizado de 0,80 x 0,75m, com cinco andares, um bebedouro e um comedouro linear por divisão e uma lâmpada incandescente de 60 w para aquecimento. Cada divisão das baterias foi equipada com bandejas metálicas e colocadas embaixo das gaiolas, para a retirada das excretas. Foram utilizadas 30 unidades experimentais, sendo 10 aves por unidade experimental.

Antes da chegada do lote, o galpão e as gaiolas junto aos equipamentos foram lavados e desinfetados e deixados em vazio sanitário por um período de 15 dias.

O manejo até 21 dias incluiu a limpeza diária dos bebedouros, com troca de água, e abastecimento dos comedouros duas vezes ao dia, além da verificação da temperatura e do manejo de cortinas. O aquecimento interno do galpão foi monitorado por meio de verificação de temperatura e umidade relativa do ar, de manejo das cortinas de acordo com a temperatura do ambiente. A iluminação foi constante por meio de lâmpadas incandescentes em cada unidade experimental.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com 5 tratamentos e 6 repetições de 10 aves cada, totalizando 300 aves. Aves foram submetidas a dietas com e sem a adição de protease, com e sem a valorização da matriz nutricional da enzima nas dietas e tratamento controle. A descrição dos tratamentos é observada no Quadro 1

QUADRO 1- Descrição dos tratamentos experimentais

Tratamentos	Descrição
T1	Ração controle
T2	Ração com uma valorização da matriz nutricional proposta pela enzima mas sem o aditivo
T3	Ração com o dobro da valorização proposta em T2 sem enzima
T4	Ração T2 com enzima
T5	Ração T3 com enzima

Dietas experimentais

A protease utilizada neste estudo foi uma enzima comercial produzida por fermentação submersa de *Bacillus licheniformis* contendo genes transcritos de *Nocardiaopsis prasina*. A atividade enzimática para esta protease é medida em unidades PROT, com 1 unidade definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de p-nitroanilina de 1 μM de substrato (Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pnitroanilina) por minuto a pH 9,0 e 37 ° C.

As dietas experimentais a base de milho e farelo de soja, suplementos vitamínicos e mineral e produtos de origem animal foram formuladas segundo exigências nutricionais da São Salvador Alimentos SA. As reduções nutricionais dos tratamentos experimentais foram realizadas com a valorização de acordo com a matriz nutricional do produto em uma e duas vezes. As dietas foram calculadas para terem a mesma composição nutricional, considerando a enzima como um ingrediente, e nos tratamentos sem a inclusão da enzima, a mesma foi substituída por um ingrediente inerte para que não ocorresse o desbalanceamento da dieta. Nas dietas com uma valorização, foi considerada a matriz conforme indicada pelo fabricante do produto (Quadro 2), já na dieta com duas valorizações foi realizada a multiplicação dos valores do Quadro 2 por dois.

Baseado nesses valores, foi adicionada 200 mg/kg (15,000 unidades PROT/kg) de enzima nas rações experimentais.

QUADRO 3- Matriz de valorização da enzima protease

Descrição	Unidade	PROACT INICIAL	PROACT CR	PROACT ABATE
Volume	%	100	100	100
Umidade	%	2	2	2
Matéria Seca	%	98	98	98
Proteína Bruta	%	4405	3890	3124
Arginina Digestível Aves	%	236	191	142
Lisina Digestível Aves	%	192	176	146
Metionina Digestível Aves	%	105	90	75
Metionina + Cistina Digestível Aves	%	273	242	173
Treonina Digestível Aves	%	299	275	197
Triptofano Digestível Aves	%	17	15	8
Isoleucina Digestível Aves	%	164	144	108
Leucina Digestível Aves	%	96	89	67
Valina Digestível Aves	%	196	179	124

Fonte: Ronozyme ProAct (DSM).

TABELA 11- Composição percentual e nutricional da ração experimental para a fase pré inicial de frango de corte

Ingredientes	Controle	1 Val. s/ protease	2 Val. s/protease	1 Val. c/ protease	2 Val. c/ protease
Milho	56,84	59,12	59,95	59,12	59,95
Farelo soja	34,36	32,31	31,77	32,31	31,77
Óleo de soja	0,53	0,33	0,33	0,33	0,33
Farinha de Carne e Ossos	3,20	3,33	3,66	3,33	3,66
Farinha de vísceras	2,80	2,53	2,00	2,53	2,00
Calcario	0,833	0,966	0,966	0,966	0,966
Sal	0,353	0,346	0,353	0,346	0,353
Bicarbonato de sódio	0,158	0,168	0,158	0,168	0,158
DL Met	0,374	0,334	0,282	0,334	0,282
L- Lis HCl	0,158	0,176	0,153	0,176	0,153
Cloreto de Colina	0,058	0,066	0,071	0,066	0,071
L Treonina	0,070	0,037	-	0,037	-
Valina	0,003	-	-	-	-
Fitase	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Prebiótico	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
Bacitracina de Zn	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
Nicarbazina	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
Premix Vitamínico Inicial ¹	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Premix Mineral ²	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06
Protease*	-	-	-	0,02	0,02
Amido	-	0,02	0,04	-	0,02
Total	100	100	100	100	100
Composição Nutricional Calculada					
Energia Metabolizável Aves kcal	2.910	2.910	2.910	2.910	2.910
Proteína Bruta %	23,95	23,11	22,23	23,11	22,23
Arginina Digestível Aves %	1,453	1,416	1,369	1,416	1,369
Lisina Digestível Aves %	1,290	1,251	1,213	1,251	1,213
Metionina Digestível Aves %	0,687	0,686	0,665	0,686	0,665
Metionina + Cistina Digestível %	0,980	0,926	0,871	0,926	0,871
Treonina Digestível Aves %	0,826	0,766	0,706	0,766	0,706
Triptofano Digestível Aves %	0,241	0,237	0,234	0,237	0,234
Cálcio %	0,980	0,980	0,980	0,980	0,980
Fósforo Total %	0,713	0,713	0,713	0,713	0,713
Fósforo Disponível %	0,490	0,490	0,490	0,490	0,490
Balanço Eletrolítico mEq/kg	252	252	252	252	252
Colina ppm	1.800	1.800	1.800	1.800	1.800

¹ Val= 1 valorização 2 Val= 2 valorizações ¹Suplemento vitamínico (por kg do produto): vit A, 20.000.000 UI; vit D3, 5.000.000UI; vit E, 50.000 UI; vit K3, 4.000mg; vit B1, 5.000mg; vit B2, 13.000mg, vit B6, 7.000mg; vit B12, 36.000mcg; ác. Pant. 30.000mg; ác. Nicot. 84.000mg; ác. Fólico, 2.400mg; Biotina 160.000mcg; Antioxidante 166mg; Selênio 600mg.

²Suplemento mineral (kg/produto): Manganês, 150000mg; Zinco, mg; Ferro, 100000mg; Cobre, 16000mg; Iodo, 2000mg.

* contribuição proposta da matriz nutricional da enzima disponíveis no Quadro 2.

TABELA 12- Composição percentual e nutricional da ração experimental para a fase inicial de frango de corte

Ingredientes	Controle	1 Val. s/ protease	2 Val. s/protease	1 Val. c/ protease	2 Val. c/ protease
Milho	60,80	63,60	66,18	63,60	66,18
Farelo soja	29,88	27,48	25,22	27,48	25,22
Óleo de soja	1,40	0,93	0,53	0,93	0,53
Farinha de Carne e Ossos	2,73	2,80	2,80	2,80	2,80
Farinha de vísceras	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
Calcario	0,900	0,900	0,966	0,900	0,966
Sal	0,346	0,346	0,306	0,346	0,306
Bicarbonato de sódio	0,070	0,070	0,143	0,070	0,143
DL Met	0,329	0,293	0,256	0,293	0,256
L- Lis HCl	0,160	0,186	0,208	0,186	0,208
Cloreto de Colina	0,068	0,075	0,081	0,075	0,081
L Treonina	0,075	0,048	0,018	0,048	0,018
Fitase	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Prebiótico	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
Bacitracina de Zn	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
Anticoccidiano	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Premix Vitamínico inicial ¹	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Premix Mineral ²	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Protease*	-	-	-	0,02	0,02
Amido	-	0,02	0,04	-	0,02
Total	100	100	100	100	100

Composição Nutricional Calculada

Energia Metabolizável Aves kcal	3.010	3.010	3.010	3.010	3.010
Proteína Bruta %	22,10	21,21	20,33	21,21	20,33
Arginina Digestível Aves %	1,409	1,361	1,314	1,361	1,314
Lisina Digestível Aves %	1,180	1,141	1,103	1,141	1,103
Metionina Digestível Aves %	0,707	0,686	0,665	0,686	0,665
Metionina + Cistina Digest %	0,980	0,925	0,870	0,925	0,870
Treonina Digestível Aves %	0,767	0,707	0,647	0,707	0,647
Triptofano Digestível Aves %	0,241	0,237	0,234	0,237	0,234
Cálcio %	0,920	0,920	0,920	0,920	0,920
Fósforo Total %	0,663	0,663	0,663	0,663	0,663
Fósforo Disponível %	0,450	0,450	0,450	0,450	0,450
Balanço Eletrolítico mEq/kg	202	202	202	202	202
Colina ppm	1.780	1.780	1.780	1.780	1.780

¹ Val= 1 valorização 2 Val= 2 valorizações ³Suplemento vitamínico (por kg do produto): vit A, 20.000.000 UI; vit D3, 5.000.000UI; vit E, 50.000 UI; vit K3, 4.000mg; vit B1, 5.000mg; vit B2, 13.000mg, vit B6, 7.000mg; vit B12, 36.000mcg; ác. Pant. 30.000mg; ác. Nicot. 84.000mg; ác. Fólico, 2.400mg; Biotina 160.000mcg; Antioxidante 166mg; Selênio 600mg.

²Suplemento mineral (por kg do produto): Manganês, 150000mg; Zinco, mg; Ferro, 100000mg; Cobre, 16000mg; Iodo, 2000mg.

* contribuição proposta da matriz nutricional da enzima disponíveis no Quadro 2.

Metabolizabilidade dos nutrientes

O ensaio de metabolismo foi realizado na fase inicial (17-21 dias) pelo método da coleta total de excretas⁶. As coletas de excretas foram realizadas duas vezes ao dia e acondicionadas em sacos plásticos identificados, assim como as rações de cada tratamento e após isso congelados para conservação e posteriores análises bromatológicas, para a determinação do coeficiente de metabolização da matéria seca, balanço de nitrogênio, coeficiente de metabolização do nitrogênio, e nitrogênio retido.

As análises foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal do departamento de Zootecnia da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás. A quantidade de ração consumida, peso inicial e final das aves e a quantidade de excreta produzida em cada unidade experimental, foi devidamente registrada.

As análises de proteína bruta e matéria seca das rações e das excretas foram realizadas em duplicata de acordo com o método preconizado por Silva e Queiroz⁷. As amostras foram submetidas à pré-secagem em estufa retilínea de ventilação forçada a $55 \pm 5^\circ \text{C}$, e, posteriormente, moídas no moinho tipo Willey. A matéria seca a 105°C foi determinada em estufa regulada à temperatura de 105°C e foi determinado o nitrogênio total pelo método micro Kjeldahl⁷ e o resultado multiplicado pelo fator 6,25 para obtenção do percentual de proteína bruta. Foram calculados o balanço nutricional, como proposto por Matterson et al.⁸, a retenção de nitrogênio como proposto por Sakomura e Rostagno⁶ e os coeficientes de metabolizabilidade como proposto por Batal e Parsons⁹ e Noy e Sklan¹⁰. O coeficiente de metabolizabilidade, balanço de nitrogênio e retenção de nitrogênio foram determinados pelas fórmulas:

$$\text{CM (\%)} = \frac{\text{Nutriente ingerido} - \text{Nutriente excretado} \times 100}{\text{Nutriente ingerido}}$$

$$\text{BN} = \text{Nutriente ingerido} - \text{Nutriente excretado}$$

$$\text{Retenção de N} = \frac{\text{Nutriente retido}}{\text{ganho de peso}} \times 100$$

Histomorfometria dos segmentos intestinais

Para análise do desenvolvimento intestinal, duas aves por tratamento, no total de 60 aves, foram sacrificadas por deslocamento cervical, ao sétimo e 21º dias de idade. Foram colhidos os segmentos de três centímetros do duodeno, jejuno e íleo, com posterior abertura da borda mesentérica, estendidos pela túnica serosa e estirados sobre placa de isopor, presos por grampos metálicos. Imediatamente após a coleta, as porções de intestino foram lavados em solução fisiológica e fixados em formol tamponado a 10%.

Decorrido um período de 24 a 36 horas, esse material foi recortado, identificado e acondicionado nos cassetes (pequenas caixas plásticas individuais). Depois foram lavados em água corrente por aproximadamente 10 minutos. Após esse procedimento foi iniciada a desidratação das peças, utilizando soluções de álcool 70%, 80% e 90% por 30 minutos em cada concentração, em seguida, ocorreu o processo de desidratação com o álcool absoluto (álcool 100%), que foi realizada em três vezes com duração de 40 minutos cada.

Terminada a desidratação iniciou-se o processo de clarificação com o uso de xilol. Para tal fase, as amostras foram mergulhadas em solução de xilol, por duas vezes, sendo que em cada solução o material ficou mergulhado 30 minutos. Após esta etapa o material foi transferido para a parafina I e colocada na estufa a 56°C por 30 minutos. Decorrido o tempo o material foi novamente transferido para outra vasilha com a parafina II por mais 40 minutos e também colocado na estufa a 56°C. Estes materiais foram incluídos em blocos de parafina histológica laminada a cinco micrômetros em micrótomo rotativo, utilizando navalhas descartáveis, e coradas pelo método de Hematoxilina e Eosina (HE)¹² adotado pelo laboratório de Patologia da EVZ-UFG.

O exame por microscopia ótica para avaliação histológica foi realizado no Departamento de Patologia Animal da Universidade Federal de Goiás com o auxílio de um microscópio óptico de campo claro (Carl Zeiss® modelo Jevenal) acoplado a um sistema de analisar imagens Axio Vision 3.0 (Zeiss®). As imagens capturadas foram averiguadas posteriormente pelo software Image J. Foram realizadas 40 medidas de altura de vilosidade e de profundidade de cripta de cada região intestinal por lâmina histológica (Figuras 1 e 2). As regiões de leitura foram adotadas pelos locais que correspondem à região basal dos vilos até o seu ápice, e as criptas da sua base até a região de transição vilosidade/cripta¹³. A relação vilosidade/cripta foi calculada dividindo a altura das vilosidades pela profundidade das criptas.

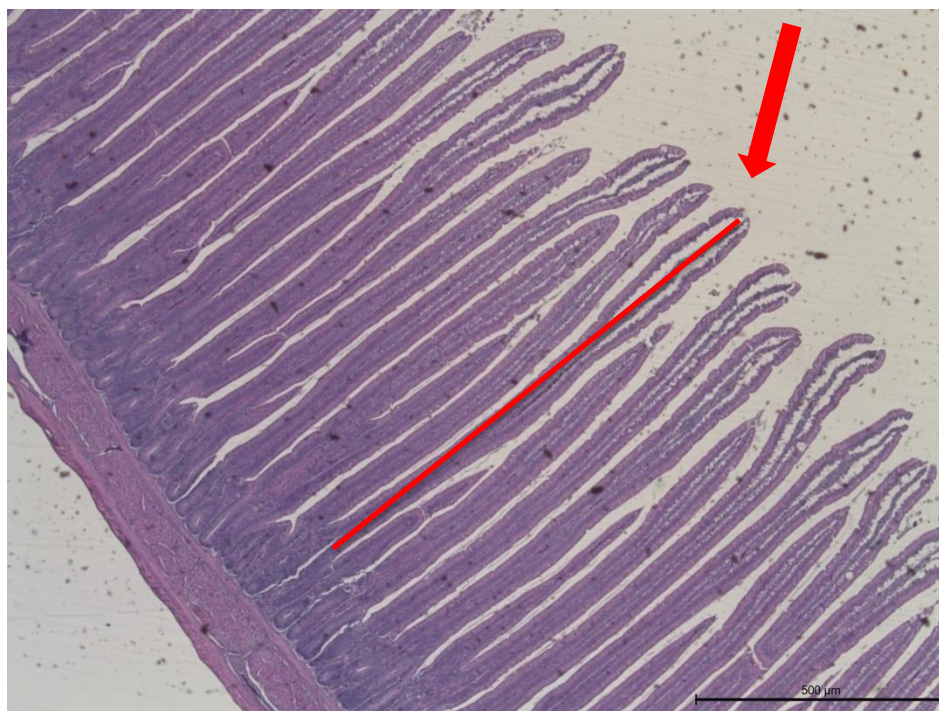


FIGURA 1 - Mensurações da altura da vilosidade do duodeno de frangos de corte machos suplementados com enzima protease na fase pré-inicial e inicial.
Fonte: arquivo pessoal (2017)



FIGURA 2- Mensurações da profundidade da cripta do duodeno de frangos de corte machos suplementados com enzima protease na fase pré-inicial e inicial.
Fonte: arquivo pessoal (2017)

Análise estatística dos dados

A análise dos dados foi realizada utilizando-se a análise de variância (ANOVA) por meio do *software* R¹⁴, e os dados, quando estatisticamente diferentes a 5% de probabilidade, foram comparados pelo Teste de Scott Knott.

Também foi realizada análise multivariada de componentes principais, e, estimadas correlações de Pearson entre as variáveis de metabolizabilidade dos nutrientes e histomorfometria intestinal aos 7 e 21 dias. As correlações de Pearson foram testadas utilizando o teste t. Para auxílio nas análises estatísticas utilizou-se o *software* R¹⁴ e pacote *easyanova*¹⁵.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 3 está demonstrado os resultados de coeficientes de metabolizabilidade dos nutrientes na fase inicial, no período de 17 a 21 dias de vida do frango de corte. Foi encontrado diferenças estatísticas ($p \leq 0,05$) para as variáveis de coeficiente de metabolizabilidade da matéria seca (CMMS) e coeficiente de metabolizabilidade do nitrogênio (CMN). As aves que consumiram as dietas que possuíam protease apresentaram maior CMN e CMMS, demonstrando que a suplementação da enzima foi eficaz, já que as aves que consumiram as dietas que possuíam redução de proteína bruta e apresentaram valores superiores de metabolizabilidade comparado à dieta controle. O aumento dos coeficientes de metabolizabilidade da matéria seca indica maior absorção dos nutrientes da dieta¹⁶. Santos¹⁷, relatou que o aumento do CMMS é explicado pela melhora na digestibilidade de nutrientes, como proteína bruta e minerais, e no aproveitamento da energia, proporcionados pelas suplementações de enzimas nas dietas.

O aumento do coeficiente de metabolizabilidade do nitrogênio promovido pela suplementação da enzima, pode estar relacionado tanto à menor produção de aminoácidos endógenos quanto à melhor digestão dos aminoácidos das dietas. Resultados semelhantes a este estudo foram encontrados por Ghazi et al.⁴, que avaliaram o potencial de várias proteases para melhorar o valor nutricional da farinha de soja em frangos de corte. Foram consideradas duas proteases, uma protease alcalina de *Bacillus* e uma protease ácida de *Aspergillus*, e observou-se que, apenas a protease isolada de *Aspergillus* aumentou a digestibilidade ileal aparente de nitrogênio. Messias¹⁸, avaliando uma protease de *Bacillus licheniformis* e seu efeito sobre a digestibilidade de aminoácidos da soja integral desativada na dieta de frangos de corte,

observou aumento da digestibilidade aparente e verdadeira dos aminoácidos e da proteína bruta, quando as dietas continham protease.

As aves dos tratamentos valorizados sem a suplementação da protease também apresentaram diferenças estatísticas ($p \leq 0,05$) para as variáveis de coeficiente de metabolizabilidade do nitrogênio (CMN) e coeficiente de metabolizabilidade da matéria seca (CMMS). Sugere-se que nesse caso já que houve redução da proteína bruta, sem haver a suplementação da protease, ocorreu ganho compensatório, principalmente pelo fato que, quando a dieta foi valorizada uma vez, pode-se observar aumento dos coeficientes comparados à dieta controle e quando a dieta foi valorizada duas vezes esse ganho compensatório foi ainda maior, sem alterar a retenção de nitrogênio. Resultados de ganho compensatório com redução da proteína bruta nas dietas também foram encontradas por Stringhini et. al.¹⁹, avaliando diferentes níveis de proteína bruta em dietas a base de milho e farelo de soja para frangos de corte na fase inicial, observaram aumento da atividade da tripsina no intestino, quando as dietas possuíam níveis mais baixos de proteína bruta, sem alteração da conversão alimentar e ganho de peso das aves no final do período.

TABELA 13- Coeficientes de metabolizabilidade da matéria seca, do nitrogênio, balanço de nitrogênio e nitrogênio retido para rações de frangos alimentados com dietas contendo protease no período de 17 a 21 dias de idade

Tratamento	Balanço de N (g)	CMN (%)	CMMS (%)	Ret N (mg N/g ganho de peso)
Controle	66,5	67,3c	77,1c	31,2
1 Valorização s/Protease	71,3	72,7b	80,9b	33,3
2 Valorizações s/Protease	68,6	76,6a	82,9a	33,3
1 Valorização c/Protease	65,7	75,0a	82,4a	33,4
2 Valorizações c/Protease	63,9	76,4a	83,5a	34,8
Valor de p	0,23	0,00	0,00	0,11
CV (%)	7,84	2,74	1,76	6,41

* Médias seguidas de letras distintas, dentro de cada coluna, diferem estatisticamente pelo Teste de Scott Knott * ($P < 0,05$).

Legenda: Balanço de N (Balanço de nitrogênio), CMN (Coeficiente de metabolizabilidade do nitrogênio), CMMS (Coeficiente de metabolizabilidade da matéria seca) e Ret N (Nitrogênio retido).

Ao avaliar os resultados de altura de vilo, profundidade de cripta e relação vilo:cripta do intestino delgado dos frangos aos 7 dias de idade (Tabela 4), encontramos diferenças estatísticas ($p \leq 0,05$) na altura do vilo e na relação vilo:cripta do íleo. Na fase pré-inicial, os pintos que se alimentaram do tratamento com duas valorizações e inclusão da protease apresentaram resultado superior nas vilosidades do íleo em relação as aves dos demais

tratamentos, entretanto, não observamos o mesmo resultado nas vilosidades no duodeno e no jejuno.

TABELA 14- Altura de vilo, profundidade de cripta e relação vilo:cripta do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) de frangos alimentados com dietas contendo protease aos 7 dias de idade

Tratamentos	Duodeno		
	Vilo (μm)	Cripta (μm)	V:C
Controle	1046	184	5,7
1 Valorização s/ Protease	1010	194	4,8
2 Valorizações s/ Protease	1034	187	5,4
1 Valorização c/ Protease	1053	186	5,7
2 Valorizações c/ Protease	1016	202	5,0
Valor de p	0,90	0,30	0,15
CV (%)	8,03	7,83	11,69
	Jejuno		
	Vilo (μm)	Cripta (μm)	V:C
Controle	556,	170	3,3
1 Valorização s/ Protease	573	175	3,3
2 Valorizações s/ Protease	570	170	3,4
1 Valorização c/ Protease	554	157	3,4
2 Valorizações c/ Protease	609	156	4,2
Valor de p	0,40	0,38	0,15
CV (%)	8,36	10,26	14,84
	Íleo		
	Vilo (μm)	Cripta (μm)	V:C
Controle	447b	146	3,0b
1 Valorização s/ Protease	484b	147	3,3b
2 Valorizações s/ Protease	504b	154	3,2b
1 Valorização c/ Protease	500b	137	3,2b
2 Valorizações c/ Protease	558a	138	4,0a
Valor de p	0,00	0,56	0,00
CV (%)	9,06	12,05	8,88

* Médias seguidas de letras distintas, dentro de cada coluna, diferem estatisticamente pelo Teste de Scott Knott * ($P < 0,05$).

Esse resultado pode ser justificado pela imaturidade do trato gastrointestinal e limitações na produção enzimática após a eclosão do pintainho. A superfície de absorção e taxa de proliferação dos enterócitos aumenta após a eclosão, sendo esse rápido desenvolvimento diferente ao longo do intestino delgado. Nitsan et al.²⁰ confirmaram a presença de quimiotripsina e de tripsina no pâncreas de pintainhos na eclosão, contudo, as atuações de ambas as enzimas foram baixas até o 5º ou 6º dia de idade quando tiveram um aumento significativo, sendo o ápice da quimiotripsina no 10º dia de vida. Segundo Maiorka et al.²¹, o desenvolvimento da mucosa intestinal é afetado pelas características físicas e nutricionais do alimento e a flora intestinal. Neste sentido, a inclusão da enzima protease pôde estimular o

desenvolvimento do íleo. Outro fator é que com a menor quantidade de proteína no íleo, diminuiu-se a produção de metabólitos tóxicos de fermentação de proteínas no ceco, reduzindo a fermentação cecal, que podem ter permitido o desenvolvimento do intestino nessa região²².

Alguns estudos demonstram o papel da protease exógena na morfologia intestinal, e são apresentadas por Wang et al.²³ e Zuo et al.²⁴, que observaram aumentos significativos na altura das vilosidades e diminuição na profundidade da cripta quando uma protease exógena foi adicionada às dietas à base de milho / soja para leitões recentemente desmamados²⁴ e frangos de corte²³.

TABELA 15- Altura de vilo, profundidade de cripta e relação vilo:cripta do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) de frangos alimentados com dietas contendo protease aos 21 dias de idade

Tratamentos	Duodeno		
	Vilo (µm)	Cripta (µm)	V:C
Controle	1868	220	8,5
1 Valorização s/ Protease	1924	210	9,1
2 Valorizações s/ Protease	1848	212	8,8
1 Valorização c/ Protease	1722	205	8,5
2 Valorizações c/ Protease	1775	234	7,7
Valor de p	0,35	0,36	0,25
CV (%)	9,44	11,60	12,76
Tratamentos	Jejuno		
	Vilo (µm)	Cripta (µm)	V:C
Controle	1146a	175	6,5
1 Valorização s/ Protease	1128a	164	6,8
2 Valorizações s/ Protease	994b	165	6,0
1 Valorização c/ Protease	863b	141	6,1
2 Valorizações c/ Protease	960b	166	5,8
Valor de p	0,04	0,09	0,10
CV (%)	15,47	11,59	10,94
Tratamentos	Íleo		
	Vilo (µm)	Cripta (µm)	V:C
Controle	946a	153	6,5
1 Valorização s/ Protease	801b	135	6,4
2 Valorizações s/ Protease	846b	119	6,7
1 Valorização c/ Protease	818b	127	6,7
2 Valorizações c/ Protease	812b	126	6,8
Valor de p	0,02	0,08	0,97
CV (%)	7,36	12,82	11,42

* Médias seguidas de letras distintas, dentro de cada coluna, diferem estatisticamente pelo Teste de Scott Knott * (P<0,05).

Já, aos 21 dias de idade dos frangos (Tabela 5), observou-se diferenças estatísticas (p≤0,05) na altura de vilo do jejuno e do íleo, entretanto, nessa idade em questão, a inclusão da

protease não foi superior ao tratamento controle. As aves geralmente são mais responsivas às dietas na fase inicial da vida do frango, devido o maior desenvolvimento proporcional do intestino.

Ao analisar os resultados de correlação entre as variáveis de histomorfometria intestinal aos sete dias de idade e de metabolizabilidade dos nutrientes aos 21 dias de idade, pode-se observar forte correlação positiva e significativa entre a altura de vilo do íleo e as variáveis de CMN ($r = 0,85$), CMMS ($r = 0,88$) e RETN ($r = 0,95$). Outra correlação importante estatisticamente significativa que pode ser observada é a de relação vilo:cripta do íleo e a variável de retenção de nitrogênio (RETN) ($r = 0,85$) (Tabela 6 e Figura 3).

Essas correlações positivas podem demonstrar que, quanto maior a altura do vilo do íleo e de sua relação vilo:cripta, a absorção do intestino está sendo aumentada, refletindo em maior metabolizabilidade dos nutrientes. Entretanto está sendo correlacionado o desenvolvimento intestinal aos 7 dias e o metabolismo aos 21 dias, isso demonstra que um maior desenvolvimento intestinal influenciado pela suplementação da protease na fase inicial de vida do frango refletiu em melhores coeficientes de metabolismo aos 21 dias de idade, reiterando a importância da suplementação de dietas com aditivos na fase inicial. Esses resultados são compatíveis com Mori²⁵, que observou correlação positiva entre as variáveis de metabolizabilidade e os parâmetros morfométricos, indicando que o aumento da altura de vilosidade implica em aumento da metabolizabilidade do extrato etéreo em frangos de corte

Estudos apontam que a inclusão da protease em dietas altera a funcionalidade e fisiologia do trato gastrointestinal em vários fatores fundamentais. Além de melhorar a integridade e aumento das vilosidades intestinais, a viscosidade é reduzida no lúmen intestinal²⁶ e há maior disponibilidade de aminoácidos para a síntese de mucina. Possivelmente, esses fatores unidos foram capazes de melhorar a metabolizabilidade dos nutrientes no lúmen intestinal.

A figura 3 mostra esses resultados, em que está demonstrado o gráfico com os dois primeiros componentes principais para as variáveis analisadas. Avaliando o primeiro componente principal, observa-se uma forte correlação positiva entre as variáveis de altura de vilo e relação vilo:cripta do íleo e jejuno e profundidade de cripta do duodeno e coeficiente de metabolizabilidade do nitrogênio, coeficiente de metabolizabilidade da matéria seca e retenção de nitrogênio. Resultados semelhantes foram observados por Odetallah et al.²⁷, onde a viscosidade da digesta no jejuno foi reduzida quando a dieta do frango foi suplementada com queratinase, o que pôde melhorar a digestibilidade dos ingredientes das rações.

TABELA 16- Matriz de correlação entre as variáveis de histomorfometria intestinal aos 7 dias de idade e a metabolizabilidade dos nutrientes aos 21 dias de idade de frangos de corte suplementados com protease.

	BN	CMN	CMMS	RETN	ViloD	CriptaD	VCD	ViloJ	CriptaJ	VCJ	ViloI	CriptaI	VCI
BN		-0,15	-0,18	-0,22	-0,37	-0,20	-0,41	-0,33	0,88*	-0,72	-0,47	0,68	-0,46
CMN			0,99*	0,90*	-0,28	0,45	-0,36	0,51	-0,48	0,46	0,85**	-0,13	0,61
CMMS				0,94*	-0,31	0,52	-0,40	0,55	-0,52	0,50	0,88*	-0,22	0,66
RETN					-0,53	0,78	-0,60	0,75	-0,56	0,69	0,95*	-0,39	0,85**
ViloD						-0,82**	0,99*	-0,73	-0,25	-0,37	-0,44	-0,11	-0,62
CriptaD							-0,81**	0,94*	-0,34	0,81	0,79	-0,40	0,94*
VCD								-0,69	-0,22	-0,33	-0,47	-0,07	-0,61
ViloJ									-0,37	0,89*	0,84**	-0,26	0,97*
CriptaJ										-0,72	-0,67	0,83**	-0,57
VCJ											0,86**	-0,57	0,94*
ViloI												-0,42	0,93*
CriptaI													-0,46
VCI													

Legenda BN: (balanço de nitrogênio); CMN (coeficiente de metabolizabilidade do nitrogênio); CMMS (Coeficiente de metabolizabilidade da matéria seca); RETN (retenção de nitrogênio); ViloD (altura de vilo do duodeno); CriptaD (profundidade de cripta do duodeno); VCD (relação vilo:cripta do duodeno); ViloJ (altura de vilo do jejuno); CriptaJ (profundidade de cripta do jejuno); VCJ (relação vilo:cripta do jejuno); ViloI (altura de vilo do íleo); CriptaI (profundidade de cripta do íleo); VCI (relação vilo:cripta do íleo)

*Medidas de correlação $\geq |0,88|$ estatisticamente significativas à 5% de probabilidade

**Medidas de correlação $\leq |0,81|$ estatisticamente significativas à 10% de probabilidade

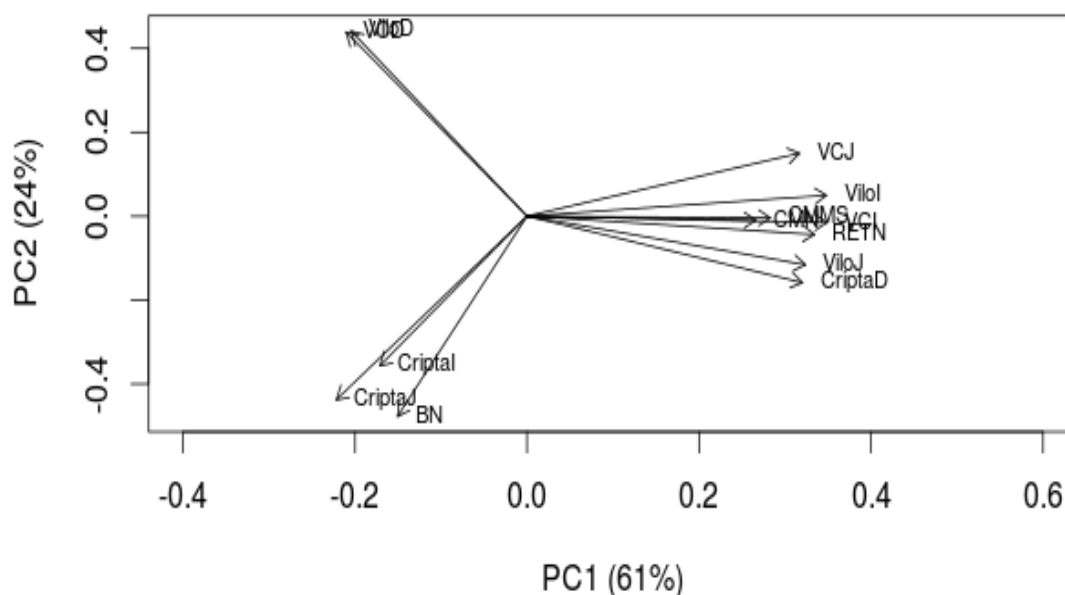


FIGURA 3— Gráfico com os dois primeiros componentes principais para as variáveis de histomorfometria intestinal aos 7 dias de idade e a metabolizabilidade dos nutrientes aos 21 dias de idade de frangos de corte suplementados com protease.

Legenda BN: (balanço de nitrogênio); CMN (coeficiente de metabolizabilidade do nitrogênio); CMMS (Coeficiente de metabolizabilidade da matéria seca); RETN (retenção de nitrogênio); ViloD (altura de vilo do duodeno); CriptaD (profundidade de cripta do duodeno); VCD (relação vilo:cripta do duodeno); ViloJ (altura de vilo do jejuno); CriptaJ (profundidade de cripta do jejuno); VCJ (relação vilo:cripta do jejuno); ViloI (altura de vilo do íleo); CriptaI (profundidade de cripta do íleo); VCI (relação vilo:cripta do íleo)

Os dados de correlação obtidos entre as variáveis na Tabela 7 e Figura 4, indicaram forte correlação positiva significativa para altura de vilo ($r = 0,81$) e relação vilo:cripta ($r = 0,93$) do duodeno e balanço de nitrogênio. A formação dos tecidos estruturais além de outros processos nutricionais e metabólicos do organismo das aves depende fundamentalmente das proteínas²⁸. O balanço de nitrogênio, quando positivo, indica maior retenção de nitrogênio no organismo do animal e consequente deposição proteica, isso demonstra que quando há maior altura de vilo e maior relação vilo:cripta no duodeno, há o aumento da metabolizabilidade dos nutrientes e consequente aumento da deposição proteica nos tecidos.

A profundidade de cripta do íleo demonstrou forte correlação negativa com as variáveis de CMN ($r = -0,98$), CMMS ($r = -0,96$) e RETN ($r = -0,91$). O desenvolvimento da mucosa intestinal pode ser avaliado pela altura dos vilos e profundidade da cripta. O conceito “turnover” se refere à renovação celular que ocorre no intestino.

TABELA 17- Matriz de correlação entre as variáveis de histomorfometria intestinal e a metabolizabilidade dos nutrientes aos 21 dias de idade de frangos de corte suplementados com protease com valores da correlação na diagonal superior

	BN	CMN	CMMS	RETN	ViloD	CriptaD	VCD	ViloJ	CriptaJ	VCJ	ViloI	CcriptaI	VCI
BN		-0,15	-0,18	-0,22	0,81**	-0,56	0,93*	0,56	0,17	0,77	-0,15	0,04	-0,81**
CMN			0,99*	0,90*	-0,47	0,00	-0,20	-0,74	-0,50	-0,69	-0,79	-0,98*	0,65
CMMS				0,94*	-0,50	0,03	-0,23	-0,75	-0,52	-0,67	-0,84**	-0,96*	0,64
RETN					-0,42	0,24	-0,37	-0,61	-0,41	-0,60	-0,88*	-0,81**	0,54
ViloD						-0,05	0,61	0,92	0,70	0,76	0,24	0,41	-0,85**
CriptaD							-0,81**	0,14	0,59	-0,44	0,16	0,14	0,35
VCD								0,39	-0,07	0,76	-0,05	0,06	-0,74
ViloJ									0,82**	0,76	0,50	0,72	-0,83**
CriptaJ										0,25	0,57	0,51	-0,36
VCJ											0,22	0,63	-0,99*
ViloI												0,74	-0,19
CriptaI													-0,60
VCI													

Legenda: BN (balanço de nitrogênio); CMN (coeficiente de metabolizabilidade do nitrogênio); CMMS (Coeficiente de metabolizabilidade da matéria seca); RETN (retenção de nitrogênio); ViloD (altura de vilo do duodeno); CriptaD (profundidade de cripta do duodeno); VCD (relação vilo:cripta do duodeno); ViloJ (altura de vilo do jejuno); CriptaJ (profundidade de cripta do jejuno); VCJ (relação vilo:cripta do jejuno); ViloI (altura de vilo do íleo); CriptaI (profundidade de cripta do íleo); VCI (relação vilo:cripta do íleo)

* Medidas de correlação $\geq |0,90|$ estatisticamente significativas à 5% de probabilidade

** Medidas de correlação $\leq |0,81|$ estatisticamente significativas à 10% de probabilidade

Esse processo decorre primariamente de dois eventos citológicos associados: renovação celular (proliferação e diferenciação), resultante das divisões mitóticas sofridas por células localizadas na cripta e ao longo dos vilos, e perda de células (extrusão), que ocorre normalmente no ápice dos vilos²¹.

Os sinais da resposta imunológica em curso no intestino incluem o aumento da infiltração de leucócitos na lâmina própria e as mudanças na estrutura do intestino, como a atrofia das vilosidades e hiperplasia dos enterócitos nas criptas²⁹. Nesse caso, a correlação entre as variáveis demonstra que quando ocorrem lesões no trato gastrointestinal e a profundidade de cripta aumenta, a restauração do epitélio intestinal provoca a diminuição da absorção dos nutrientes presentes, resultando em uma redução dos coeficientes de metabolizabilidade e retenção de nitrogênio.

A Figura 4 demonstra em uma visão geral, fraca correlação entre as variáveis. Resultado que pode ser justificado pela pouca resposta da inclusão da protease nas dietas refletida nas vilosidades intestinais aos 21 dias de idade dos frangos de corte.

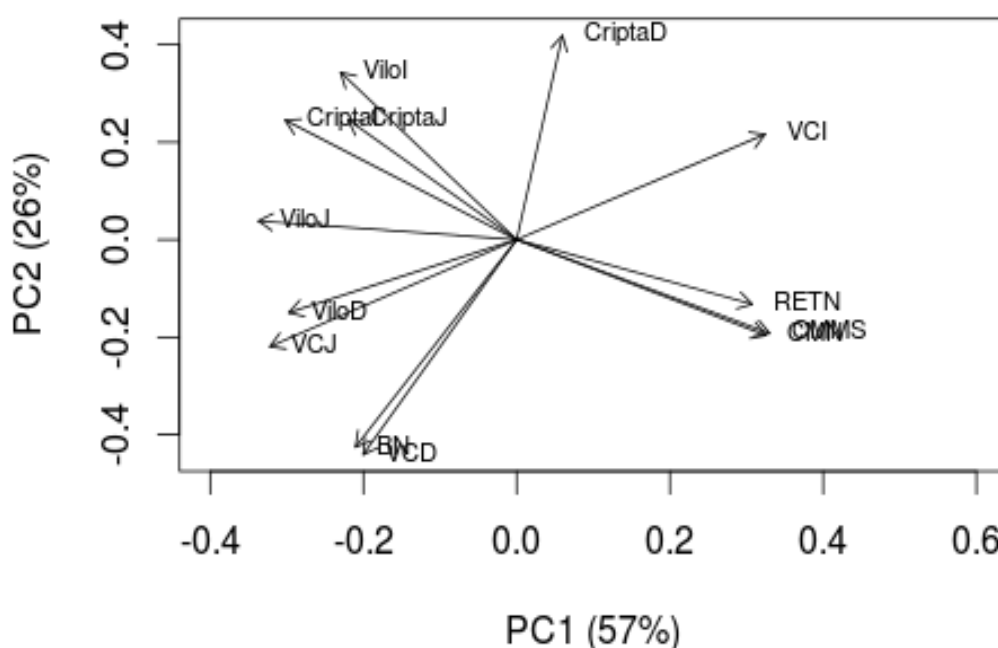


FIGURA 4 - Gráfico com os dois primeiros componentes principais para as variáveis de histomorfometria intestinal e a metabolizabilidade dos nutrientes aos 21 dias de idade de frangos de corte suplementados com protease

Legenda BN: (balanço de nitrogênio); CMN (coeficiente de metabolizabilidade do nitrogênio); CMMS (Coeficiente de metabolizabilidade da matéria seca); RETN (retenção de nitrogênio); ViloD (altura de vilão do duodeno); CriptaD (profundidade de cripta do duodeno); VCD (relação vilão:cripta do duodeno); ViloJ (altura de vilão do jejuno); CriptaJ (profundidade de cripta do jejuno); VCJ (relação vilão:cripta do jejuno); ViloI (altura de vilão do íleo); CriptaI (profundidade de cripta do íleo); VCI (relação vilão:cripta do íleo)

CONCLUSÃO

Conclui-se que a inclusão da enzima protease nas dietas de frangos de corte melhorou a metabolizabilidade dos nutrientes na fase inicial e estimula o desenvolvimento das vilosidades intestinais na fase pré- inicial.

REFERÊNCIAS

- 1- Vieira SL, Angel CR, Miranda DJA, Favero A, Cruz RFA, Sorbara JOB. Effects of a monocomponent protease on performance and protein utilization in 1- to 26-day-of-age turkey poult. *The Journal of Applied Poultry Research*. 2013;22:680–688.
- 2- Sakomura NK, Silva JHV, Costa FGP, Fernandes JBK, Hauschild L. *Nutrição de Não Ruminantes*. Jaboticabal: Funep, 2014. p.678
- 3- Fru-Nji F, Klunter AM, Fischer M, Pontoppidan K. A feed serine protease improves broiler Performance and energy digestibility. *The Journal of Poultry Science*. 2011;48(10):239–246.
- 4- Ghazi S, Rooke JA, Galbraith H, Bedford MR. The potential for the improvement in the nutritive value of soybean meal by different proteases in broiler chicks and broiler cockerels. *Brasilian Poultry Science*. 2002;43:70-77.
- 5- Cowieson AJ, Roos FF. Toward optimal value creation through the application of exogenous mono-component protease in the diets of non-ruminants. *Anim. Feed Sci. Tech*. 2016;221:331–340
- 6- Sakomura NK, Rostagno HS. *Métodos de pesquisa em nutrição de monogástricos*. Jaboticabal: Funep; 2007. p. 283.
- 7- Silva DJ, Queiroz AC. *Análise de alimentos (métodos químicos e biológicos)*, 3. ed., Viçosa: UFV, 2002; p.165.
- 8- Matterson LD, Potter LM, Stutz MW, Singsen E.P. The metabolizable energy of feeds ingredients for chickens. *Research Report*, Storrs, Connecticut, The University of Connecticut, Agricultural Experiment Station. 1965.
- 9- Batal AB, Parsons CM. Effects of age on nutrient digestibility in chicks fed different diets. *Poultry Science*, Champaign. 2002; 81:400-407.
- 10- Noy Y, Sklan D. Nutrient use in chicks during the first week posthatch. *Poultry Science*, Champaign. 2002;81:391-399.
- 11- Uni Z, Noy Y, Skland D. Posthatch development of small intestinal function. *Poultry Science*. 2000;78:215-22.
- 12- Luna LG. *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. 3rd ed. New York: McGraw-Hill; 1968. p.258.

- 13- Fukayama EH, Bertechini AG, Geraldo A, Kato RK, Murgas LDS. Extrato de orégano como aditivo em rações para frangos de corte. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 2005;34(6):2316-2326.
- 14- R Core Team R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria; 2013. [acesso 5 jun 2017]. Disponível em: <http://www.R-project.org/>.
- 15- Arnhold E. Package in the R environment for analysis of variance and complementary analyses. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 2013;50(6):488-492.
- 16- Barbosa NAA, Sakomura NK, Fernandes JBK, Dourado LRB. Enzimas exógenas no desempenho e na digestibilidade ileal de nutrientes em frangos de corte. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 2008; 43(6): 755-762.
- 17- Santos FR. Efeito da suplementação com fitase sobre o desempenho e digestibilidade de nutrientes para frangos de corte [Dissertação]. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista;2005.
- 18- Messias RKG. Efeito de uma protease monocomponente sobre a digestibilidade de aminoácidos e da energia metabolizável da soja integral desativada para frangos de corte. [Dissertação] Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia; 2010.
- 19- Stringhini JH, Andrade ML, Xavier SAG, Andrade MA, Minafra CS, Café MB.. Protein and amino acid supplementation levels for broilers in prestarter ration. *International Journal of Poultry Science*. 2009; 8:946–951.
- 20- Nitsan ZI, Ben-avraham G, Zoref Z, Nir I. Growth and development of the digestive organs and some enzymes in broiler chicks after hatching. *British Poultry Science*. 1991;32:515-523.
- 21- Maiorka A, Boleli IC, Macari M. Desenvolvimento e reparo da mucosa intestinal. Macari, M, Furlan RL, Gonzales E. *Fisiologia Aviária: Aplicada a frangos de corte*. 2 ed. Jaboticabal: FUNEP; 2002. p. 113-123.
- 22- Apajalahti J, Vienola K. Interaction between chicken intestinal microbiota and protein digestion. *Anim. Feed Sci. Tech.* 2016;221: 323-330.
- 23- Wang H, Guo Y, Shih JCH. Effects of dietary supplementation of keratinase on growth performance, nitrogen retention and intestinal morphology of broiler chickens fed diets with soybean and cottonseed meals. *Anim. Feed Sci. Technol.* 2008; 140:376–384.
- 24- Zuo J, Ling B, Long L, Li T, Lahaye L, Yang C, Feng D. Effect of dietary supplementation with protease on the growth performance, nutrient utilization, intestinal morphology, digestive enzymes and gene expression of weaned piglets. *Anim. Nutr. J.* 2015;1:276-282. [acesso 27 dez 2017] Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anju.2015.10.003>.
- 25- Mori A. Relação entre o ensaio de digestibilidade de nutrientes e a integridade intestinal de frangos de corte submetidos a desafios químicos e microbiológicos. [Dissertação]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia; 2008.

- 26- Barekatain MR, Antipatis C, Choct M, Iji PA. Interaction between protease and xylanase In broiler chicken diets containing sorghum distillers dried grains with solubles. *Anim. Feed Sci. Technol.* 2013;182:71–81.
- 27- Odetallah NH, Wang JJ, Garlich JD, Shih JC. Keratinase in starter diets improves growth of broiler chicks. *Poult. Sci.* 2003;82:664–670.
- 28- Rutz F. Proteínas: Digestão e absorção. In: Macari M, Furlan RL, Gonzales E. *Fisiologia aviária: aplicada a frangos de corte*. Jaboticabal: FUNEP; 2002.p. 375.
- 29- Smith AL, Beal R. The avian enteric immune system in health and disease. In: Davison F, Kaspers B, Schat KA. *Avian Immunology*. Academic Press; 2008. p.243–271.

CAPÍTULO 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados desta pesquisa indicaram que a protease foi eficaz em dietas de frangos de corte. A suplementação de protease melhorou o desempenho e metabolizabilidade dos nutrientes comprovando os estudos recentes e aumentando as perspectivas de utilização desta como aditivos

As dietas até a fase de crescimento, valorizadas uma vez com inclusão de 15,000 unidades PROT/kg apresentaram melhores resultados de desempenho, indicando que em animais mais jovens o produto se torna mais eficaz, devido provavelmente, à imaturidade do trato gastrointestinal e de produção enzimática.

A inclusão de protease nas dietas resultou no aumento dos coeficientes de metabolizabilidade da matéria seca e nitrogênio na fase inicial de criação, demonstrando um aumento da digestão de aminoácidos e proteína, melhor aproveitamento das dietas pelos animais e um grande benefício ambiental, pela diminuição da excreção de nitrogênio pelas aves. Outro fator importante é a melhora na saúde intestinal das aves, indicado pelo aumento das vilosidades intestinais, representando maior absorção dos nutrientes. Esses resultados são uma possível explicação da melhora do desempenho.

Sabendo que a proteína é o ingrediente mais oneroso nas dietas animais, o uso da valorização nutricional demonstra um possível ganho no custo de produção, pois há uma diminuição dos níveis nutricionais da dieta com a inclusão de uma enzima que visa restaurar os valores da dieta padrão, resultado este encontrado no presente estudo. Entretanto, a utilização de duas valorizações nutricionais não é indicada, visto que os resultados foram inferiores quando comparados ao tratamento controle e uma valorização. A dieta do experimento em questão representa a realidade da nutrição no Brasil, sendo, portanto, mista de ingredientes vegetais (milho e farelo de soja), farinhas de origem animal e inclusão de aminoácidos sintéticos, demonstrando que o produto se torna bastante eficaz, possibilitando seu uso em produção a larga escala.