

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

**COMPLEXOS ENZIMÁTICOS EM RAÇÕES PARA FRANGOS DE
CORTE**

Lindolfo Dorcino dos Santos Neto

Orientador : Prof. Dr. Marcos Barcellos Café

GOIÂNIA

2016

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

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

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

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor (a):	Lindolfo Dorcino dos Santos Neto				
E-mail:	lindolfodorci-no@hotmail.com				
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? ☒ Sim ☐ Não					
Vínculo empregatício do autor	Mestre				
Agência de fomento:	CAPES			Sigla:	CAPES
País:	Brasil	UF:	GO	CNPJ:	
Título:	Complexos enzimáticos em rações para frangos de corte				
Palavras-chave:	Aditivos, desempenho, fitase, protease, carboidrase				
Título em outra língua:	Enzymatic complexes in feed of broiler chickens				
Palavras-chave em outra língua:	Additives, performance, phytase, protease, carbohydrases				
Área de concentração:	Metabolismo nutricional, alimentação e forragicultura na produção animal				
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	17/03/2016				
Programa de Pós-Graduação:	Programa de Pós-graduação em Zootecnia				
Orientador (a):	Marcos Barcellos Café				
E-mail:	mcafe@ufg.br				
Co-orientador (a):*	Fabyola Barros de Carvalho				
E-mail:	fabyolab@hotmail.com				

*Necessita do CPF quando não constar no SisPG

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ **SIM** ☐ **NÃO¹**

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

O sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Lindolfo Dorcino dos Santos Neto
Assinatura do (a) autor (a)

Data: 28 / 06 / 2016

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.

LINDOLFO DORCINO DOS SANTOS NETO

COMPLEXOS ENZIMÁTICOS EM RAÇÕES PARA 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

Linha de Pesquisa:

Metabolismo nutricional, alimentação e forragicultura na produção animal

Orientador:

Prof. Dr. Marcos Barcellos Café - EVZ/UFG

Comitê de Orientação:

Profa. Dra. Fabyola Barros de Carvalho - EVZ/UFG

Prof. Dr. José Henrique Stringhini - EVZ/UFG

GOIÂNIA

2016

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

Dorcino dos Santos Neto, Lindolfo
Complexos enzimáticos em rações para frangos de corte
[manuscrito] / Lindolfo Dorcino dos Santos Neto. - 2016.
CVIII, 57 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Barcellos Café; co-orientador
Fabyola Barros de Carvalho; co-orientador José Henrique Stringhini.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Escola
de Veterinária e Zootecnia (EVZ), Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia, Goiânia, 2016.

Bibliografia.

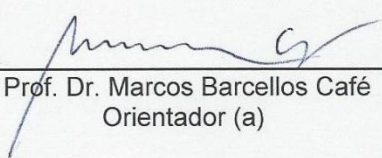
Inclui siglas, fotografias, abreviaturas, tabelas, lista de figuras, lista
de tabelas.

1. aditivos. 2. desempenho. 3. fitase. 4. protease. 5. carboidrases.
I. Barcellos Café, Marcos, orient. II. Título.

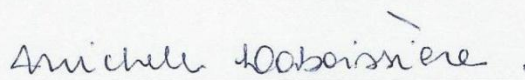
CDU 635

LINDOLFO DORCINO DOS SANTOS NETO

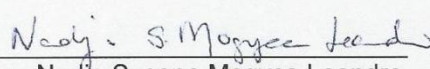
Dissertação defendida e aprovada em **17/03/2016**, pela Banca Examinadora constituída pelos professores:



Prof. Dr. Marcos Barcellos Café
Orientador (a)



Profa. Dra. Michele Laboissière – UEG - São Luis M. Belos/GO



Profa. Dra. Nadja Susana Mogyca Leandro

DEDICATÓRIA

Dedico á minha família, por sua capacidade de acreditar e investir em mim. Mãe, seu cuidado e dedicação foi que me deram em alguns momentos, a esperança para seguir. Pai, sua presença significou segurança e a certeza de que não estou sozinho nessa caminhada. Muito obrigado.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente á Deus, por ter me dado saúde e força para superar todas as adversidades enfrentadas ao longo do curso.

Aos meus pais Wison Santos e Guiomar Delfino Duarte pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

A minha namorada Kassia Silva Leonel de Paiva pelo apoio nos momentos mais difíceis e por sempre entender minhas ausências.

Ao Prof. Dr. Marcos Barcellos Café pela oportunidade e apoio não somente na elaboração deste trabalho, mas pelos inúmeros projetos creditados a minha pessoa como prova de confiança. A Prof^a Dr^a Michele Laboissiere pelo auxilio no projeto.

Ao Prof. Dr. Cirano José Ulhoa e a graduanda de Biologia Gabrielle Rosa Silva pela oportunidade e apoio na elaboração deste trabalho.

Aos alunos de mestrado e grupo de pesquisa, Genilson Bezerra Carvalho e Julyana Machado da Silva Martins, pela ajuda durante a condução da fase de campo do experimento e pelos momentos de descontração e alegria tanto nas horas de trabalho, bem como nos momentos de lazer.

Ao professor Edgar Oviedo e aos amigos que fiz na North Carolina State University, Albaraa Sarsour, Alex Cordova, Luis Bernal e Ricardo Fasanaro.

Aos alunos de graduação Marcella Fernandes, Billy Noronha, Rafael Faria , Caio Vinicius e Rafael Camargo pela ajuda durante a condução da fase de campo do experimento.

Aos meus amigos de longa data Jean Sardinha, Lorrany Bento e Sergio Espinosa pela amizade, convivência e curtições.

Aos funcionários do Aviário escola, Charles, Kelly e Felipe pela colaboração no decorrer do experimento e aprendizado adquirido.

A Universidade Federal de Goiás, ao seu corpo docente, direção e administração que oportunizaram a janela que hoje vislumbro um horizonte superior.

A São Salvador Alimentos[®], á Roberto Moraes Jardim Filho pela oportunidade e confiança em mim depositada na condução do experimento.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

“Paulo, quando envelheceu, sentado com seus cabelos brancos, tremendo de frio num calabouço em Roma, pôde dizer com a maior ênfase possível: "Eu sei em quem tenho crido", porque cada experiência tinha sido como a subida de um monte, cada provação tinha sido como subir outro cume, e sua morte parecia alcançar o alto da montanha, da qual ele podia descortinar tudo a respeito da fidelidade e do amor daquele a quem havia entregue sua alma”

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1 Utilização de enzimas na Avicultura de Corte.....	3
2.1.1 Historico da Utilização das Enzimas na Avicultura.....	3
2.1.2 Fatores que Afetam a Utilização de Enzimas na Avicultura de Corte.....	4
2.1.3 Formas de Suplementação das Enzimas.....	5
2.2 Tipos de Enzimas mais Utilizadas na Avicultura de Corte.....	5
2.2.1 Carboidrases.....	5
2.2.2 Proteases.....	6
2.2.3 Fitases.....	7
2.3 Utilização de Complexos Enzimáticos em Rações de Frangos de Corte.....	8
2.4 Selecionando Enzimas para Utilização em Complexos Enzimáticos.....	9
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
3.1 Experimento 1 – Desempenho e Rendimento de frangos e corte suplementados com diferentes complexos enzimáticos.....	11
3.1.1 Localização, Instalações e Manejo experimental.....	11
3.1.2 Delineamento experimental.....	13
3.1.3 Tratamentos e composições das rações.....	13
3.1.4 Variáveis analisadas e análise estatística.....	16
3.2 Experimento 2 – Metabolizabilidade dos nutrientes em frangos de corte suplementados com diferentes complexos enzimáticos.....	18
3.2.1 Localização, Instalações e Manejo experimental.....	18
3.2.2 Delineamento experimental.....	19
3.2.3 Tratamentos e composições das rações.....	19
3.2.4 Variáveis analisadas e análise estatística.....	20
3.3 Experimento 3 – Ensaio <i>In Vitro</i> – Realização de diferentes ensaios enzimáticos nos complexos enzimáticos e enzimas utilizadas nos experimentos <i>In Vivo</i>	22
3.3.1 Tratamentos utilizados.....	22
3.3.2 Variáveis analisadas e análise estatística.....	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	28
4.1 Experimento 1 – Desempenho e Rendimento de frangos e corte suplementados	

com diferentes complexos enzimáticos.....	28
4.1.1 Experimento 1 – Desempenho de frangos e corte suplementados com diferentes complexos enzimáticos.....	28
4.1.2 Experimento 1 – Rendimento de frangos e corte suplementados com diferentes complexos enzimáticos.....	35
4.2 Experimento 2 – Metabolizabilidade dos nutrientes em frangos de corte suplementados com diferentes complexos enzimáticos.....	37
4.3 Experimento 3 – Ensaio <i>In Vitro</i> – Realização de diferentes ensaios enzimáticos nos complexos enzimáticos e enzimas utilizadas nos experimentos <i>In Vivo</i>	38
4.3.1 Determinação de proteína total das amostras.....	38
4.3.2 Determinação de açúcar redutor.....	39
4.3.3 Determinação da atividade de β -1,3-glucanase.....	40
4.3.4 Determinação de Xilanase.....	41
4.3.5 Determinação de CMCase.....	42
4.3.6 Determinação de FPase.....	42
4.3.7 Determinação de Amilase.....	43
4.3.8 Determinação de Pectinase.....	44
4.3.9 Determinação de Fosfatase ácida.....	45
4.3.10 Determinação de Protease.....	46
4.3.11 Eletroforese desnaturante –SDS-PAGE (10%).....	48
5. CONCLUSÃO.....	50
6. REFERÊNCIAS.....	51

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Exemplo de unidade experimental utilizada (Box D4).	13
FIGURA 2- Galpão utilizado no experimento 2..	19
FIGURA 3- Eletroforese desnaturante realizada sobre as amostras dos produtos.....	49

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- Efeito da adição de complexos enzimáticos em rações para frangos de corte.....	9
TABELA 2- Temperaturas (°C) registradas durante o experimento 1 – Desempenho e Rendimento de carcaça de frangos suplementados com diferentes complexos enzimáticos.....	14
TABELA 3- Composição percentual e níveis nutricionais calculados das rações experimentais em cada tratamento.....	16
TABELA 4- Inclusão de cada complexo e enzima de acordo com o tipo de ração	17
TABELA 5- Temperatura (°C) registrada durante o experimento 2 – Metabolizabilidade dos nutrientes em frangos de corte suplementados com diferentes complexos enzimáticos.....	20
TABELA 6- Desempenho de frangos de corte de 1 a 7 dias suplementados com diferentes complexos enzimáticos ¹	29
TABELA 7- Desempenho de frangos de corte de 1 a 14 dias alimentados com as rações experimentais	30
TABELA 8- Desempenho de frangos de corte de 1 a 21 dias alimentados com as rações experimentais.....	31
TABELA 9- Desempenho de frangos de corte de 1 a 28 dias alimentados com as rações experimentais.....	32
TABELA 10- Desempenho de frangos de corte de 1 a 35 dias alimentados com as rações experimentais.....	33
TABELA 11- Desempenho de frangos de corte de 1 a 42 dias alimentados com as rações experimentais.....	34
TABELA 12- Peso dos cortes em frangos alimentados com as diferentes rações experimentais aos 42 dias.....	35
TABELA 13- Valores médio de rendimento de carcaça s/pés, cabeça e pescoço (RA) rendimento de asa (RA) rendimento de peito (RPE) rendimento de coxa +	

sobrecoxa (RCS) e rendimento de gordura abdominal (RG) de frangos de corte aos 42 dias de idade.....	36
TABELA 14- Coeficiente de metabolizabilidade da matéria seca (CMMS), do nitrogênio (CMN), do extrato etéreo (CMEE), energia metabolizável aparente corrigida pelo balanço de nitrogênio (CMEMAN) e o balanço de nitrogênio (BN).....	38
TABELA 15- Atividade de proteína total nos complexos e enzimas utilizadas nos experimentos <i>In Vivo</i>	38
TABELA 16- Atividade de açúcar redutor nos complexos e enzimas utilizadas nos experimentos <i>In Vivo</i>	39
TABELA 17- Atividade de β -glucanase das amostras de complexos e enzimas utilizadas nos experimentos <i>In Vivo</i>	40
TABELA 18- Atividade de Xilanase das amostras de complexos e enzimas utilizadas nos experimentos <i>In Vivo</i>	41
TABELA 19- Atividade de CMCase das amostras de complexos e enzimas utilizadas nos experimentos <i>In Vivo</i>	42
TABELA 20- Atividade de FPase nas amostras dos complexos e enzimas utilizadas nos experimentos <i>In Vivo</i>	43
TABELA 21- Atividade de Amilase nas amostras dos complexos e enzimas utilizadas nos experimentos <i>In Vivo</i>	44
TABELA 22- Atividade de Pectinase nas amostras dos complexos e enzimas utilizadas nos experimentos <i>In Vivo</i>	45
TABELA 23- Atividade de Fosfatase nas amostras dos complexos e enzimas utilizadas nos experimentos <i>In Vivo</i>	46
TABELA 24- Atividade de Protease nas amostras dos complexos e enzimas utilizadas nos experimentos <i>In Vivo</i>	47

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - Principais microrganismos utilizados na produção de enzimas.....	10
QUADRO 2 - Tratamentos experimentais utilizados no experimento 1 - Desempenho e Rendimento de carcaça de frangos suplementados com diferentes complexos enzimáticos....	13
QUADRO 3 - Microrganismos e níveis de garantia de cada produto utilizado.....	14
QUADRO 4 - Tratamentos experimentais utilizados no experimento 2 - Metabolizabilidade dos nutrientes em frangos de corte suplementados com diferentes complexos enzimáticos....	20
QUADRO 5 - Tratamentos experimentais utilizados no experimento 3 - Realização de diferentes ensaios enzimáticos nos complexos e enzimas utilizadas nos experimentos <i>In Vivo</i>	22

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

PNA's – Polissacarídeos não amiláceos

Phy – Fitase

Pro – Protease

Cho – Carbohidrases

Ami – Amilase

Xly – Xilanase

Cel – Celulase

α – gal – Alpagalactosidade

PhyB – 6-Fitase (5000 U/g);

PhyC – 3-Fitase (10.000 FTU/g);

PhyD 6-Fitase (5000 U/g);

CV – Coeficiente de variação;

CMMS – Coeficiente de metabolizabilidade da matéria seca;

CMN - Coeficiente de metabolizabilidade do nitrogênio;

CMEE - Coeficiente de metabolizabilidade do extrato etéreo;

EMAn – Energia metabolizável aparente corrigida para nitrogênio;

BN – Balanço de nitrogênio;

AR – Açúcar redutor

KDa - Kilodalton

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a combinação de diferentes complexos enzimáticos disponíveis no mercado sobre o desempenho animal, digestibilidade dos nutrientes de ração à base de milho e soja e sobre às características bioquímicas destes complexos. Foram realizados três experimentos, no primeiro foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado com 7 tratamentos e 6 repetições, sendo 30 aves por repetição, um total de 1260 aves com um dia de idade. Os tratamentos utilizados foram, tratamento 1: Dieta basal ou tratamento controle; tratamento 2: Dieta Basal com adição de Complexo A (fitase, protease, xilanase, β -glucanase, celulase, amilase, pectinase) + Complexo B (protease e celulase); tratamento 3: Dieta Basal com adição de Complexo A + Complexo B + Enzima A (α -galactosidase); tratamento 4: Dieta Basal com adição de Complexo A + α -galactosidase; tratamento 5: Dieta Basal com adição de Complexo C (xilanase, amilase, protease) + Fitase B e α -galactosidase; tratamento 6: Dieta Basal com adição de Complexo C + Fitase C + α -galactosidase; tratamento 7: Dieta Basal com adição de Complexo C + Fitase D + α -galactosidase. Foram avaliadas as características de desempenho e rendimento de carcaça e a análise estatística foi realizada pelo software R utilizando o teste de Tukey á 5% de probabilidade. Observou-se melhoria no peso médio final, ganho de peso e conversão alimentar ($p < 0,05$) aos sete dias de idade para as aves dos tratamentos 3 e 5 em relação as aves dos demais grupos e para o peso médio final e ganho de peso aos 14 dias de idade. Não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) nas demais fases entre os grupos e também no rendimento de carcaça e cortes realizados em 2 aves de cada unidade experimental aos 42 dias de idade. O segundo experimento utilizou 112 aves com 25 dias de idade, sendo realizado a coleta total de excreta dos 28 aos 32 dias de idade. Foi utilizado os mesmos tratamentos do primeiro experimento. Foram realizadas análise de nitrogênio, extrato etéreo, energia bruta e matéria seca. A partir desses dados foi realizada a análise estatística pelo software R utilizando o teste de Tukey á 5% de probabilidade. Não foram observadas diferenças significativa ($p > 0,05$) para o CMMS, CMN, EMAN, BN com a inclusão de complexos enzimáticos, já para o CMEE houve diferenças significativa ($p < 0,05$), demonstrando os tratamentos 2 e 4 com maior eficiência em metabolizar extrato etéreo. O terceiro experimento analisou as amostras de cada produto utilizado nos experimentos *In Vivo*, foram realizados uma série de ensaios enzimáticos. A partir desses dados foi realizada a análise estatística pelo software R utilizando o teste de Tukey á 5% de probabilidade. Observou-se diferenças significativas ($p < 0,05$) para o teste de proteína total, açúcar redutor e os ensaios de β -1,3-glucanase, xilanase, CMCase, FPase, amilase, pectinase, fosfatase acida e protease. Os complexos A, B, C e a enzima A demonstram na maioria desses ensaios descritos as maiores atividade enzimáticas e específicas, resultados esses que podem ser relacionados aos resultados de desempenho encontrados nos 1 aos 7 e 1 aos 14 dias.

Palavras-Chave: aditivos, desempenho, fitase, protease, carboidrases.

ABSTRACT

The objective of study was to evaluate the combination of different enzyme complexes on animal performance, digestibility nutrient based on corn and soybean meal and on the biochemical characteristics of these complexes. The first experiment was used randomized design with 7 treatments and 6 replicates, 30 birds per repetition, a total of 1,260 birds a day old. The treatments were treatment 1: Basal diet; Treatment 2: Basal diet with addition of complex A (phytase, protease, xylanase, beta-glucanase, cellulase, amylase, pectinase) + B complex (protease and cellulase); Treatment 3: Basal diet with addition of complex A + complex B + enzyme (α -galactosidase); Treatment 4: Basal diet with addition of complex A + α -galactosidase; Treatment 5: Basal diet with addition of complex C (xylanase, amylase, protease) + Phytase B and α -galactosidase; Treatment 6: Basal diet with addition of complex C + Phytase C + α -galactosidase; Treatment 7: Basal diet with addition of complex C + Phytase D + α -galactosidase. The performance characteristics and carcass yield and statistical analysis were evaluated with the R software using the Tukey test at 5% probability. The treatments 3 and 5 improvement in the average final weight, weight gain and feed conversion ($p < 0.05$) at seven days of age and the average final weight and gain weight at 14 days of age. There were no significant differences ($p > 0.05$) in the other stages between the groups and the carcass yield and cuts made in two birds from each experimental unit at 42 days old. The second experiment used 112 birds with 25 days of age, being held the total collection of excreta from 28 to 32 days old. It used the same treatments in the first experiment. Nitrogen analysis was performed, ether extract, crude energy and dry matter. From these data was performed to analyze statistically the R software using the Tukey test at 5% probability. No significant differences were observed ($p > 0.05$) for the CMMS, CMN, EMAN, BN with the inclusion of enzyme complexes, as for CMEE significant differences ($p < 0.05$), demonstrating the treatments 2 and 4 with greater efficiency in metabolizing ether extract. The third experiment analyzed the samples of each product used in *In Vivo* experiments were carried out a number of enzymatic assays. These data was performed to analyze statistically the R software using the Tukey test at 5% probability. There were statistically significant differences ($p < 0.05$) for the total protein assay, reducing sugar and β -1,3-glucanase assays, xylanase, CMCase, FPase, amylase, pectinase, acid phosphatase and protease. The complexes A, B, C and the enzyme α – gal shown in most of these assays described the specific and higher enzymatic activity, these results that can be related to the performance results found in the 1 at 7 and 1 at 14 days.

Key-words: additives, performance, phytase, protease, carbohydrases.

1. INTRODUÇÃO

A produção de frangos de corte é extremamente dinâmica, devido a diversos avanços tecnológicos na área de melhoramento genético, nutrição, ambiência, sanidade e manejo. Nesse aspecto, o Brasil apresenta grande expressão no cenário mundial da cadeia avícola, sendo o maior exportador mundial de carne de frango e o segundo maior produtor, atrás apenas dos Estados Unidos¹.

Esses avanços tecnológicos têm seus alicerces no sistema de integração vertical, onde a iniciativa privada foi primordial para implantação deste, tendo como objetivo a redução de custos de produção, possibilidade de acompanhamento da qualidade do produto e fomento à produção de grande escala².

Especificamente, na área de nutrição avícola, a cadeia avícola utiliza de recursos tecnológicos variados para o constante lançamento de novos produtos. Dentre esses produtos, a utilização de enzimas, tal como amilase, protease, xilanase e fitase formando um complexo enzimático é amplamente aceita e embasada cientificamente, pois podem-se observar melhorias no desempenho, digestibilidade de nutrientes e saúde intestinal^{3,4,5,6}.

As enzimas são proteínas sensíveis a condições físico-químicas que tem a capacidade de se ligar a um substrato e permanecer ativa por períodos longos, sendo geralmente utilizadas na avicultura com a finalidade de complementar as enzimas endógenas ou prover enzimas exógenas que o organismo não sintetiza^{7,8}. As enzimas exógenas podem ser obtidas de vegetais, animais e micro-organismos, porém a produção em larga escala é feita industrialmente em laboratórios especializados, utilizando técnicas de fermentação fúngica ou bacteriana⁹.

Pelo fato do custo de produção da ração na avicultura ser elevado, variando entre 60 a 75% do custo total de produção de frangos de corte^{10,11}, a utilização de enzimas exógenas se faz cada vez mais presente, já que a sua ação sobre os alimentos pode aumentar a digestibilidade e utilização dos nutrientes, agindo diretamente em vários substratos, como nos polissacarídeos não amiláceos (PNA's), componentes esses não digeríveis para organismo das aves¹².

Além de entender o mecanismo de ação das enzimas é necessário compreender quais características bioquímicas as afetam. De acordo com Marquardt & Bedford¹³

as características nas enzimas exógenas são: atividade altamente específica, resistência à inativação pelo calor, baixo pH, segurança toxicológica, baixo custo de produção, boa vida de prateleira, ausência de interações com a matriz do alimento e especificidade em promover os efeitos esperados.

Visto isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a combinação de diferentes complexos enzimáticos disponíveis no mercado sobre o desempenho animal, digestibilidade dos nutrientes de ração à base de milho e soja e sobre às características bioquímicas destes complexos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Utilização de Enzimas na Avicultura de Corte

2.1.1 Histórico da Utilização de Enzimas na Avicultura

Desde 1857, ano que em Louis Pasteur percebeu haver uma relação entre fermentação e atividade biológica das leveduras, que as enzimas estão sendo estudadas¹⁴. Porém a denominação “enzima” surge em 1978, criado pelo pesquisador Friedrich Wilhelm Kuhne, tendo o significado de “dentro da levedura”¹⁵.

A grande expansão de pesquisas deste tema aconteceu na década de 1940, pelo fato da grande necessidade de criação de antibióticos na II Guerra Mundial, a partir desse advento começava a ser estudada também a utilização na produção animal¹⁴.

Na avicultura, uma das primeiras informações sobre a utilização de enzimas em rações é da década de 1950, a partir da descoberta de que grãos umedecidos quando suplementados com enzimas tinham um melhor aproveitamento nutricional pelas aves¹⁵. Na mesma década, a Universidade Estadual de Washington nos Estados Unidos verificou que a utilização de cereais como trigo, centeio, triticale, cevada e aveia causavam excesso de umidade na cama, consequentemente queda de desempenho das aves^{14,16}. Com essa observação deu-se início ao estudo da utilização de enzimas endógenas em rações contendo esses grãos que apresentam alta quantidade de polissacarídeos não amiláceos – PNAs¹⁶.

Na década de 1960, a Europa consolidou o estudo de enzimas, devido a grande utilização desses cereais na alimentação de animais monogástricos. Assim, foi possível descobrir que os ingredientes de origem vegetal possuíam diferentes compostos que se complexam e podem interferir na digestão, absorção e utilização dos nutrientes¹⁷.

Já no Brasil, o uso de enzimas iniciou-se devido ao custo elevado das fontes de fósforo e a viabilidade econômica da enzima fitase, posteriormente outras enzimas, como proteases e carboidrases começaram a ser estudadas, visando melhorar o aproveitamento dos nutrientes e a eficiência nutricional da ração com objetivo de reduzir o custo de produção¹⁸. Sendo estas classificadas pela Instrução Normativa

número 13 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento como aditivos zootécnicos digestivos, pertencendo ao grupo dos aditivos zootécnicos digestivos¹⁹.

2.1.2 Fatores que Afetam a Utilização de Enzimas na Avicultura de Corte

De acordo com Sakomura *et al*²⁰ o uso de enzimas na nutrição de frangos de corte é amplamente aceita e embasada cientificamente, devido ao fato de que dependendo do tipo de enzima adicionada na dieta podem-se observar melhorias no desempenho, digestibilidade dos nutrientes, melhoria na morfometria intestinal, na saúde e imunidade das aves, além da redução na excreção de nutrientes, assumindo assim um papel minimizador de impacto ambiental. Porém é comum encontrar trabalhos onde a utilização de enzimas não houve efeito sobre as variáveis de produção, podendo esses resultados serem decorrentes de uma série de fatores.

Um dos fatores mais importantes e que já é uma regra na nutrição avícola é de que o conhecimento do substrato de atuação das enzimas é o fator chave para garantir uma maior eficiência na atuação destas, sendo assim a utilização das enzimas deve ser direcionada em fases onde realmente haja o substrato específico para a sua atuação²¹.

Outro fator primordial e que deve ser considerado em relação à ação catalítica das enzimas é que esta depende de vários fatores, como: concentrações do substrato e da enzima, temperatura, variação do pH, umidade e presença de co-enzimas, resistência à atividade proteolítica e inibidores no local em que ocorrerá a reação²². Quando a enzima não é protegida, principalmente para temperatura e pH, poderá ter seu uso limitado, pois ocorrerá alteração significativa da enzima ativa, resultando em perda de atividade²⁰.

A termoestabilidade da enzima é outro fator que afeta sua ação catalítica, sendo menos resistentes as enzimas produzidas por fungos (até 75 °C) e mais resistentes (80 a 90 °C) as produzidas por bactérias²³. Sakomura *et al*²⁰ enfatiza que atualmente alguns fungos e bactérias melhorados já estão produzindo enzimas com maior termotolerância.

O tipo de ingrediente utilizado na dieta pode afetar também a utilização de enzimas, pois alguns alimentos podem apresentar fatores antinutritivos que variam

de acordo com as condições de produção da planta, colheita, secagem e armazenamento e também o fato das variações na quantidade de substrato²⁴.

A adição de enzimas em dietas de animais jovens pode promover melhoria no desempenho dos nutrientes, pois esses animais ainda estão com o trato digestório imaturo e com produção de enzimas endógenas em quantidades insuficientes, sendo assim a idade outro fator que interfere na utilização de enzimas²⁵.

Alguns fatores secundários também devem ser levados em conta, como a relação do nutriente na dieta, estado sanitário dos animais, temperatura ambiental, balanço eletrolítico, manejo, forma física e processamento térmico da ração, podendo afetar o consumo de ração e consequentemente a quantidade de nutrientes ingeridos que poderá favorecer ou não a ação das enzimas²⁶. A parte disso Sakomura *et al*²⁰ relata que é comum encontrar trabalhos onde a utilização das enzimas teve efeito positivo sobre a digestibilidade de nutrientes e não observar melhoria no desempenho ou vice-versa.

2.1.3 Formas de suplementação das enzimas

No contexto de formulação da ração, existem duas abordagens que são utilizadas, a primeira caracterizada como “*on top*”, onde consiste em suplementar com enzimas uma formulação padrão, não alterando os níveis nutricionais, tendo o objetivo de melhorar o desempenho. A segunda alternativa é a redução dos níveis nutricionais da ração, adicionando enzimas exógenas com o intuito de restaurar o valor nutricional da dieta padrão, objetivando o mesmo desempenho de uma dieta com níveis nutricionais normais, porém de forma mais econômica²⁷.

2.2 Tipos de Enzimas mais Utilizadas em Rações de Frangos de Corte

2.2.1 Carboidrases

Este grupo de enzimas é responsável pela hidrólise dos carboidratos, tendo como finalidade melhorar o aproveitamento da energia dos ingredientes nas rações avícolas, sendo compreendidas pelas amilases, pectinases, β -glucanases, α -galactosidade, xilanases e celulasas²⁸.

De acordo com Ott²⁹ a maioria das enzimas utilizadas na nutrição animal são do tipo carboidrases, específicas para PNA's, sendo estes classificados em solúveis e insolúveis. Sens³⁰ detalha que as propriedades antinutricionais dos PNA's estão principalmente nos PNA's solúveis e que estes em especial, são capazes de se ligarem a uma grande quantidade de água, aumentando a viscosidade do fluído e interferindo assim na difusão dos nutrientes e das enzimas digestivas e suas interações com a mucosa intestinal.

O aumento da viscosidade do fluído ou quimo intestinal causa prejuízos ao desempenho produtivo, pelo fator de diminuir a velocidade de passagem dos alimentos ao longo do trato digestivo³¹.

Apesar de milho e farelo de soja serem considerados ingredientes de fácil digestão, pode-se melhorar o seu valor nutricional com a utilização de carboidrases³². O milho contém quantidades insignificantes de PNA's solúveis, entretanto, possui cerca de 8% de PNA's insolúveis e o farelo de soja contém cerca de 3% de PNA's solúveis e 16% de insolúveis³³.

Os efeitos benéficos da suplementação de carboidrases nas dietas dos animais são amplamente reconhecidos como: diminuir a viscosidade da digesta, aumentar a digestibilidade dos nutrientes, melhorar a energia metabolizável e reduzir o custo da alimentação dos animais e conseqüentemente melhorar os parâmetros zootécnicos de produção^{7,34}.

2.2.2 Proteases

A proteína é o ingrediente que mais onera o custo das rações e nos últimos anos o farelo de soja, um dos principais ingredientes proteicos das rações de frangos de corte tem aumentado o seu custo, o que força a indústria avícola a buscar maneiras de aperfeiçoar seu valor nutricional³⁴.

Segundo Leite *et al*³⁵ as proteínas dietéticas não são utilizadas completamente pelas aves, com isso a inclusão de proteases na dieta pode melhorar o valor nutricional através da hidrólise de certos tipos de proteínas que resistem ao processo digestivo através da complementação das enzimas digestivas das próprias aves. Além disso, a adição de proteases exógenas pode inativar fatores anti-nutritivos, tais

como lectinas, proteínas antigênicas e inibidores de tripsina, presentes particularmente em leguminosas³⁶.

Conforme Wang *et al*³⁷ as proteases são recomendadas para a adição às dietas de frangos de corte, pois melhora o desempenho e rendimento de carcaça, sendo seus efeitos mais pronunciados quando as dietas são formuladas com baixo níveis de aminoácidos essenciais ou de proteína total, de forma a minimizar as excreções de nitrogênio.

Freitas³⁸ relata melhoria da conversão alimentar de frangos dos 1 aos 21 dias de idade suplementados com protease. Matias³⁹ verificou melhora no ganho de peso e fator de produção de frangos de corte de 1 a 38 dias de idade suplementados com protease.

Oxenboll *et al*⁴⁰ estudando os benefícios da utilização de proteases em frangos relata que esse tipo de enzima apresenta não só o benefícios no desempenho animal, mas também ao ambiente, pois diminui a excreção de nitrogênio.

2.2.3 Fitases

As aves não sintetizam ou produzem quantidades necessárias de certas enzimas endógenas, utilizadas para a digestão de vários componentes químicos encontrados nos alimentos de origem vegetal ou para atuarem em alguns processos antinutricionais, como o fósforo fítico⁴¹.

Segundo Costa *et al*⁴² a maior preocupação é com o fósforo dos ingredientes vegetais, que por estar ligado ao ácido fítico na forma de fitato é pouco disponível aos animais monogástricos, pois não dispõem em quantidades suficientes da enzima fitase para aproveitá-lo, sendo somente um terço do fósforo total deste alimento disponível para as aves. De acordo com Brandão *et al*⁴³ o fósforo é considerado um dos minerais mais importantes, pelo fato de ser necessário para uma ótima taxa de crescimento e para a mineralização óssea, porém também é considerado o mineral que mais onera o custo das rações.

Devido a isso, a fitase é uma alternativa econômica para melhorar a disponibilidade do fósforo fítico, pelo fato de catalisar o fitato, disponibilizando fósforo e outros elementos que estavam indisponíveis, como cálcio, magnésio,

zinco, ferro e moléculas orgânicas, como aminoácidos, além de reduzir o potencial poluidor das excretas³⁴.

De acordo com Meneghetti *et al*⁴¹ entre as enzimas exógenas produzidas industrialmente, a fitase é a que mais se destaca, pelo fato do seu custo benefício e do aumento dos custos dos ingredientes e da fabricação das rações, além do caráter de poluição ambiental.

Lacerda⁴⁴ estudando o desempenho de frangos de corte suplementados com fitase relata que a adição da enzima nas rações para as fases pré-inicial (1 a 7 dias de idade) e inicial (8 a 21 dias de idade) apresentaram resultados superiores para desempenho em relação às rações sem enzima. Costa *et al*⁴² também relatam desempenho superior em frangos suplementados com fitase em relação a não suplementadas nas mesmas fases descritas anteriormente, reduzindo a conversão alimentar em 8,81% e aumentando o ganho de peso em 1,8%.

2.3 Utilização de Complexos Enzimáticos em Rações de Frangos de Corte

Inúmeras pesquisas têm demonstrando que a associação de diferentes tipos de enzimas promove melhores resultados de desempenho, pelo fato de atuarem de forma conjunta e sinérgica, fazendo com que algumas enzimas degradem componentes dos alimentos que sofrerão posteriormente a ação de outras enzimas associadas a este complexo enzimático ou até das enzimas endógenas²⁰.

De acordo com Francesch & Geraert⁴⁵ a maioria dos complexos enzimáticos utiliza carboidrases e uma fonte de fitase. A fitase é incluída por que as glicosidades (xilanase, β -glucanase, α -galactosidade) presentes na maioria dos complexos são capazes de degradar a camada de PNA's da membrana que encapsula os nutrientes, facilitando o acesso da fitase ao fitato armazenado na membrana da parede celular e assim, atuar sinergicamente com as outras enzimas. A Tabela 1 demonstra alguns estudos realizados com complexos enzimáticos.

TABELA 1 - Efeito da adição de complexos enzimáticos em rações para frangos de corte

Fase	Complexo	Dieta	Variável	Efeito (%)	Fonte
1 a 21 d	Xilanase, Amilase, Protease	Milho + Farelo de Soja + Farinha de Carne	Conversão Alimentar	-2,11	Carvalho <i>et al.</i> (2009)
43 d	Xilanase, Amilase, Protease, Fitase	Milho + Farelo de Soja	Conversão Alimentar	-4,21	BARBOSA <i>et al.</i> (2008)
1 a 42 d	Xilanase, Amilase, Protease	Milho + Farelo de Soja + Soja Integral Extrusada + Soja Integral Tostada	Ganho de Peso	+1,88	Zanella <i>et al.</i> (1999)
7 a 14d	Xilanase, Amilase, Protease, Fitase	Milho	Energia Metabolizável Aparente	+2,11	Dourado <i>et al.</i> (2009)

Fonte: Adaptado de SAKOMURA *et al.*²⁰.

Café *et al.*⁴⁶ estudando dietas à base de milho e farelo de soja para frangos de corte, suplementadas com complexo multienzimático contendo xilanase, protease e amilase, observaram melhorarias no seu conteúdo energético, na digestibilidade da proteína bruta, do amido e da gordura.

Leite *et al.*⁴⁷ estudando a utilização de um complexo enzimático que continha amilase, pectinase, β -glucanase, pentosanase, celulase, protease e fitase em rações com sorgo e em rações com milho constatou que o tipo de alimento também tem influência na ação destes complexos, relatando que o complexo estudado melhorou a digestibilidade dos nutrientes na ração composta por milho e a conversão alimentar na fase inicial dos frangos que receberam esse tipo de ração, porém não houve nenhuma característica melhorada na ração composta por milho.

2.4 Selecionando Enzimas para Utilização em Complexos Enzimáticos.

Comercialmente, a produção de enzimas é feita a partir leveduras, fungos ou bactérias, sendo de origem animal ou vegetal e entre os microrganismos mais utilizados são os dos gêneros *Aspergillus sp.*, *Trichoderma sp.* e *Bacillus sp.*⁴⁸. O Quadro 1 demonstra os tipos de enzimas e seus principais microrganismos.

QUADRO 1 - Principais microrganismos utilizados na produção de enzimas;

Microrganismos	Enzimas produzidas
<i>Aspergillus niger</i>	β -glucanase, α -amilase, celulase, fitase
<i>Aspergillus ficcum</i>	fitase
<i>Aspergillus oryzae</i>	α -amilase, protease, fitase
<i>Bacillus licheniformis</i>	α -amilase
<i>Bacillus subtilis</i>	α -amilase, protease, β -glucanase, fitase
<i>Trichoderma ciridar</i>	xilanase, β -glucanase, celulase
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	fitase

Fonte: Adaptado de Mascarell & Ryan⁴⁸ e Singh⁴⁹

De acordo Colombatto *et al*⁵⁰ a caracterização completa das atividades enzimáticas deverá ser o primeiro passo na seleção de um produto enzimático, pois as propriedades bioquímicas das enzimas, muitas vezes, não determinadas ou mal avaliadas, podem afetar a natureza das respostas, sendo assim, a análise dessas atividades deve ser conduzida sob condições definidas de tempo, temperatura, concentração e tipo de enzima e substrato, pH, entre outros, pois todos esses fatores afetam a atividade das enzimas.

Kung⁵¹ defende que a homogeneidade dos produtos deverá também ser analisada, pois, os complexos enzimáticos comerciais são constituídos de um conjunto de atividades enzimáticas que deverão trabalhar em combinação para hidrolisar um substrato. Portanto, a proporção correta de cada atividade em relação ao substrato deverá se analisada para otimizar seu efeito no alimento.

Deve ser averiguado se as enzimas se enquadram dentro dos perfis de exigências necessários para sua utilização na suplementação de dietas fornecidas a monogástricos, tais como, níveis de atividade elevados, estabilidade nas condições de pH e de temperatura do trato gastrointestinal, termoestabilidade para resistir ao processamento do alimento, principalmente durante o processo de granulação⁵²

De acordo com Marques⁵³ os complexos multienzimáticos para rações de frangos de corte comercializados no Brasil em sua maioria são misturas de enzimas originárias de diferentes microrganismos e não se conhece muito bem a interrelação destas enzimas e sua atuação no organismo dos animais, o que, muitas vezes, promove respostas inconsistentes. Estudos sobre efeitos e mecanismos de ação de

complexos enzimáticos tornam-se muito importantes para o desenvolvimento e utilização comercial destes produtos em frangos de corte.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Experimento 1 – Desempenho e Rendimento de carcaça de frangos de corte suplementados com diferentes complexos enzimáticos.

3.1.1 Localização, Instalações e Manejo experimental.

O experimento foi conduzido no Aviário Escola da Universidade Federal de Goiás em Goiânia – GO. Foram alojados 1260 pintos de corte com 1 dia de idade da linhagem Cobb 500, provenientes de incubatório comercial da empresa avícola São Salvador Alimentos/Super Frango em Itaberaí – GO. As aves foram alojadas em 42 Boxes individuais medindo 1,80 x 1,60 (2,88m²), montados na área central em um galpão de industrial com 12m L x 125m C (1500m²), galpão do tipo pressão negativa com sete exaustores, sistema de nebulização e entrada de ar com placa evaporativa. As muretas laterais de alvenaria de 0,40 m e tela de arame de 2,80 m de altura, pé direito de 3,20 m e orientação leste-oeste. A densidade de alojamento em cada boxe foi de 12 aves/m² (30 aves/Box).

Cada boxe continha uma linha de bebedouro tipo nipple (10 nipples/Box) e um comedouro tubular infantil até o sétimo dia de idade e um adulto a partir do oitavo aos 42 dias de idade. Sendo a relação de comedouro e bebedouros por número de aves de 1:30 e 1:3, respectivamente como é demonstrado na figura 1.

Ressalta-se que, embora não tenham sido objetos de estudo na presente pesquisa, os padrões normais de comportamento das aves foram manifestados, não houve canibalismo, as aves não adoeceram, a plumagem manteve a sua integridade.



FIGURA 1 - Exemplo de unidade experimental utilizada (Box D4).

As aves foram vacinas no incubatório contra Marek e aos 15 dias de idade foi ministrada a vacina contra Gumbouro na água de bebida. O programa de luz adotado foi contínuo com 12 horas de iluminação natural e de seis a 12 horas de iluminação artificial por dia, durante o período experimental. A iluminação artificial foi feita por lâmpadas incandescentes de 100W espalhadas no galpão, buscando o fornecimento de 22 lúmens/m².

O controle da temperatura ambiente foi realizado com manejo de cortinas, sendo associado a nebulizadores, placa evaporativa e aos exaustores no galpão. A média de temperatura mínima foi de 24°C e a máxima de 31°C monitorada diariamente com dois termômetros no centro do galpão (Tabela 2). O aquecimento interno do galpão na fase inicial foi realizado por aquecedor/campanula a óleo diesel automático e monitorado diariamente de acordo com a temperatura e umidade do galpão.

TABELA 2 - Temperaturas (°C) registradas durante o experimento 1 – Desempenho e Rendimento de carcaça de frangos suplementados com diferentes complexos enzimáticos.

Semanas	Minima	Máxima	Média
1 (1 a 7 dias)	29	33	31
2 (8 a 14 dias)	28	29	28,5
3 (15 a 21 dias)	27	29	28
4 (22 a 28 dias)	25	27	26
5 (29 a 35 dias)	25	26	25,5
6 (36 a 42 dias)	23	25	24

3.1.2 Delineamento experimental

Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC) com sete tratamentos, tendo seis repetições cada um dos tratamentos, tomando um total de 42 boxes, sendo cada unidade experimental composta por 30 aves.

3.1.3 Tratamentos e composições das rações

Os tratamentos (T) utilizados foram: T1: dieta basal seguindo as recomendações de Rostagno⁵⁴, T2: complexo A (fitase, protease, xilanase, β -glucanase, celulase, amilase, pectinase) + complexo B (protease e celulase) adicionadas “on top” na dieta basal; T3: complexo A + complexo B + enzima A (α -galactosidase) adicionadas “on top” na dieta basal; T4: complexo A + enzima A adicionadas “on top” na dieta basal; T5: complexo D (xilanase, amilase, protease) + enzima B (fitase) e enzima A adicionadas “on top” na dieta basal; T6: complexo D + enzima C (fitase) + enzima A adicionadas “on top” na dieta basal; T7: complexo D + enzima D (fitase) + enzima A adicionadas “on top” na dieta basal, que estão resumidos no Quadro 2.

QUADRO 2 - Tratamentos experimentais utilizados no experimento 1 - Desempenho e Rendimento de carcaça de frangos suplementados com diferentes complexos enzimáticos.

Tratamentos	Complexos enzimáticos
T1 (DB)	Dieta Basal
T2 (Phy+Pro+Cho/Pro+Cel)	Dieta Basal com adição de Complexo A (fitase, protease, xilanase, β -glucanase, celulase, amilase, pectinase) ¹ + Complexo B (protease e celulase) ²

QUADRO 2 - Tratamentos experimentais utilizados no experimento 1 - Desempenho e Rendimento de carcaça de frangos suplementados com diferentes complexos enzimáticos (continuação).

T3 (Phy+Pro+Cho/Pro+Cel/ α -gal)	Dieta Basal com adição de Complexo A + Complexo B + Enzima A (α -galactosidase) ³
T4 (Phy+Pro+Cho/ α -gal)	Dieta Basal com adição de Complexo A + α -galactosidase ³
T5 (Xly+Amy+Pro/PhyB/ α -gal)	Dieta Basal com adição de Complexo C (xilanase, amilase, protease) ⁴ + Fitase B ⁵ e α -galactosidase ³
T6 (Xly+Amy+Pro/PhyC/ α -gal)	Dieta Basal com adição de Complexo C + Fitase C ⁶ + α -galactosidase ³
T7 (Xly+Amy+Pro/PhyD/ α -gal)	Dieta Basal com adição de Complexo C + Fitase D ⁷ + α -galactosidase ³

Inclusão: ¹0,200/1000 kg de ração; ²0,500/1000 kg de ração; ³1,5/1000 kg de Far. Soja; ⁴0,100/1000 kg de ração; ⁵0,100/1000kg de ração; ⁶0,050/1000kg de ração; ⁷ 0,100/1000kg de ração.

Cada complexo ou enzima tinha sua particularidade, se tratando de microrganismos e níveis de garantia como é demonstrado no Quadro 3, abaixo.

QUADRO 3 - Microrganismos e níveis de garantia de cada produto utilizado.

Enzimas	Microrganismo	Níveis de garantia
ComplexoA (Phy+Pro+Cho)	<i>Aspergillus Níger</i> .	Pectinase (min) – 40000 U/g; Protease (min) – 700 U/g; Fitase (min) – 300 U/g; Betaglucanase (min) – 200 U/g; Xilanase (min) – 100 U/g; Celulase (min) – 40 U/g; Amilase (min) – 30 U/g
ComplexoB (Pro+Cel)	<i>Aspergillus Níger</i> ; <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Protease (min) – 7500 U/g; Celulase (min) - 45 U/g
ComplexoC (Xly+Amy+Pro)	<i>Bacillus subtilis</i> ; <i>Trichoderma reesei</i> ; <i>Bacillus licheniformis</i> .	Endo-1,4-beta-xilanase (min) – 20000 U/g; Subtilisin (protease) (min) – 40000 U/g; Alfa-amilase (min) – 2000 U/g
EnzimaA (α -gal)	<i>Aspergillus Níger</i>	α -galactosidase 30 U/g
Fitase B	<i>Pichia Pastoris</i> e <i>Trichoderma reesei</i> .	6-Fitase (mínimo) – 5000 U/g
Fitase C	<i>Aspergillus Níger</i>	3-Fitase (mínimo) 10.000 FTU/g
Fitase D	<i>Trichoderma reesei</i> .	6-Fitase (mínimo) – 5000 U/g

As aves receberam um programa alimentar de acordo com cada fase de criação: pré-inicial (1-7 d), inicial (8-21 d), crescimento (22-35 d) e final (36-42d). As rações foram formuladas á base de milho, farelo de soja e farinha de origem

animal de acordo com as recomendações de Rostagno *et al*⁵⁴ e as enzimas adicionadas ``on top``, como é demonstrado nas Tabelas 3 e 4.

TABELA 3 - Composição percentual e níveis nutricionais calculados das rações experimentais em cada tratamento.

INGREDIENTE	Ração Pré inicial	Ração Inicial	Ração Crescimento	Ração Final
Milho grão	56,10	60,50	64,30	71,74
Farelo de soja 46%	36,20	31,35	24,35	15,20
Farinha de Carne 42%	4,90	4,10	3,40	2,534
Farinha de Visceras	-	-	1,00	3,066
Farinha de Pena e Sangue	-	-	1,00	2,266
Óleo de vísceras	1,50	2,10	3,20	2,933
Metionina em pó 99%	0,364	0,327	0,300	0,279
Lisina Líquida 64%	0,307	0,300	0,398	0,540
Colina Líquida 75%	0,089	0,090	0,073	0,100
Suplemento Mineral ¹	0,10	0,135	0,632 ³	0,730 ³
Supl. Vitaminico ²	0,05	0,668	0,927	0,211
Aditivos	0,390	0,430	0,420	0,400
Total	100,00	100,00	100,00	100,00
Energia Metabolizavel Kcal/kg	2.980	3.080	3.150	3.300
Proteína Bruta (%)	23,89	21,74	18,60	17,40
Arginina digestível (%)	1,49	1,34	1,08	0,99
Lisina digestível (%)	1,33	1,20	1,03	0,94
Metionina digestível (%)	0,68	0,62	0,53	0,48
Metionina+Cistina digestível (%)	0,98	0,90	0,79	0,73
Treonina digestível (%)	0,85	0,78	0,67	0,62
Triptofano digestível (%)	0,26	0,23	0,17	0,16
Fósforo Disponível (%)	0,50	0,45	0,40	0,39
Cálcio (%)	1,00	0,93	0,82	0,76
Sódio	0,23	0,20	0,19	0,19

¹Enriquecimento de minerais por kg de ração: manganês 90 mg; zinco 75 mg; ferro 60 mg; cobre 9,75 mg; iodo 1,20mg; promotor de crescimento: neomicina;

²Enriquecimento por kg de ração: selênio 0,30mg, vitamina A 10.000 UI, vitamina D3 2.500 UI, vitamina E 25 mg, vitamina K3 2 mg, vitamina B1 2,50 mg, vitamina B2 6,50 mg, vitamina B6 3,50 mg, vitamina B12 18 mcg, ácido fólico 1,20 mg, ácido patotênico 15 mg, niacina 42 mg, biotina 80 mcg, etoxiquin 166 mg;

³Enriquecimento de minerais por kg de ração: manganês 75 mg; zinco 62,5 mg; ferro 50 mg; cobre 8,125 mg; iodo 1,00mg; promotor de crescimento: bacitracina; ³ 21,43% de ácido propiônico e 78,57% de formaldeído.

Como material inerte para completar a inclusão igualmente em todos os tratamentos foi utilizado o amido, como é apresentado na Tabela 4.

TABELA 4 – Inclusão de cada complexo e enzima de acordo com o tipo de ração.

INCLUSÃO DOS COMPLEXOS E ENZIMAS NA RAÇÃO PRÉ-INICAL							
Phy+Pro+Cho	-	0,020	0,020	0,020	-	-	-
Pro+Cel	-	0,050	0,050	-	-	-	-
Xly+Amy+Pro	-	-	-	-	0,010	0,010	0,010
α -gal	-	-	0,054	0,054	0,054	0,054	0,054
PhyB	-	-	-	-	0,010	-	-
PhyC	-	-	-	-	-	0,005	-
PhyD	-	-	-	-	-	-	0,010
Inerte (Amido)	0,124	0,054	-	0,050	0,050	0,055	0,050
TOTAL	0,124	0,124	0,124	0,124	0,124	0,124	0,124
INCLUSÃO DOS COMPLEXOS E ENZIMAS NA RAÇÃO INICAL							
Phy+Pro+Cho	-	0,020	0,020	0,020	-	-	-
Pro+Cel	-	0,050	0,050	-	-	-	-
Xly+Amy+Pro	-	-	-	-	0,010	0,010	0,010
α -gal	-	-	0,047	0,047	0,047	0,047	0,047
PhyB	-	-	-	-	0,010	-	-
PhyC	-	-	-	-	-	0,005	-
PhyD	-	-	-	-	-	-	0,010
Inerte (Amido)	0,117	0,047	-	0,050	0,050	0,055	0,050
TOTAL	0,117	0,117	0,117	0,117	0,117	0,117	0,117
INCLUSÃO DOS COMPLEXOS E ENZIMAS NA RAÇÃO CRESCIMENTO							
Phy+Pro+Cho	-	0,020	0,020	0,020	-	-	-
Pro+Cel	-	0,050	0,050	-	-	-	-
Xly+Amy+Pro	-	-	-	-	0,010	0,010	0,010
α -gal	-	-	0,036	0,036	0,036	0,036	0,036
PhyB	-	-	-	-	0,010	-	-
PhyC	-	-	-	-	-	0,005	-
PhyD	-	-	-	-	-	-	0,010
Inerte (Amido)	0,106	0,036	-	0,050	0,050	0,055	0,050
TOTAL	0,106	0,106	0,106	0,106	0,106	0,106	0,106
INCLUSÃO DOS COMPLEXOS E ENZIMAS NA RAÇÃO FINAL							
Phy+Pro+Cho	-	0,020	0,020	0,020	-	-	-
Pro+Cel	-	0,050	0,050	-	-	-	-
Xly+Amy+Pro	-	-	-	-	0,010	0,010	0,010
α -gal	-	-	0,023	0,023	0,023	0,023	0,023
PhyB	-	-	-	-	0,010	-	-
PhyC	-	-	-	-	-	0,005	-
PhyD	-	-	-	-	-	-	0,010
Inerte (Amido)	0,093	0,023	-	0,050	0,050	0,055	0,050
TOTAL	0,093	0,093	0,093	0,093	0,093	0,093	0,093

3.1.4 Variáveis analisadas e análise estatística

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, da Universidade Federal de Goiás em 10 de novembro de 2014, sob o número 097/2014. Durante a condução do experimento foram avaliados semanalmente os pesos das aves e das

rações fornecidas do 1º dia ao abate, sendo anotado o peso das aves mortas, mortalidade diária e calculados os índices do desempenho zootécnico das aves, seguidos abaixo:

- **Ganho de peso:** calculado pela diferença entre os pesos médios das aves obtidos pelas pesagens de todas as aves em cada idade;
- **Consumo de ração:** calculado pela diferença entre a quantidade de ração oferecida no início e as sobras ao final de cada fase e considerando o número de aves mortas no intervalo como critério para correção dos valores de consumo;
- **Conversão alimentar:** obtido pela relação entre o consumo de ração e o ganho de peso, corrigida pelo peso total das aves mortas;
- **Viabilidade:** calculada para as diferentes repetições pela subtração de 100 do percentual do valor da mortalidade encontrado;

Ao final do experimento (42 dias) foram separadas duas aves de cada parcela experimental, selecionadas considerando o peso corporal na faixa de até 5% acima ou até 5% abaixo do peso médio obtido por parcela, as quais foram abatidas após jejum de 8 horas, para fins de avaliação do rendimento de carcaça, peito, coxa e sobrecoxa, asas e gordura abdominal. O rendimento de carcaça eviscerada sem cabeça, pescoço e pés foi calculado em relação ao peso corporal antes do abate, sendo: $\%RC = (\text{peso carcaça} \times 100 / \text{peso vivo})$ e o rendimento das partes da carcaça, peito, coxa e sobrecoxa, asas e gordura abdominal em função do peso da carcaça: $\%RP = (\text{peso da parte} \times 100 / \text{peso carcaça})$. As medidas de carcaça foram tomadas com a cabeça e patas.

Os dados foram submetidos à análise estatística utilizando-se o software R⁵ e as comparações entre os tratamentos foram efetuadas de acordo com teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.2 Experimento 2 - Metabolizabilidade dos nutrientes em frangos de corte suplementados com diferentes complexos enzimáticos.

3.2.1 Localização, Instalações e Manejo experimental.

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, da Universidade Federal de Goiás em 10 de novembro de 2014, sob o número 097/2014. Este experimento foi conduzido no setor de Avicultura Experimental do Departamento de Zootecnia da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás em Goiânia-GO. Foram alojados 112 aves de 25 dias de idade da linhagem Cobb (provenientes do experimento 1, foram retiradas e transportadas 16 aves por tratamento, 4 aves/Box) em baterias metálicas, divididas em gaiolas medindo 0,80 x 0,75 e 0,30 de altura (Figura 2), instaladas em galpão de alvenaria com 12,96 x 2,96 m (38,36m²) de dimensões internas, coberto com telhas de amianto.



FIGURA 2- Galpão utilizado no experimento 2.

As aves foram criadas no galpão até 32 dias de idade, recebendo água e ração a vontade, durante todo o período experimental. O manejo anterior a chegada das aves obedeceu as normas usuais de limpeza e desinfecção para o galpão e as baterias. O aquecimento das baterias foi realizado por lâmpadas incandescentes de 60w e cada gaiola continha um bebedouro tipo linear e um comedouro linear. O monitoramento da temperatura ambiente foi realizado com manejo de cortinas. A média de temperatura mínima foi de 28°C e a máxima de 28,5°C monitorada diariamente com um termômetro no centro do galpão (Tabela 5).

TABELA 5 - Temperatura (°C) registrada durante o experimento 2- Metabolizabilidade dos nutrientes em frangos de corte suplementados com diferentes complexos enzimáticos.

Semanas	Minima	Máxima	Média
4 (25 a 28 dias)	27	30	28,5
5 (28 a 32 dias)	27	29	28,0

3.2.2 Delineamento experimental

Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC) com sete tratamentos, tendo 4 repetições cada um dos tratamentos, tomando um total de 28 unidades experimentais, sendo cada unidade experimental composta por 4 aves.

3.2.3 Tratamentos e composições das rações

Os tratamentos utilizados foram: T1: dieta basal seguindo as recomendações de Rostagno⁵⁴, T2: complexo A (fitase, protease, xilanase, β -glucanase, celulase, amilase, pectinase) + complexo B (protease e celulase) adicionadas “on top” na dieta basal; T3: complexo A + complexo B + enzima A (α -galactosidase) adicionadas “on top” na dieta basal; T4: complexo A + enzima A adicionadas “on top” na dieta basal; T5: complexo D (xilanase, amilase, protease) + enzima B (fitase) e enzima A adicionadas “on top” na dieta basal; T6: complexo D + enzima C (fitase) + enzima A adicionadas “on top” na dieta basal; T7: complexo D + enzima D (fitase) + enzima A adicionadas “on top” na dieta basal (Quadro 4)

QUADRO 4 - Tratamentos experimentais utilizados no experimento 2 - Metabolizabilidade dos nutrientes em frangos de corte suplementados com diferentes complexos enzimáticos.

Tratamentos	Complexos enzimáticos
T1 (DB)	Dieta Basal
T2 (Phy+Pro+Cho/Pro+Cel)	Dieta Basal com adição de Complexo A (fitase, protease, xilanase, β -glucanase, celulase, amilase, pectinase) ¹ + Complexo B (protease e celulase) ²
T3 (Phy+Pro+Cho/Pro+Cel/ α -gal)	Dieta Basal com adição de Complexo A + Complexo B + Enzima A (α -galactosidase) ³
T4 (Phy+Pro+Cho/ α -gal)	Dieta Basal com adição de Complexo A + Enzima A
T5 (Xly+Amy+Pro/PhyB/ α -gal)	Dieta Basal com adição de Complexo C (xilanase, amilase, protease) ⁴ + Fitase B ⁵ e Enzima A
T6 (Xly+Amy+Pro/PhyC/ α -gal)	Dieta Basal com adição de Complexo C + Fitase C ⁶ + Enzima A
T7 (Xly+Amy+Pro/PhyD/ α -gal)	Dieta Basal com adição de Complexo C + Fitase D ⁷ + Enzima A

Inclusão: ¹0,200/1000 kg de ração; ²0,500/1000 kg de ração; ³1,5/1000 kg de Far. Soja; ⁴0,100/1000 kg de ração; ⁵0,100/1000kg de ração; ⁶0,050/1000kg de ração; ⁷ 0,100/1000kg de ração.

As rações foram formuladas á base de milho, farelo de soja e farinha de origem animal de acordo com as recomendações de Rostagno *et al*⁵⁴ e as enzimas adicionadas “on top”. Nesse experimento as aves receberam a ração para fase de crescimento (Tabela 3 e 4).

3.2.4 Variáveis analisadas e análise estatística

O ensaio metabólico foi realizado em um período de 28^a ao 32^o dia de vida das aves, os dois primeiros dias foram utilizados para adaptação (25^o a 27^o dias de idade). 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, realizadas no Laboratório de Nutrição Animal do departamento de Produção Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás. A quantidade de ração consumida, bem como a quantidade de excreta produzida em cada unidade experimental, foi devidamente registrada.

Na preparação das amostras de excretas para a realização das análises de acordo com a metodologia proposta por Silva & Queiroz⁵⁶, alíquotas foram coletadas, identificadas e submetidas à pré-secagem em estufa de ventilação forçada a 55°C. Paralelamente, amostras das rações experimentais foram coletadas para, em seguida, serem, juntamente com as excretas, moídas em moinho tipo Wiley e usadas para determinar:

- **Matéria seca das excretas a 55°C:** determinada em estufa de ventilação forçada com temperaturas em torno de 55°C $\pm$ 5°C por 72 horas, sendo as análises realizadas em duplicata;
- **Matéria seca das rações e das excretas a 105°C:** determinada em estufa regulada à temperatura de 105°C, por um período de 12 horas, sendo as análises realizadas em duplicata;
- **Níveis de nitrogênio total nas rações e nas excretas:** foram determinados utilizando-se o método de Kjeldahl e posteriormente, calculados os valores de proteína bruta. Os valores obtidos foram utilizados para quantificar a quantidade e a retenção de proteína bruta.
- **Retenção de matéria seca:** obtida pela quantidade de matéria seca ingerida subtraída da quantidade de matéria seca excretada;
- **Extrato etéreo:** obtido usando o extrator tipo Goldfish.
- **Energia Bruta:** determinada através do uso da bomba calorimétrica Ika, modelo C-200.

Com os resultados das análises de MS, PB, EE e EB, o coeficiente de digestibilidade (CD%) das dietas (teste e referência) foi calculado, conforme a fórmula descrita por Matterson *et al*⁵⁷.

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

A análise de retenção foi realizada seguindo o método descrito por Noy & Sklan⁵⁸, considerando-se o balanço dos nutrientes e o ganho de peso registrado no período de 28 a 32 dias de idade.

Os dados foram submetidos à análise estatística utilizando-se o software R⁵⁵ e as comparações entre os tratamentos foram efetuadas de acordo com teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.3 Experimento 3 – Ensaio *In Vitro* – Realização de diferentes ensaios enzimáticos nos complexos enzimáticos e enzimas utilizadas nos experimentos *In Vivo*.

3.3.1 Tratamentos utilizados

Esta parte do trabalho foi realizada no Laboratório de Enzimologia do Instituto de Ciências Biológicas/ICB II, da Universidade Federal de Goiás. Nesta etapa do trabalho foram avaliadas as atividades dos complexos enzimáticos e das enzimas utilizadas nos experimentos *In Vivo* conforme mostrado no Quadro 5. A composição das enzimas e a atividade de todos os produtos foram retiradas dos rótulos dos produtos.

QUADRO 5 – Tratamentos experimentais utilizados no experimento 3 - Realização de diferentes ensaios enzimáticos nos complexos e enzimas utilizadas nos experimentos *In Vivo*.

Tratamentos	Enzimas e Complexos	Composição
Phy+Pro+Cho	Complexo A (fitase, protease, xilanase, β -glucanase, celulase, amilase, pectinase)	Produto de fermentação <i>Aspergillus Níger</i> . Veículo não informado
Pro+Cel	Complexo B (protease e celulase)	Carbonato de cálcio. Produto de fermentação de <i>Aspergillus Níger</i> , Produto de fermentação de <i>Trichoderma longibrachiatum</i> e Cloreto de sódio.
Xly+Ami+Pro	Complexo C (xilanase, amilase e protease)	Produto de fermentação de <i>Bacillus substilis</i> . Produto de fermentação <i>Trichoderma reesei</i> . Produto de fermentação de <i>Bacillus licheniformis</i> . Sulfato de sódio. Alcool de polivinílico.. Amido de trigo. Silicato de magnésio. Sacarose
α -gal	Enzima A (α -galactosidase)	<i>Aspergillus Níger</i> . Veículo não informado

QUADRO 5 – Tratamentos experimentais utilizados no experimento 3 - Realização de diferentes ensaios enzimáticos nos complexos e enzimas utilizadas nos experimentos *In Vivo* (continuação).

PhyB	Fitase B (6-fitase – 5.000 U/g)	Produto fermentado de <i>Pichia Pastoris</i> . Veiculo não informado
PhyC	Fitase C (3-fitase – 10.000 FTU/g)	<i>Aspergillus Níger</i> . Veiculo não informado
Phy D	Fitase D (6-fitase – 5.000 U/g)	Fitase de <i>Pichia Pastoris</i> e <i>Trichoderma reesei</i> . Farinha de trigo, Óleo vegetal, Sorbitol, Cloreto de sódio

3.3.2 Variáveis analisadas e análise estatística

Primeiramente foram retiradas amostras de cada tratamento, 3 g por tratamento. Essas amostras foram ressuspensas em 20 mL de água destilada, homogeneizadas e centrifugadas a 5.000 rpm por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e utilizado para uma série de ensaios descritos abaixo. Para alguns ensaios as amostras foram dialisadas contra água destilada por 15 horas á 4°C.

- **Proteína Total:** foi determinada pela metodologia descrita por Bradford⁵⁹, utilizando albumina sérica bovina (BSA-Sigma) como padrão. Amostras de 100 µL do sobrenadante de cada tratamento foram adicionadas a 900 µL da solução de Bradford. Após incubação por 15 minutos, à temperatura ambiente foi realizada a leitura de absorbância das amostras em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595nm. A curva padrão foi feita utilizando albumina bovina como padrão;
- **Açúcar redutor:** determinado pela metodologia descrita por Miller⁶⁰. Amostras de 20 µL do sobrenadante de cada tratamento foram acrescentadas de 80 µL de água destilada e 900 µL de ácido dinitrosalicílico (DNS), incubado a 100 °C por 5 minutos e leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 550 nm. A curva padrão foi feita utilizando glicose como padrão;
- **Atividade de Fosfatase:** foi determinada pela metodologia descrita por Leitão *et al*⁶¹. A mistura do ensaio foi de 350 µL de tampão acetato pH 4,8 e

50 μL de cada tratamento, 100 μL de solução de p-nitrofosfato 5 mM (p-NPP). A mistura foi incubada a 40°C por 30 minutos e depois interrompida com um solução de 500 μL de NaOH. Em seguida foi feita a leitura no comprimento de onda de 405 nm;

- **Atividade de β -1,3 Glucanase:** foi determinada mensurando a quantidade de açúcar redutor liberado do substrato laminarina (β -1,3/ β -1,4 - Sigma). Foram adicionados 50 μL de cada tratamento a 100 μL de solução de laminarina 0,25 %, diluída em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0⁶². Após incubação da mistura a 40°C por 1 hora, a reação foi interrompida com a adição de 1 mL de DNS e foi aquecida em água fervente por 5 minutos. A atividade enzimática foi determinada após a quantificação em espectrofotômetro com comprimento de onda a 550nm e a curva padrão foi feita utilizando glicose. Uma unidade de enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmol de açúcar redutor por minuto;
- **Atividade de Xilanase:** a atividade xilanolítica foi determinada pela metodologia de açúcares redutores⁶⁰. Utilizou-se 10 μL de cada tratamento adicionada em 90 μL de água destilada, 100 μL de xilana (oat spelts - sigma) e 350 μL de tampão citrato fosfato 50 mmol.L-1 . A mistura de reação foi incubada a 37°C por 45 minutos. Após esse período, foram adicionados 500 μL de DNS à mistura, que foi incubada por 5 minutos em água fervente, com posterior adição de 1000 μL de água destilada. A atividade enzimática foi determinada após a quantificação em espectrofotômetro com comprimento de onda a 540nm e a curva padrão foi feita utilizando glicose. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1 μmol de açúcar redutor por minuto;
- **Atividade de CMCase:** determinada pela metodologia de açúcares redutores⁶⁰. Utilizou-se 50 μL de cada tratamento adicionada em 50 μL de água destilada, 50 μL de xilana (oat spelts - Sigma) e 50 μL de tampão citrato fosfato 50 mmol.L-1 . A mistura de reação foi incubada a 50°C por 30 minutos. Após esse período, foram adicionados 300 μL de DNS à mistura, que foi incubada por 5 minutos em água fervente, com posterior adição de 1050

μL de água destilada. A atividade enzimática foi determinada após a quantificação em espectrofotômetro com comprimento de onda a 540nm e a curva padrão foi feita utilizando glicose. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1 μmol de açúcar redutor por minuto;

- **Atividade de FPase:** determinada pela metodologia de açúcares redutores⁶⁰. Utilizou-se 50 μL de cada tratamento adicionado em 100 μL de água destilada e 50 μL de tampão citrato fosfato 50 mmol.L⁻¹. A mistura de reação foi incubada a 50°C por 60 minutos. Após esse período, foram adicionados 300 μL de DNS à mistura, que foi incubada por 5 minutos em água fervente, com posterior adição de 1050 μL de água destilada. A atividade enzimática foi determinada após a quantificação em espectrofotômetro com comprimento de onda a 540nm e a curva padrão foi feita utilizando glicose. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1 μmol de açúcar redutor por minuto;
- **Atividade de Amilase:** determinada pela metodologia de açúcares redutores⁶⁰. Foram adicionadas 40 μL de tampão (acetato de sódio, 50 mM pH 5,5; citrato fosfato, 50 mM pH 6,8 e Kansas, 50 mM pH 6,8) foram adicionados 60 μL de amostra de cada tratamento e 100 μL de solução de amido 0,5%. Após a mistura ser incubada a 40°C por 20 minutos foram adicionadas 1000 μL de DNS à mistura, que foi incubada por 10 minutos. A atividade enzimática foi determinada após a quantificação em espectrofotômetro com comprimento de onda a 600nm e a curva padrão foi feita utilizando glicose. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1 μmol de açúcar redutor por minuto;
- **Atividade de Protease:** foi utilizado o ensaio descrito por Cabral *et al*⁶³, no qual 20 μL de amostra de cada tratamento foram incubados com 40 μL de tampão Tris-HCl 50 mM variando o pH entre 5.0 e 40 μL de azocaseína 0,25% (p/v) à 37 °C por 30 minutos. Foi adicionado 100 μL de ácido tricloroacético 10% (p/v) a reação e a mesma foi incubada a 4 °C por 10 minutos. As

amostras foram centrifugadas a 10000 rpm por 5 minutos e 100 µl foram transferidos para uma placa de ELISA seguida pela adição de 100 µL de NaOH 1 M. A absorbância foi determinada à 405 nm em leitora de microplacas;

- **Atividade de Pectinase:** adicionou-se 50 µl de cada tratamento a 100 µl de pectina 0,5% (dissolvida em tampão acetato de sódio 50 mmol.L⁻¹, pH 5,5 e citrato fosfato, 50 mmol.L⁻¹, pH, 6,8). Após 30 minutos de incubação a 50° C, a reação foi interrompida com 300 µl de DNS e a solução mantida em água fervente por 10 minutos, com posterior adição de 1,5 mL de água destilada. A concentração de enzima foi em espectrofotômetro com comprimento de onda a 540nm e a curva padrão foi feita utilizando glicose. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1 µmol de açúcar redutor por minuto.

Além desses ensaios foi realizado a construção de um mapa proteômicos em gel de poliacrilamida (1D) a partir dos sobrenadantes das amostras, 40 µl de cada amostra foram dialisadas, liofilizadas e precipitadas em TCA/Acetona para a eletroforese em gel de poliacrilamida unidimensional (1D) na presença de SDS (SDS-PAGE), utilizando a metodologia descrita por LAEMMLI (1970). A corrida ocorreu por um período de 3 horas e 110v. Após o termino, o gel foi corado com Comassie Blue para a visualização das bandas e possível análise do perfil proteico. O perfil foi determinado levando em consideração apenas a massa molecular.

Os dados foram submetidos à análise estatística utilizando-se o software R⁵⁵ e as comparações entre os tratamentos foram efetuadas de acordo com teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Experimento 1 – Desempenho e rendimento de carcaça de frangos de corte suplementados com diferentes complexos enzimáticos.

4.1.1 Experimento 1 – Desempenho de frangos de corte suplementados com diferentes complexos enzimáticos.

Ao avaliar o desempenho aos sete dias de idade observou-se que os diferentes complexos enzimáticos interferiram significativamente ($p < 0,05$) no peso final, ganho de peso e conversão alimentar. Para as variáveis de consumo de ração e viabilidade não houve diferenças entre os tratamentos (Tabela 6). Os dados de mortalidade não foram considerados uma vez que a mortalidade foi mínima durante a execução da pesquisa.

Pode-se observar que os tratamentos com adição de complexos com ou sem associação de uma enzima obtiveram maior peso final aos sete dias, do que o tratamento controle, sendo o tratamento Phy+Pro+Cho/Pro+Cel/ α -gal com maior diferença, com um aumento de 6,1% (10,03 g) no peso médio final em relação ao controle.

Em relação à conversão alimentar a adição de complexos enzimáticos com ou sem associação de uma enzima demonstrou eficácia na melhoria da conversão alimentar, sendo a menor diferença de 4,5% (tratamento Phy+Pro+Cho/Pro+Cel X tratamento DB), e a maior diferença de 15,3% (tratamento Xly+Amy+Pro/PhyC/ α -gal X tratamento DB). Este fato pode ser explicado por Sakomura *et al*²⁰ que descreve que a adição de enzimas em animais jovens pode promover melhoria no aproveitamento dos nutrientes, pois esses animais ainda estão com o trato digestório imaturo e com produção de enzimas endógenas ainda em quantidades insuficientes.

Fernandes *et al*⁶⁵ também encontraram diferença significativa ($p < 0,05$) com a utilização de um complexo composto por carboidrases e protease em relação ao tratamento controle para a variável de conversão alimentar aos sete dias de idade. Shirmohammad & Mehri⁵ não demonstraram significância ($p > 0,05$) entre o consumo de ração e a adição de um complexo enzimático composto por carboidrases e protease. Em contrapartida, Nascimento⁶⁶ estudando a utilização de um complexo enzimático composto por carboidrases e fitase em frangos de

corde no período de 1 a 7 dias, não observou efeito significativo ($p>0,05$) do complexo enzimático sobre as variáveis de desempenho.

TABELA 6 - Desempenho de frangos de corte de 1 a 7 dias suplementados com diferentes complexos enzimáticos¹.

Tratamento	PMI (g)	PF (g)	GP (g)	CR (g)	CA (g)
DB	36,6	164,3 b	127,7 c	168,3	1,302 a
Phy+Pro+Cho/Pro+Cel	36,5	166,4 ab	129,6 bc	161,5	1,244 ab
Phy+Pro+Cho/Pro+Cel/ α -gal	37,2	174,4 a	135,3 a	166,8	1,217 ab
Phy+Pro+Cho/ α -gal	36,9	171,2 ab	134,3 ab	158,7	1,180 ab
Xly+Amy+Pro/PhyB/ α -gal	37,1	174,1 a	136,9 a	156,4	1,136 ab
Xly+Amy+Pro/PhyC/ α -gal	36,9	170,4 ab	133,4 ac	147,6	1,103 b
Xly+Amy+Pro/PhyD/ α -gal	36,6	171,0 ab	136,9 a	151,9	1,127 b
Valor de p	0,434	0,044	0,031	0,739	0,030
CV(%)	1,24	2,67	2,40	7,33	7,87

¹Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística significativa (Tukey 5%).

Legenda:

PMI – Peso médio inicial; PMF – Peso final; GP – Ganho de peso; CR – Consumo de ração; CA – Conversão alimentar;

DB – Dieta basal; Phy – Fitase; Pro – Protease; Cel – Celulase; Xly – Xilanase; Cho – Carboidrases; α -gal – α -galactosidase; PhyB – 6-Fitase (5000 U/g); PhyC – 3-Fitase (10.000 FTU/g); PhyD 6-Fitase (5000 U/g);

CV – Coeficiente de variação.

Carvalho *et al*⁶⁷ estudando dois tipos de complexos enzimáticos, um com carboidrases, protease com e sem adição de xilanase e outro com somente carboidrases relataram que não houve diferenças significativas em relação ao desempenho das aves de 1 a 7 dias, comparado com o tratamento controle.

O desempenho aos 14 dias de idade demonstrou que os diferentes complexos enzimáticos interferiram significativamente ($p<0,05$) no peso final e ganho de peso. Não houve diferença significativa ($p>0,05$), para o consumo de ração e conversão alimentar (Tabela 7). O peso final aos 14 dias de idade pode ser levado em conta, devido a grande diferença numérica em relação ao grupo controle, sendo a menor diferença (Tratamento Phy+Pro+Cho/Pro+Cel) de 11,4 g e maior (Tratamento Xly+Amy+Pro/PhyB/ α -gal) de 36,1 g.

Esses dados discordam de Dalólio⁶⁸ que ao estudar um complexo composto por carboidrases e protease não apresentaram resultados significantes ($p>0,05$) nas características de peso final e ganho de peso na fase inicial. Assim também encontrado por Kaczmarek *et al*⁶⁹ que estudou a associação de amilase e protease.

Apesar de não ocorrer significância ($p>0,05$), é possível observar que a adição dos complexos enzimáticos nessa fase interferiu positivamente na

conversão alimentar, melhorando a relação de consumo e ganho de peso, mesmo que apenas numericamente.

TABELA 7. Desempenho de frangos de corte de 1 a 14 dias alimentados com as rações experimentais¹.

Tratamento	PMI (g)	PF (g)	GP (g)	CR (g)	CA (g)
DB	36,6	464,0 b	427,3 b	577,9	1,339
Phy+Pro+Cho/Pro+Cel	36,5	475,4 ab	438,3 ab	599,8	1,341
Phy+Pro+Cho/Pro+Cel/ α -gal	37,2	498,1 a	460,9 a	603,8	1,297
Phy+Pro+Cho/ α -gal	36,9	495,8 ab	458,9 ab	603,1	1,292
Xly+Amy+Pro/PhyB/ α -gal	37,1	500,1 a	462,9 a	610,3	1,286
Xly+Amy+Pro/PhyC/ α -gal	36,9	485,7 ab	448,7 ab	576,5	1,257
Xly+Amy+Pro/PhyD/ α -gal	36,6	492,8 ab	456,1 ab	585,0	1,264
Valor de p	1,24	0,041	0,037	0,745	0,785
CV(%)	0,43	2,73	2,51	6,50	6,72

¹Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística significativa (Tukey, 5%).

Legenda:

PMI – Peso médio inicial; PMF – Peso final; GP – Ganho de peso; CR – Consumo de ração; CA – Conversão alimentar;

DB – Dieta basal; Phy – Fitase; Pro – Protease; Cel – Celulase; Xly – Xilanase; Cho – Carboidrases; α -gal – α -galactosidase; PhyB – 6-Fitase (5000 U/g); PhyC – 3-Fitase (10.000 FTU/g); PhyD 6-Fitase (5000 U/g);

CV – Coeficiente de variação.

Aos 21 dias de idade (Tabela 8) não houve diferenças significativas para os parâmetros de peso final, ganho de peso, consumo de ração, conversão alimentar ($p>0,05$). Dados esses, que concordam com Meneghetti⁴¹ que estudando a utilização de carboidrases com adição de protease e fitase não encontram diferenças significativas ($p>0,05$) para ganho de peso e consumo de ração.

Já de acordo com Francesch & Geraert⁴⁵ a utilização de um complexo enzimático composto por carboidrases e fitase demonstrou melhoria de 24,9% no ganho de peso e redução de 4,36 na conversão alimentar ($p<0,05$).

Apesar de estatisticamente não apresentarem diferenças de desempenho entre os tratamentos, numericamente todos os tratamentos que receberam adição de complexos enzimáticos com ou sem adição de uma enzima apresentaram peso médio final maior do que o tratamento controle, sendo o tratamento Xly+Amy+Pro/PhyB/ α -gal, o tratamento com maior peso médio final nesta fase.

Em relação aos resultados de consumo de ração, apesar de não ter ocorrido significância ($p>0,05$), observa-se um aumento no consumo médio de 2,9%. Dados esses que podem ser associados aos relatados por Ritz *et al*⁷⁰, que observaram aumento de 4% no consumo de ração aos 21 dias de idade, em rações

à base de milho e farelo de soja suplementadas com complexos enzimáticos. Cardoso *et al*⁷¹ não observaram diferenças significativas em relação ao consumo de ração e adição de complexos enzimáticos ou enzimas isoladas, independentemente da ração estar com níveis reduzidos de energia ou não.

TABELA 8 - Desempenho de frangos de corte de 1 a 21 dias alimentados com as rações experimentais¹.

Tratamento	PMI (g)	PF (g)	GP (g)	CR (g)	CA (g)
DB	36,6	986,6	950,0	1290,4	1,335
Phy+Pro+Cho/Pro+Cel	36,5	999,1	962,0	1341,5	1,369
Phy+Pro+Cho/Pro+Cel/ α -gal	37,2	1010,7	973,5	1336,9	1,352
Phy+Pro+Cho/ α -gal	36,9	1003,1	966,2	1328,6	1,328
Xly+Amy+Pro/PhyB/ α -gal	37,1	1022,9	985,7	1339,4	1,330
Xly+Amy+Pro/PhyC/ α -gal	36,9	1019,2	982,2	1314,6	1,325
Xly+Amy+Pro/PhyD/ α -gal	36,6	1004,9	968,2	1309,7	1,329
Valor de p	0,434	0,128	0,133	0,766	0,796
CV(%)	1,24	3,47	3,59	2,99	2,93

¹Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística significativa (Tukey, 5%).

Legenda:

PMI – Peso médio inicial; PMF – Peso final; GP – Ganho de peso; CR – Consumo de ração; CA – Conversão alimentar;

DB – Dieta basal; Phy – Fitase; Pro – Protease; Cel – Celulase; Xly – Xilanase; Cho – Carboidrases; α -gal – α -galactosidase; PhyB – 6-Fitase (5000 U/g); PhyC – 3-Fitase (10.000 FTU/g); PhyD 6-Fitase (5000 U/g);

CV – Coeficiente de variação.

Ao avaliar o desempenho aos 28 dias de idade observou-se que os diferentes complexos enzimáticos não interferiram significativamente ($p>0,05$) no peso final, ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar (Tabela 9). Estes dados concordam com Rodrigues *et al*⁷² que estudando a suplementação com um complexo composto de carboidrases e protease não demonstraram diferenças significativa ($p>0,05$) no desempenho em relação a mesma fase de criação.

Apesar da não significância ($p>0,05$) em relação ao desempenho, observou-se que o tratamento Phy+Pro+Cho/Pro+Cel/ α -gal se destacou entre as características analisadas, apresentando um aumento de 2,27% (35,7 g) no peso médio final e diminuição de 4,8% na conversão alimentar, em relação ao tratamento controle.

TABELA 9 - Desempenho de frangos de corte de 1 a 28 dias alimentados com as rações experimentais¹.

Tratamento	PMI (g)	PF (g)	GP (g)	CR (g)	CA (g)
DB	36,6	1569	1532	2359	1,449
Phy+Pro+Cho/Pro+Cel	36,5	1592	1555	2410	1,431
Phy+Pro+Cho/Pro+Cel/ α -gal	37,2	1604	1567	2348	1,379
Phy+Pro+Cho/ α -gal	36,9	1553	1517	2369	1,449
Xly+Amy+Pro/PhyB/ α -gal	37,1	1593	1556	2386	1,403
Xly+Amy+Pro/PhyC/ α -gal	36,9	1584	1547	2362	1,417
Xly+Amy+Pro/PhyD/ α -gal	36,6	1560	1523	2365	1,428
Valor de p	0,434	0,138	0,145	0,790	0,801
CV(%)	1,24	3,90	3,71	3,50	3,71

¹Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística significativa (Tukey, 5%).

Legenda:

PMI – Peso médio inicial; PMF – Peso final; GP – Ganho de peso; CR – Consumo de ração; CA – Conversão alimentar;

DB – Dieta basal; Phy – Fitase; Pro – Protease; Cel – Celulase; Xly – Xilanase; Cho – Carboidrases; α -gal – α -galactosidase; PhyB – 6-Fitase (5000 U/g); PhyC – 3-Fitase (10.000 FTU/g); PhyD 6-Fitase (5000 U/g);

CV – Coeficiente de variação.

Ao avaliar o desempenho aos 35 dias de idade observou-se que os diferentes complexos enzimáticos não interferiram significativamente ($p>0,05$) no peso final, ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar (Tabela 10). Esses dados concordam com Dalólio⁶⁷ que ao estudar um complexo composto por carboidrases e protease não demonstrou significância ($p>0,05$) nas características de desempenho.

Por outro lado, Carvalho⁷³ avaliando a adição de um complexo composto por fitase, protease, xilanase, β -glucanase, celulase, amilase e pectinase em rações para frangos de corte com 35 dias de idade observou que independente dos níveis nutricionais utilizados, a adição do complexo enzimático mostrou-se eficiente em promover melhorias nos valores de ganho de peso (2,05%) e conversão alimentar (1,67%). Já Ledur⁷⁴ estudou o mesmo complexo anterior e observou que não houve diferença significativa ($p>0,05$) em nenhuma das características de desempenho aos 35 dias de idade.

Novamente o tratamento Phy+Pro+Cho/Pro+Cel/ α -gal, demonstrou resultados numericamente superiores em relação ao demais tratamentos, acrescentando 85 g a mais no peso médio final e reduzindo cerca de 5% na conversão alimentar, em relação ao tratamento controle, sem adição de complexo enzimático.

TABELA 10 - Desempenho de frangos de corte de 1 a 35 dias alimentados com as rações experimentais¹.

Tratamento	PMI (g)	PF (g)	GP (g)	CR (g)	CA (g)
DB	36,6	2301	2264	4020	1,684
Phy+Pro +Cho/Pro+Cel	36,5	2324	2287	4062	1,666
Phy+Pro+Cho/Pro+Cel/ α -gal	37,2	2386	2349	3917	1,600
Phy+Pro+Cho/ α -gal	36,9	2325	2288	3951	1,628
Xly+Amy+Pro/PhyB/ α -gal	37,1	2343	2306	4002	1,626
Xly+Amy+Pro/PhyC/ α -gal	36,9	2359	2322	4020	1,615
Xly+Amy+Pro/PhyD/ α -gal	36,6	2272	2235	3917	1,655
Valor de p	0,434	0,756	0,675	0,640	0,108
CV (%)	1,24	2,98	2,71	3,50	3,99

¹Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística significativa (Tukey, 5%).

Legenda:

PMI – Peso médio inicial; PMF – Peso final; GP – Ganho de peso; CR – Consumo de ração; CA – Conversão alimentar;

DB – Dieta basal; Phy – Fitase; Pro – Protease; Cel – Celulase; Xly – Xilanase; Cho – Carboidrases; α -gal – α -galactosidase; PhyB – 6-Fitase (5000 U/g); PhyC – 3-Fitase (10.000 FTU/g); PhyD 6-Fitase (5000 U/g);

CV – Coeficiente de variação.

Aos 42 dias de idade observou-se que os diferentes complexos enzimáticos não interferiram significativamente ($p>0,05$) no peso final, ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar (Tabela 11). Estes dados concordam com Rizzoli⁷⁵, que ao utilizar dois tipos de complexos enzimáticos em rações com ou sem reduções de níveis nutricionais, um complexo com xilanase, amilase e β -glucanase e outro com amilase e β -glucanase não encontraram efeito significativo ($p>0,05$) em relação ao consumo de ração.

Estes dados discordam de Barbosa⁷⁶ que estudando a utilização de um complexo composto por amilase, protease e xilanase com adição isolada de fitase observaram melhorias na conversão alimentar ($p<0,05$) de frangos que receberam esse tipo de complexo com adição de fitase, independentemente do tipo de ração, basal ou com redução de nutrientes. Sorbara *et al*⁷⁷ também encontram efeito significativo ($p<0,05$) para conversão alimentar em frangos de corte suplementados com a associação de xilanase e amilase do que utilizadas separadamente em uma ração basal ou com reduções de níveis.

Apesar de não existir diferença significativa ($p>0,05$) é possível notar um padrão em que o tratamento Phy+Pro+Cho/Pro+Cel/ α -gal, composto por dois complexos enzimáticos, o primeiro com fitase, protease, xilanase, β -glucanase, celulase, amilase, pectinase e o segundo com protease e celulase, além de

associação da enzima α -galactosidase demonstrou maiores valores de peso médio final desde a quarta (21 dias) até a sexta semana de idade das aves (42 dias). Além do valor de peso final mais elevado, o tratamento Phy+Pro+Cho/Pro+Cel/ α -gal também apresentou o menor consumo em relação aos demais tratamentos, consequentemente uma melhor conversão alimentar.

É possível que se possa relacionar a maior quantidade de enzimas do tratamento Phy+Pro+Cho/Pro+Cel/ α -gal com a melhoria dos parâmetros de desempenho, isso pode ser explicado pelo princípio da utilização dos complexos enzimáticos que estariam agindo sinergicamente entre os diferentes tipos de enzimas. Esse princípio é descrito por Sakomura *et al*²⁰ que afirma que a associação de diferentes tipos de enzimas promove melhores resultados de desempenho, pelo fato de atuarem de forma conjunta e sinérgica, fazendo com que algumas enzimas degradem componentes dos alimentos, que sofrerão posteriormente a ação de outras enzimas associadas a este complexo enzimático ou até das enzimas endógenas.

Porém diante do exposto, embasado cientificamente e teoricamente, é possível afirmar que o uso de complexos enzimáticos é somente recomendado nas fases pré inicial (1 a 7 dias) e inicial (7 a 14 dias), neste contexto experimental.

TABELA 11. Desempenho de frangos de corte de 1 a 42 dias alimentados com as rações experimentais¹.

Tratamento	PMI (g)	PMF (g)	GMP (g)	CRM (g)	CA (g)
DB	36,6	2895	2859	5184	1,744
Phy+Pro+Cho/Pro+Cel	36,5	2949	2912	5257	1,727
Phy+Pro+Cho/Pro+Cel/ α -gal	37,2	3002	2964	5108	1,654
Phy+Pro+Cho/ α -gal	36,9	2899	2862	5169	1,700
Xly+Amy+Pro/PhyB/ α -gal	37,1	2931	2894	5222	1,674
Xly+Amy+Pro/PhyC/ α -gal	36,9	2931	2894	5187	1,680
Xly+Amy+Pro/PhyD/ α -gal	36,6	2922	2885	5147	1,647
CV(%)	0,434	0,888	0,875	0,140	0,108
Valor de p	1,24	2,76	2,79	2,26	3,23

¹Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística significativa (Tukey, 5%).

Legenda:

PMI – Peso médio inicial; PMF – Peso final; GP – Ganho de peso; CR – Consumo de ração; CA – Conversão alimentar;

DB – Dieta basal; Phy – Fitase; Pro – Protease; Cel – Celulase; Xly – Xilanase; Cho – Carboidratos; α -gal – α -galactosidase; PhyB – 6-Fitase (5000 U/g); PhyC – 3-Fitase (10.000 FTU/g); PhyD 6-Fitase (5000 U/g);

CV – Coeficiente de variação.

4.1.2 Experimento 1 - Rendimento de carcaça de frangos de corte suplementados com diferentes complexos enzimáticos.

Ao avaliar o rendimento de carcaça aos 42 dias, não se observou diferenças estatísticas ($p < 0,05$), dos principais cortes comerciais, como: coxa e sobrecoxa, peito e asa, bem como do rendimento de carcaça e da gordura abdominal (Tabelas 12 e 13).

TABELA 12 - Peso dos cortes em frangos alimentados com as diferentes rações experimentais aos 42 dias.

Tratamento	Asa (g)	Pés (g)	P/cb (g)	Dorso (g)	Peito (g)	CS (g)	GB (g)
DB	256 a	100 ab	164	399 a	990	704	47
Phy+Pro+Cho/Pro+Cel	241 a	112 a	172	382 ab	956	714	45
Phy+Pro+Cho/Pro+Cel/ α -gal	224 a	94,5 ab	159	343 ab	945	694	41
Phy+Pro+Cho/ α -gal	239 a	107 a	170	370 ab	947	713	42
Xly+Amy+Pro/PhyB/ α -gal	226 a	96,2 ab	159	335 b	918	671	39
Xly+Amy+Pro/PhyC/ α -gal	232 a	109 a	178	373 ab	968	716	43
Xly+Amy+Pro/PhyD/ α -gal	222 a	87,7 b	152	334 b	956	700	42
Valor de p	0,41	0,04	0,51	0,03	0,68	0,54	0,69
CV(%)	5,72	7,67	7,74	5,70	8,62	5,64	25,4

¹Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística significativa (Tukey, 5%).

Legenda:

DB – Dieta basal; Phy – Fitase; Pro – Protease; Cel – Celulase; Xly – Xilanase; Cho – Carboidrases; α -gal – α -galactosidase; PhyB – 6-Fitase (5000 U/g); PhyC – 3-Fitase (10.000 FTU/g); PhyD 6-Fitase (5000 U/g); CV – Coeficiente de variação.

Estes dados concordam com os encontrados por Freitas *et al*⁷⁸ que avaliando a utilização de um complexo enzimático composto por carboidrases, fitase e protease sobre o rendimento de carcaça e de coxas+sobrecoxas, não encontram significância ($p > 0,05$) para estas variáveis, porém no mesmo estudo houve diferença significativa ($p < 0,05$) para o rendimento de peito, demonstrando que o tratamento com adição do complexo apresentou maior rendimento do que o grupo controle. Cardoso *et al*⁷⁰ também não encontraram diferenças significativas ($p > 0,05$) em relação aos rendimentos de cortes e gordura abdominal em aves suplementadas ou não com complexos enzimáticos provenientes de carboidrases.

Fernandes *et al*⁶⁴ também não encontraram diferença significativa, utilizando um complexo composto por carboidrases e protease em relação ao rendimento de carcaça, peito, asas e gordura abdominal. Hajati⁷⁹ estudando frangos de corte aos 44 dias de idade, suplementados ou não com um complexo

enzimático composto por carboidrases, observou diferença significativa ($p < 0,05$), verificando que a adição de tal complexo melhorou o rendimento de carcaça.

Apesar de não haver significância ($p > 0,05$) em relação ao rendimento de gordura abdominal, observou uma melhoria na percentagem de gordura nas aves, que foram suplementadas com complexos enzimáticos em relação ao grupo de aves que receberam a ração controle. Apontando na direção de uma melhor utilização dos nutrientes da dieta dos tratamentos nos quais houve a inclusão de complexos enzimáticos com ou sem adição de enzimas isoladamente. Porém este resultado impede que se forme uma opinião concreta sobre a ação ou não dos complexos enzimáticos na redução de gordura abdominal, devido ao alto coeficiente de variação (25,15) desta variável.

Em relação a concentração de gordura abdominal na carcaça, Café *et al*⁴⁶ encontraram efeito significativo ($p < 0,05$) com adição de um complexo enzimático composto por xilanase, amilase e protease, observando que o uso deste complexo aumentou a percentagem de gordura na carcaça comparada ao grupo controle, sem adição do complexo.

TABELA 13 – Valores médio de rendimento de carcaça s/pés, cabeça e pescoço (RA) rendimento de asa (RA) rendimento de peito (RPE) rendimento de coxa + sobrecoxa (RCS) e rendimento de gordura abdominal (RG) de frangos de corte aos 42 dias de idade.

Tratamento	RC (%)	RA (%)	RPE (%)	RCS (%)	RG. (%)
DB	75,45	10,35	40,01	28,54	1,94
Phy+Pro+Cho/Pro+Cel	74,21	10,13	40,05	30,03	1,89
Phy+Pro+Cho/Pro+Cel/ α -gal	75,24	9,67	40,71	30,02	1,77
Phy+Pro+Cho/ α -gal	75,91	10,13	40,66	30,14	1,77
Xly+Amy+Pro/PhyB/ α -gal	74,59	10,04	40,61	29,82	1,75
Xly+Amy+Pro/PhyC/ α -gal	74,37	9,86	41,00	30,43	1,85
Xly+Amy+Pro/PhyD/ α -gal	75,40	9,37	40,77	29,53	1,76
Valor de p	0,494	0,331	0,952	0,215	0,989
CV (%)	2,99	10,40	6,08	5,72	25,15

¹Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística significativa (Tukey, 5%).

Legenda:

DB – Dieta basal; Phy – Fitase; Pro – Protease; Cel – Celulase; Xly – Xilanase; Cho – Carboidrases; α -gal – α -galactosidase; PhyB – 6-Fitase (5000 U/g); PhyC – 3-Fitase (10.000 FTU/g); PhyD 6-Fitase (5000 U/g);
CV – Coeficiente de variação.

4.2. Experimento 2 - Metabolizabilidade dos nutrientes em frangos de corte suplementados com diferentes complexos enzimáticos.

Os resultados do ensaio de metabolismo referentes à energia metabolizável aparente corrigida pelo balanço de nitrogênio, ao balanço de nitrogênio e aos coeficientes de metabolizabilidade da matéria seca, nitrogênio, proteína bruta não demonstram efeito significativo ($p>0,05$). Porém o coeficiente de metabolizabilidade de extrato etéreo houve efeito significativo ($p<0,05$) entre os tratamentos (Tabela 14). Esses resultados concordam com os encontrados com Garcia *et al*⁸⁰ que ao estudar o efeito de um complexo composto por carboidrases e protease não observaram efeito significativo ($p>0,05$) para o coeficiente de metabolizabilidade da matéria seca (CMMS), coeficiente de metabolizabilidade da proteína bruta (CMPB) e energia metabolizável aparente corrigida pelo balanço de nitrogênio (EMAn).

Rizzoli⁷⁴ também não encontraram efeito significativo ($p>0,05$) em relação ao CMMS, CMEE e EMAn em frangos de corte alimentados com rações com níveis nutricionais reduzidos ou não, suplementados com complexos enzimáticos composto por carboidrases. Já Dourado²⁷ ao estudar dois tipo complexos enzimáticos, um com xilanase, amilase e protease, outro com xilanase, pectinase e β -glucanase com ou sem adição de fitase, demonstrou melhora no CMMS nas aves que receberam ração suplementadas com estes complexos em relação ao grupo controle. Pessôa¹⁴ também relatou melhorias na energia metabolizável aparente corrigida pelo balanço de nitrogênio e no balanço de nitrogênio em dietas e no balanço de nitrogênio em aves que foram alimentadas com ração contendo um complexo composto por β -glucanase, xilanase, pectinase, protease e fitase.

Em relação ao CMEE observou-se que os tratamentos com Phy+Pro+Cho/Pro+Cel e Phy+Pro+Cho/ α -gal tiveram os melhores coeficiente de metabolizabilidade, demonstrando um melhor aproveitamento do extrato etéreo, possivelmente o sinergismo de ação das enzimas de tais complexos foram mais eficazes do que as outras enzimas dos demais tratamentos.

TABELA 14 - Coeficiente de metabolizabilidade da matéria seca (CMMS), do nitrogênio (CMN), do extrato etéreo (CMEE), energia metabolizável aparente corrigida pelo balanço de nitrogênio (CMEMAn) e o balanço de nitrogênio (BN).

Tratamento	CMMS (%)	CMN (%)	CMEE (%)	EMAn (kcal/kgMS)	BN (g)
DB	76,46	67,99	83,35 b	3.120	43,52
Phy+Pro+Cho/Pro+Cel	77,78	67,71	86,21 a	3.095	45,80
Phy+Pro+Cho/Pro+Cel/ α -gal	75,46	65,12	82,43 b	3.016	41,49
Phy+Pro+Cho/ α -gal	76,46	68,43	86,21 a	3.035	49,72
Xly+Amy+Pro/PhyB/ α -gal	78,13	67,26	83,39 b	3.087	44,37
Xly+Amy+Pro/PhyC/ α -gal	76,35	67,42	78,79 c	3.045	44,11
Xly+Amy+Pro/PhyD/ α -gal	74,79	64,58	78,27 c	2.994	44,12
Valor de p	0,624	0,720	<0,001	0,210	0,067
CV(%)	3,49	5,64	2,45	2,73	7,36

¹Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística significativa (Tukey, 5%).

Legenda:

DB – Dieta basal; Phy – Fitase; Pro – Protease; Cel – Celulase; Xly – Xilanase; Cho – Carboidratos; α -gal – α -galactosidase; PhyB – 6-Fitase (5000 U/g); PhyC – 3-Fitase (10.000 FTU/g); PhyD 6-Fitase (5000 U/g);
CV – Coeficiente de variação.

4.3 Experimento 3 – Ensaio *In Vitro* – Realização de diferentes ensaios enzimáticos nos complexos enzimáticos e enzimas utilizadas nos experimentos *In Vivo*..

4.3.1 Determinação de proteína total das amostras.

A determinação de proteína total no sobrenadante das amostras mostrou uma diferença significativa ($p < 0,05$), demonstrando que a amostra PhyC apresentou maior concentração de proteína (Tabela 15). Este experimento foi realizado com o objetivo de avaliar a solubilidade das proteínas contidas em cada amostra. Cabe ressaltar que nem todas as proteínas detectadas representam as enzimas, pois parte delas devem pertencer aos veículos.

TABELA 15 – Atividade de proteína total nos complexos e enzimas utilizadas nos experimentos *In Vivo*¹.

Tratamento	Proteína Total (mg/ml)
Phy+Pro+Cho	38,66 $\pm$ 6,46 b
Pro+Cel	12,54 $\pm$ 1,18 c
Xly+Ami+Pro	16,26 $\pm$ 3,03 c
α -gal	6,75 $\pm$ 0,92 c

¹Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística significativa (Tukey, 5%).

TABELA 15 – Atividade de proteína solúvel nos complexos e enzimas utilizadas nos experimentos *In Vivo*¹ (continuação).

PhyB	19,35 ± 0,79 c
PhyC	96,77 ± 1,31 a
PhyD	32,22 ± 2,63 b
Valor de p	<0,001
CV(%)	9,41

¹Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística significativa (Tukey, 5%).

Phy – Fitase; Pro – Protease; Cel – Celulase; Xly – Xilanase; Cho – Carboidrases; α -gal – α -galactosidase; PhyB – 6-Fitase (5000 U/g); PhyC – 3-Fitase (10.000 FTU/g); PhyD 6-Fitase (5000 U/g);

CV – Coeficiente de variação

4.3.2 Determinação de açúcar redutor.

A determinação de açúcar redutor (AR) foi realizada para avaliar a quantidade de açúcares presentes nos sobrenadantes das amostras enzimáticas. Observamos que uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras, demonstrando que a amostra Phy+Pro+Cho e a amostra PhyD apresentaram a maior concentração de AR (Tabela 16).

A quantificação de AR é um parâmetro fundamental para avaliar a atividade das enzimas, visto que podem inibir a atividade de algumas enzimas utilizadas neste trabalho (ex: amilase, celulase, xilanase e β -1,3-glucanase). Por este motivo todas as amostras foram dialisadas contra água para retirar o AR presente nas amostras. Nossos dados também mostraram que a diálise foi eficiente, visto que houve uma redução significativa de AR em todas as amostras

TABELA 16 – Atividade de açúcar redutor nos complexos e enzimas utilizadas nos experimentos *In Vivo*¹.

Tratamento	Açúcar redutor total (mg/ml)	Açúcar redutor após diálise (mg/ml)
Phy+Pro+Cho	37,44 ± 0,16 a	0,07 ± 0,01 d
Pro+Cel	0,00 ± ND	0,00 ± ND
Xly+Ami+Pro	17,82 ± 0,78 c	0,00 ± ND
α -gal	1,41 ± 0,37 d	0,00 ± ND
PhyB	17,57 ± 0,13 c	0,57 ± 0,02 c
PhyC	33,92 ± 1,43 b	0,70 ± 0,09 b
PhyD	36,76 ± 1,54 a	2,05 ± 0,10 a
Valor de p	<0,001	<0,001
CV(%)	3,79	8,04

¹Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística significativa (Tukey, 5%).

ND – Desvio não detectado

Phy – Fitase; Pro – Protease; Cel – Celulase; Xly – Xilanase; Cho – Carboidrases; α -gal – α -galactosidase; PhyB – 6-Fitase (5000 U/g); PhyC – 3-Fitase (10.000 FTU/g); PhyD 6-Fitase (5000 U/g);

CV – Coeficiente de variação

4.3.3 Determinação da atividade de β -1,3-glucanase.

A avaliação da atividade enzimática de β -1,3-glucanase demonstrou que houve uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras, com maior atividade na amostra Phy+Pro+Cho (Tabela 17). Este resultado confirma os níveis de garantia do produto fornecido, onde apresenta atividade de β -1,3-glucanase na sua formulação.

β -1,3-Glucanases são enzimas que hidrolisam ligações glicosídicas do tipo β -1,3 presentes em β -D-glucanas, liberando glicose como produto principal⁸¹. A viscosidade é um dos maiores efeitos dos β -glucanos, adicionando assim, a enzima β -1,3-glucanase com objetivo de diminuir os efeitos negativos dos β -glucanos, através da diminuição do seu grau de polimerização, o que contribui para a diminuição da viscosidade do conteúdo digestivo²⁰.

Outra forma de determinar a atividade de uma enzima é por atividade específica (U/mg de proteína). Neste caso a quantidade de proteína total das amostras tem uma importância fundamental. Coincidentemente, a maior atividade específica encontrada foi da amostra Phy+Pro+Cho (TABELA 17). Particularmente, o fato da amostra Phy+Pro+Cho ter demonstrado maior atividade para esse ensaio é de que este complexo apresenta em sua junção de enzimas pertencentes ao grupo de carboidratases (Cho), a enzima β -1,3-glucanase, comprovando assim a maior atividade.

TABELA 17 - Atividade de β -glucanase das amostras de complexos e enzimas utilizadas nos experimentos *In Vivo*¹.

Tratamento	Atividade enzimática (mg/ml)	Atividade específica (U/mg de Proteína)
Phy+Pro+Cho	6,98 $\pm$ 0,30 a	180,67 $\pm$ 9,80 a
Pro+Cel	0,36 $\pm$ 0,00 d	29,09 $\pm$ 0,24 d
Xly+Ami+Pro	2,95 $\pm$ 0,12 b	17,86 $\pm$ 0,75 e
α -gal	0,28 $\pm$ 0,00 d	43,81 $\pm$ 1,25 c
PhyB	0,89 $\pm$ 0,20 c	46,45 $\pm$ 1,51 c
PhyC	1,21 $\pm$ 0,06 c	12,58 $\pm$ 0,66 e
PhyD	3,33 $\pm$ 0,40 b	102,64 $\pm$ 14,6 b
Valor de p	<0,001	<0,001
CV(%)	10,25	10,86

¹Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística significativa (Tukey, 5%).

Phy – Fitase; Pro – Protease; Cel – Celulase; Xly – Xilanase; Cho – Carboidrases; α -gal – α -galactosidase; PhyB – 6-Fitase (5000 U/g); PhyC – 3-Fitase (10.000 FTU/g); PhyD 6-Fitase (5000 U/g);

CV – Coeficiente de variação

4.3.4 Determinação de Xilanase.

A avaliação da atividade enzimática e atividade específica de xilanase demonstrou que houve uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras, com maior atividade da amostra Xly+Ami+Pro, seguida da amostra Phy+Pro+Cho (Tabela 17). Estes resultados confirmam os níveis de garantia do produto fornecido, onde apresenta uma maior atividade de xilanase das amostras Xly+Ami+Pro na sua formulação. Entretanto, todas as mostras apresentaram atividade de xilanase, o que em alguns casos não são relatados nos níveis de garantia dos produtos.

As xilanases são responsáveis pela degradação de arabinoxilanas presentes na parede das células vegetais que são parcialmente solúveis em água, e na forma hidratada resulta em uma solução aquosa altamente viscosa⁸². Portanto quanto maior a atividade de xilanase nos tratamentos, maior será a degradação desses compostos nos alimentos utilizados, melhorando assim a disponibilidade dos nutrientes²⁰.

Schoulten *et al*⁸³ avaliando uma dieta com base em milho, farelo de soja e farelo de arroz com inclusão de xilanase observou efeito significativo ($p < 0,01$) para desempenho, demonstrando a efetividade da xilanase em reduzir os efeitos negativos provocados pelos polissacarídeos não-amídicos do farelo de arroz.

TABELA 18 - Atividade de Xilanase das amostras de complexos e enzimas utilizadas nos experimentos *In Vivo*¹.

Tratamento	Atividade enzimática (mg/ml)	Atividade específica (U/mg de Proteína)
Phy+Pro+Cho	146,8 ± 0,63 b	3797 ± 16,48 b
Pro+Cel	18,77 ± 1,88 e	1497 ± 150,6 e
Xly+Ami+Pro	153,6 ± 0,21 a	9449 ± 13,19 a
α-gal	20,33 ± 0,87 e	3012 ± 129,9 c
PhyB	42,86 ± 1,50 d	2215 ± 77,82 d
PhyC	16,44 ± 0,66 f	169 ± 6,90 f
PhyD	68,95 ± 1,40 c	2140 ± 43,48 d
Valor de p	<0,001	<0,001
CV(%)	10,25	2,60

¹Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística significativa (Tukey, 5%).

Phy – Fitase; Pro – Protease; Cel – Celulase; Xly – Xilanase; Cho – Carboidrases; α-gal – α-galactosidase; PhyB – 6-Fitase (5000 U/g); PhyC – 3-Fitase (10.000 FTU/g); PhyD 6-Fitase (5000 U/g);

CV – Coeficiente de variação

4.3.5 Determinação de CMCase.

A avaliação da atividade enzimática e atividade específica de CMCase demonstrou que houve uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras, com maior atividade das amostras α -gal e Phy D (Tabela 19). Visto isso, os valores elevados nas amostras de α -gal e PhyD não correspondem aos descritos nos níveis de garantia do produto fornecido, pois apresentam apenas atividades de α -galactosidade e fitase.

A atividade de CMCase, representa a dosagem de endoglucanases. As endoglucanases são enzimas capazes de hidrolisar a celulose (tipo de polissacarídeo não amiláceo) liberando oligossacarídeos solúveis⁸⁴. O fato de estas amostras apresentarem atividade de CMCase não é um problema, visto que as amostras podem apresentar maior capacidade de degradação da celulose.

TABELA 19 - Atividade de CMCase das amostras de complexos e enzimas utilizadas nos experimentos *In Vivo*¹.

Tratamento	Atividade enzimática (mg/ml)	Atividade específica (U/mg de Proteína)
Phy+Pro+Cho	3,67 $\pm$ 0,21 b	94,93 $\pm$ 5,47 c
Pro+Cel	0,89 $\pm$ 0,08 c	71,55 $\pm$ 6,82 d
Xly+Ami+Pro	1,08 $\pm$ 0,12 c	66,42 $\pm$ 6,51 d
α -gal	4,18 $\pm$ 0,22 a	619 $\pm$ 32,9 a
PhyB	0,91 $\pm$ 0,74 c	47,14 $\pm$ 38,2 d
PhyC	1,26 $\pm$ 0,10 c	13,08 $\pm$ 1,09 e
PhyD	4,48 $\pm$ 0,45 a	139,2 $\pm$ 14,1 b
Valor de p	<0,001	<0,001
CV(%)	10,25	13,47

¹Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística significativa (Tukey, 5%).

Phy – Fitase; Pro – Protease; Cel – Celulase; Xly – Xilanase; Cho – Carboidrases; α -gal – α -galactosidase; PhyB – 6-Fitase (5000 U/g); PhyC – 3-Fitase (10.000 FTU/g); PhyD 6-Fitase (5000 U/g);

CV – Coeficiente de variação

4.3.6 Determinação de FPase.

A avaliação da atividade enzimática e atividade específica de FPase demonstrou que houve uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras, com maior atividade nas amostras de Xly+Ami+Pro, seguido pela amostra α -gal (Tabela 20). Estes resultados discordam das informações descritas nos níveis de garantia de ambos os produtos. As amostras que realmente apresentam celulase

em sua composição apresentaram valores inferiores comparados a estas descritas acima.

De acordo com Vilela⁸⁵ a atividade de FPase expressa a atividade de celulase total (endoglucanases, exoglucanases, β -glicosidades), que é responsável por degradar a celulose em glicose. Maiores valores de atividade para FPase podem representar maior concentração das enzimas endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidades, o que pode favorecer a degradação da celulose pela enzima ou complexo enzimático.

TABELA 20 - Atividade de FPase nas amostras dos complexos e enzimas utilizadas nos experimentos *In Vivo*¹.

Tratamento	Atividade enzimática (mg/ml)	Atividade específica (U/mg de Proteína)
Phy+Pro+Cho	1,10 $\pm$ 0,78 b	28,59 $\pm$ 1,80 c
Pro+Cel	0,32 $\pm$ 0,40 b	26,28 $\pm$ 13,5 c
Xly+Ami+Pro	5,40 $\pm$ 1,04 a	332 $\pm$ 64,5 a
α -gal	1,27 $\pm$ 0,62 b	206 $\pm$ 116 b
PhyB	0,76 $\pm$ 0,03 b	39,48 $\pm$ 32,1 b
PhyC	0,41 $\pm$ 0,17 b	4,27 $\pm$ 0,39 c
PhyD	0,81 $\pm$ 0,06 b	25,15 $\pm$ 12,6 c
Valor de p	<0,001	<0,001
CV(%)	20,60	55,08

¹Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística significativa (Tukey, 5%).

Phy – Fitase; Pro – Protease; Cel – Celulase; Xly – Xilanase; Cho – Carboidrases; α -gal – α -galactosidase; PhyB – 6-Fitase (5000 U/g); PhyC – 3-Fitase (10.000 FTU/g); PhyD 6-Fitase (5000 U/g);

CV – Coeficiente de variação

4.3.7 Determinação de Amilase.

A avaliação da atividade enzimática e atividade específica de Amilase demonstrou que houve uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras, demonstrando maior atividade na amostra Pro+Cel (Tabela 21). Este resultado discorda dos níveis de garantia do produto fornecido, que relata ter apenas protease e celulase nesta amostra. A alta atividade de amilase encontrada pode ser devido aos processos de produção destas enzimas.

A amostra PhyC também demonstra contradição quando comparada as informações contidas no rótulo desta, apresentando alto valor de atividade específica para amilase, enquanto a sua composição é uma fitase. Outra amostra discrepante também é proveniente de uma fitase, a amostra PhyD, que também não apresenta informações sobre amilase no rótulo.

A amilase, também chamada de diástase, é uma enzima que catalisa a liberação das ligações glicosídicas 1-4 do amido e glicogênio⁵³. Ou seja, quanto maior a concentração de amilase no complexo ou enzima, mais rapidamente será o tempo de hidrólise do amido. Gracia *et al*⁸⁶ avaliando a inclusão de amilase em dietas a base de milho, observou diferença significativa ($p < 0,05$) em relação a conversão alimentar do grupo suplementado com amilase ao grupo controle, demonstrando a eficiência da amilase em melhorar a conversão alimentar.

TABELA 21 - Atividade de Amilase nas amostras dos complexos e enzimas utilizadas nos experimentos *In Vivo*¹.

Tratamento	Atividade enzimática (mg/ml)	Atividade específica (U/mg de Proteína)
Phy+Pro+Cho	3,23 ± 0,13 c	83,73 ± 3,49 b
Pro+Cel	15,2 ± 0,08 a	1213 ± 28,6 b
Xly+Ami+Pro	0,90 ± 0,60 e	55,51 ± 3,74 c
α-gal	0,02 ± 0,01 f	4,23 ± 1,54 d
PhyB	0,02 ± 0,07 f	1,10 ± 0,37 d
PhyC	8,32 ± 0,42 b	86,05 ± 4,34 b
PhyD	1,32 ± 0,05 d	41,13 ± 1,62 c
Valor de p	<0,001	<0,001
CV(%)	5,23	5,25

¹Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística significativa (Tukey, 5%).

Phy – Fitase; Pro – Protease; Cel – Celulase; Xly – Xilanase; Cho – Carboidrases; α-gal – α-galactosidase; PhyB – 6-Fitase (5000 U/g); PhyC – 3-Fitase (10.000 FTU/g); PhyD 6-Fitase (5000 U/g);

CV – Coeficiente de variação

4.3.8 Determinação de Pectinase

A avaliação da atividade enzimática e atividade específica de Pectinase demonstrou que houve uma diferença significativa ($p < 0,05$), entre as amostras, demonstrando o maior valor na amostra Xly+Ami+Pro (Tabela 22). Estes resultados discordam das informações dispostas nos níveis de garantia do produto fornecido, pois não existe informação da presença de pectinase na sua fórmula básica.

Outras amostras também demonstraram altos valores de atividade específica de pectinase, a amostra de Pro+Cel não demonstra em seus níveis de garantia a presença de pectinase, assim como a amostra de Phy B que apresenta valor expressivo, apresentando em seus níveis de garantia do produto somente a enzima fitase.

Pectinases são enzimas que atuam sobre a pectina, um polissacarídeo presente na parede celular vegetal⁸⁷. Possivelmente, quanto maior a concentração de pectinase nos complexos ou enzimas, maior será a degradação de pectina. Igbasan *et al*⁸⁸ apesar de não constatarem diferenças significativas ($p>0,05$), demonstraram que a adição de pectinases em rações a base de milho apresentaram um tendência de valores maiores de peso médio aos 16 dias de idade do que o grupo controle.

TABELA 22 - Atividade de Pectinase nas amostras dos complexos e enzimas utilizadas nos experimentos *In Vivo*¹

Tratamento	Atividade enzimática (mg/ml)	Atividade específica (U/mg de Proteína)
Phy+Pro+Cho	5,29 ± 0,49 b	153,8 ± 12,8 c
Pro+Cel	4,50 ± 0,51 c	359,5 ± 40,8 b
Xly+Ami+Pro	7,18 ± 0,52 a	441,7 ± 32,4 a
α-gal	0,00 ± ND	0,00 ± ND
PhyB	2,55 ± 0,61 d	131,8 ± 31,6 d
PhyC	0,79 ± 0,63 e	8,217 ± 6,55 b
PhyD	1,44 ± 0,39 e	44,87 ± 12,3 c
Valor de p	<0,001	<0,001
CV(%)	14,34	13,75

¹Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística significativa (Tukey, 5%).

Phy – Fitase; Pro – Protease; Cel – Celulase; Xly – Xilanase; Cho – Carboidrases; α-gal – α-galactosidase; PhyB – 6-Fitase (5000 U/g); PhyC – 3-Fitase (10.000 FTU/g); PhyD 6-Fitase (5000 U/g);

CV – Coeficiente de variação

4.3.9 Determinação de Fosfatase ácida.

A avaliação da atividade enzimática e atividade especificam de fosfatase ácida demonstrou que houve uma diferença significativa ($p<0,05$) entre as amostras. A amostra Phy+Pro+Cho foi a que apresentou uma maior atividade de fosfatase ácida (Tabela 23). Este resultado concorda com as informações contidas nos níveis de garantia do produto fornecido. Também foi observado que as amostras PhyB, PhyC e Phy D não apresentaram valores consideráveis de fosfatase ácida.

As enzimas denominadas de fosfatase ácida tem a capacidade de remover grupos fosfato de uma grande diversidade de moléculas⁸⁹. O fósforo de origem vegetal esta normalmente na forma de fitato, molécula formada por um anel de inositol com seis grupos fosfatos. A maior concentração de fosfatase ácida em uma amostra poderá causar um maior hidrolise dos grupos fosfatos do fitato, e

consequentemente melhorando o desempenho animal. A fitase é uma fosfatase que catalisa o desdobramento do radical fosfatado do inositol, liberando o grupo fosfato²⁰.

Brandão *et al*⁴³ avaliando a utilização de fitase sobre o desempenho de frangos de corte, encontrou efeitos significativo ($p < 0,05$), demonstrando maior ganho de peso as aves que foram suplementadas com fitase em relação ao grupo controle. Costa *et al*⁴² também observaram efeitos significativos ao utilizar fitase, demonstrando melhores resultados de ganho de peso e conversão alimentar aos 7 dias de idade em relação ao grupo controle.

TABELA 23 - Atividade de Fosfatase nas amostras dos complexos e enzimas utilizadas nos experimentos *In Vivo*¹.

Tratamento	Atividade enzimática (mg/ml)	Atividade específica (U/mg de Proteína)
Phy+Pro+Cho	$1,91 \pm 0,05$ a	$50,56 \pm 1,37$ a
Pro+Cel	$0,11 \pm 0,001$ d	$9,55 \pm 0,13$ c
Xly+Ami+Pro	$0,013 \pm 0,009$ e	$0,84 \pm 0,56$ e
α -gal	$0,10 \pm 0,01$ d	$14,93 \pm 1,85$ b
PhyB	$0,01 \pm 0,01$ e	$0,77 \pm 0,61$ e
PhyC	$0,57 \pm 0,01$ b	$5,93 \pm 0,17$ d
PhyD	$0,28 \pm 0,007$ c	$8,83 \pm 0,24$ c
Valor de p	<0,001	<0,001
CV(%)	5,14	7,17

¹Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística significativa (Tukey, 5%).

Phy – Fitase; Pro – Protease; Cel – Celulase; Xly – Xilanase; Cho – Carboidrases; α -gal – α -galactosidase; PhyB – 6-Fitase (5000 U/g); PhyC – 3-Fitase (10.000 FTU/g); PhyD 6-Fitase (5000 U/g);

CV – Coeficiente de variação

4.3.10 Determinação de Protease

A avaliação da atividade enzimática e atividade específica de Protease demonstrou que houve uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras. A amostra Phy+Pro+Cho apresentou a maior atividade enzimática, porém a amostra α -gal demonstrou maior atividade específica (Tabela 23). Estes dados discordam dos dados apresentados nos níveis de garantia do produto.

As proteases são enzimas que catalisam reações de hidrólise de proteínas liberando peptídeos e aminoácidos⁹⁰. As proteases podem aumentar a digestibilidade dos aminoácidos e reduzir a excreção de nitrogênio²⁰. Uma maior concentração de protease nos complexos ou enzimas estudados pode influenciar positivamente no desempenho das aves. Mayorga⁹¹ observou efeito positivo no

ganho de peso e conversão alimentar aos 14 dias de idade em frangos suplementados com protease em relação ao grupo controle.

TABELA 24 - Atividade de Protease nas amostras dos complexos e enzimas utilizadas nos experimentos *In Vivo*¹

Tratamento	Atividade enzimática (mg/ml)	Atividade específica (U/mg de Proteína)
Phy+Pro+Cho	0,93 ± 0,03 a	24,07 ± 0,91 d
Pro+Cel	0,75 ± 0,17 b	60,34 ± 14,1 b
Xly+Ami+Pro	0,60 ± 0,008 b	37,17 ± 0,50 c
α-gal	0,63 ± 0,02 b	93,66 ± 4,07 a
PhyC	0,88 ± 0,006 a	9,18 ± 0,17 e
PhyD	0,61 ± 0,01 b	9,05 ± 0,56 d
Valor de p	<0,001	<0,001
CV(%)	9,72	14,21

¹Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística significativa (Tukey, 5%).

Phy – Fitase; Pro – Protease; Cel – Celulase; Xly – Xilanase; Cho – Carboidrases; α-gal – α-galactosidase; PhyB – 6-Fitase (5000 U/g); PhyC – 3-Fitase (10.000 FTU/g); PhyD 6-Fitase (5000 U/g);

CV – Coeficiente de variação

Com base nos resultados desses ensaios podemos entender parte dos resultados de desempenho, onde demonstraram que os tratamentos Phy+Pro+Cho/Pro+Cel/α-gal e Xly+Amy+Pro/PhyB/α-gal apresentaram efeitos significativos ($p < 0,05$) em relação aos demais tratamentos até os 14 dias de idade.

O tratamento Phy+Pro+Cho/Pro+Cel/α-gal utilizado nos experimentos *In Vivo* foi composto pelo complexo Phy+Pro+Cho que apresentou maiores valores de atividade específica para β-1,3-glucanase (40% maior do que a segunda maior atividade específica) e fosfatase ácida (70% maior do que a segunda maior atividade), pelo complexo Pro+Cel que apresentou maior atividade específica para Amilase (90% maior do que a segunda maior atividade) e pela a enzima α-gal que apresentou maior atividade específica de Protease (35% maior do que a segunda maior atividade específica).

Já o tratamento Xly+Amy+Pro/PhyB/α-gal utilizado nos experimentos *In Vivo* foi composto pelo complexo Xly+Amy+Pro que apresentou maior atividade específica de Xilanase (60% maior do que a segunda maior atividade específica), FPase (37% maior do que a segunda maior atividade específica) e Pectinase (22% maior do que a segunda maior atividade) e pela enzima α-gal que apresentou

maior atividade específica de Protease (35% maior do que a segunda maior atividade específica).

É importante ressaltar que sempre que um desses complexos (Phy+Pro+Cho, Pro+Cel, Xly+Amy+Pro) e a enzima α -gal apresentavam maiores valores de atividade nos ensaios, a segunda maior atividade específica estava relacionada aos mesmos citados acima, sendo observada exceções no valor de atividade específica de CMCase, onde a amostra PhyD apresentou maior valor e no ensaio de β -1,3-glucanase, apresentando a segunda maior atividade específica, outra exceção é a amostra de PhyC que apresentou o segundo maior valor de atividade específica no ensaio de Amilase.

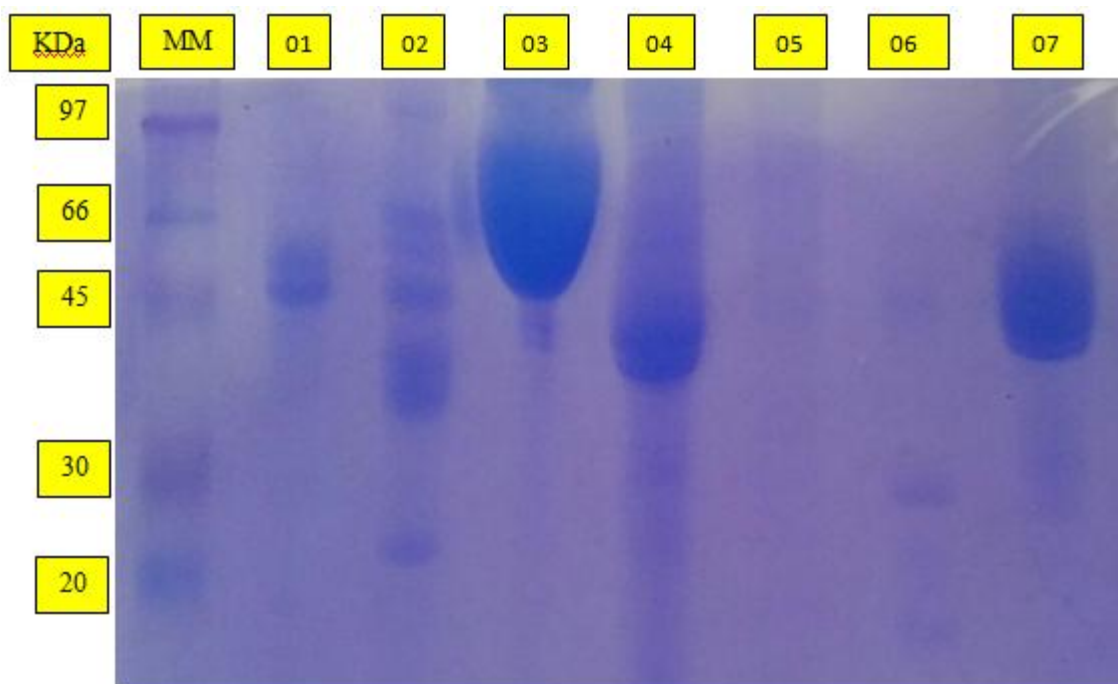


Figura 3 - Eletroforese desnaturante realizada sobre as amostras dos produtos. Legenda: 01- α -gal; 02 – Pro+Cel; 03 – PhyC; 04 – PhyD; 05 – Phy+Pro+Cho; 06 – Xly+Ami+Pro; 07 – PhyD.

5. CONCLUSÃO

A inclusão dos complexos enzimáticos Phy+Pro+Cho/Pro+Cel/ α -gal e Xly+Amy+Pro/PhyB/ α -gal nas rações pode ser utilizada até aos 14 dias de idade com o objetivo de melhorar o peso final e ganho de peso. No objetivo de melhoria do CMEE na fase de crescimento, os complexos enzimáticos Phy+Pro+Cho/Pro+Cel e Phy+Pro+Cho/ α -gal podem ser utilizados como alternativa.

Os ensaios *In Vitro* realizados podem direcionar a utilização dos complexos e enzimas estudadas nesse trabalho para futuros trabalhos com diferentes fontes de alimentos em diferentes fases, podendo evidenciar ainda mais os efeitos da suplementação enzimática.

6. REFERÊNCIAS

1. USDA. Livestock and Poultry: World Markets and Trade. United State Department of Agriculture – Foreign Agricultural Service. October, 2015, 21p;
2. STELLA, B.L., SAAB, M., NEVES, M.F., CLÁUDIO, L.D.G. O desafio da coordenação e seus impactos sobre a competitividade de cadeias e sistemas agroindustriais. R. Bras. Zootec., v.38, p.412-422, 2009;
3. COWIESON, A.J., SINGH, D.N., ADEOLA, O. Prediction of ingredient quality and the effect of a combination of xylanase, amylase, protease and phytase in the diets of broiler chicks. 1. Growth performance and digestible nutrient intake. British Poultry Science, v.47, n.4, p.477-489, 2007;
4. OLUKOSI, O. A., COWIESON, A. J., ADEOLA, O. Age-related influence of a cocktail of xylanase, amylase, and protease or phytase individually or in combination in broilers. Poultry Science, v.86, p.77-86, 2007;
5. SHIRMOHAMMAD, F., MEHRI, M. Effects of dietary supplementation of multi-enzyme complex on the energy utilization in rooster and performance of broiler chicks. African Journal of Biotechnology, v.10, n.38, p.7541-7547, 2011;
6. TANG, D., HAO, S., LIU, G., NIAN, F., RU, Y. Effects of maize source and complex enzymes on performance and nutrient utilization of broilers. Asian Australasian Journal of Animal Sciences, v.27, n.12, p.1755-1762, 2014;
7. FISCHER, G., MAIER, J.C., RUTZ, F. BERMUDEZ, V.L. Desempenho de frangos de corte alimentados com dietas à base de milho e farelo de soja, com ou sem adição de enzimas. Revista Brasileira de Zootecnia, v.31, n.1, p. 402-410, 2002;
8. LIMA, A.C.F., MACARI, M., PIZAULO JUNIOR, JM, MALHEIROS, E.B. Pancreatic enzymatic activity of broiler fed with diets containing enzyme or probiotic. Brazilian Journal of Poultry Science. v.4, n.3, p.187-193, 2002;
9. SARTORI, J. R. Uso de enzimas em rações. Revista alimentação animal, Rio de Janeiro, n.1, p. 11-13, 1999;
10. LONGO, F.A., MENTEN, J.F.M., PEDROSO, A.A., FIGUEIREDO, A.N., RACANICCI, A.M.C, SORBARA, J. O. B. Performance and carcass composition of broilers fed different carbohydrate and protei sources in the prestarter phase. Journal of Applied Poultry Research. V.16, p.171-177, 2007;
11. DOSKOVIC, V., BOGOSAVLJEVIC-BOSKOVIC, S., PAVLOVSKI, Z., MILOSEVIC, B., SKRBIC, Z., RAKONJAC, S., PETRICEVIC, V. Enzymes in broiler diets with special reference to protease. Word's Poultry Science Journal, v. 69, p. 343-359, 2013;
12. ROSIN, E.A., BLANK, G., SLOMINSKI, B.A., HOLLEY, R.A. Enzyme supplements in broiler chicken diest in vitro and in vivo effects on bacterial

growth. Journal of the Science of Food and Agriculture. V. 87, p. 1009-1020, 2007;

13. MARQUARDT, R.R., BEDFORD, M.R. Future horizons. In: BEDFORD, M.R., PARTRIDGE, G.G. Enzymes in farm animal nutrition. Londres: Cab International, 2011. p.389-398;

14. PESSÔA, G.B.S. Dissertação: Avaliação do complexo enzimático em dietas para frangos de corte. Mestrado em Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa – MG, 2010, 75p;

15. FRY, R. E. Influence of enzyme supplementation and water treatment on the nutritive value of different grains for poultry. Poultry Science, Champaign, v.87; n;2, p.372-375, 1958;

16. ALBINO, L. F. T.; BÜZEN, S.; ROSTAGNO, H. Ingredientes Promotores de Desempenho para Frangos de Corte. In: SEMINÁRIO DE AVES E SUÍNOS – AVESUI REGIÕES, 7., 2007, Belo Horizonte. Anais... Belo Horizonte: 2007. p.73-90;

17. DESSIMONI, G.V. Dissertação: Planos nutricionais com suplementação de protease em dietas de frangos de corte. Mestrado em Zootecnia, Universidade Federal do Vale do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina - MG, 2011, 48p;

18. LEITE, P. R. S. C. Dissertação: Digestibilidade dos nutrientes da ração e desempenho de frangos de corte alimentados com rações formuladas com milho ou sorgo e suplementadas com enzimas. Mestrado em Ciência Animal, Universidade Federal de Goiás, Goiânia - GO, 2009, 78p;

19. MAPA. Instrução Normativa 013/2014. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. 2014.

20. SAKOMURA, N. K., BARBOSA, N. A. A., DOURADO, L. R. B. Enzimas na Nutrição de Monogástricos. In: SAKOMURA, N. K., SILVA, J. H. V., COSTA, F. G. P., FERNANDES, J. B. K., HAUSCHILD, L. Nutrição de Não Ruminantes (1ºEd) 2014, 677p;

21. GENTILINI, F.P., ANCIUTI, M.A. Tópicos atuais na produção de suínos e aves. Disponível: http://www.ifsul.edu.br/index.php?option=com_docman&Itemid=180. Acesso em: 28/05/2014;

22. MENEGHETTI, C. Tese: Associação de enzimas em rações para frangos de corte. Doutorado em Zootecnia – Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG, 2013, 96 p;

23. OFICCER, D.I. Feed enzymes. In: D`MELLO, J.P.F Farm animal metabolism and nutrition. Edinburgh: Cab International, 2000, p.405-426;

24. KHATTAK, F. M., PASHA, T. N., HAYAT, Z., MAHMUD, A. Enzymes in Poultry Nutrition. J. Anim. Pl. Sci. 16, 2006;

25. MAHAGNA, M., NIR, I., LABIER, M., NITZAN, S. Effects of age and exogenous amylase and protease on development of the digestive tract, pancreatic enzyme activities and digestibility of nutrients in Young meat-type chicks. *Repro. Nutr. Dev.* 1995; 35 (2):201-12;
26. RAVIDRAN, V. Feed enzymes: The science, practice, and metabolic realities. 2013 *J. Appl. Poult. Res.* 22 :628–636;
27. DOURADO, L.R.B. Enzimas exógenas em dietas para frangos de corte. PhD Dissertação. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2008.
28. PEREIRA, P. W. Z. Dissertação: Avaliação de complexo enzimático e betaína natural nas rações de frangos de corte criados em aviário comercial. Mestrado em Agronomia, Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz, Piracicaba - SP, 2008, 63p;
29. OTT, R.P. Dissertação: Utilização de Carboidrases em dietas para frangos de corte. Mestrado em Zootecnia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, 2005, 83p;
30. SENS, R. F. Dissertação: Avaliação da suplementação das enzimas xilanase e β -mananase em rações para perus. Mestrado em Ciências Veterinárias. Universidad Federal do Paraná, Curitiba – PR, 2009, 70p;
31. GUENTER, M. Impact of feed enzymes on nutrient utilization of ingredient in growing poultry. *Journal of Applied Poultry Research*, Athens, v. 2, n. 1, p. 82-84, 1993;
32. ZANELLA, I.; SAKOMURA, N. K.; SILVERSIDES, F. G.; FIQUEIRDO, A.; PACK, M. Effect of enzyme supplementation of broiler diets based on corn and soybeans. *Poultry Science*, v. 78, 561-568p, 1999;
33. CHOCT, M. Enzymes for the fed industry: Past, present and future. *World's Poultry Science Journal*. 2006, 62-5-16;
34. LIMA, M. R., SILVA, J. H. V., ARAUJO, J. A., LIMA, C. B. OLIVEIRA, E. R. A. Enzimas exógenas na alimentação de aves. *Acta Veterinaria Brasilica*, v.1, n.4, p.99-110, 2007
35. LEITE, P. R. S. C., MENDES, F. R., LUZIA, M., PEREIRA, R., LACERA, M. J. R. Limitações da utilização da soja integral e farelo de soja na nutrição de frangos de corte. *Enciclopédia Biosfera*, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v.8, n.15; p. 2012;
36. COWIESON, A. J.; HRUBY, M.; PIERSON, E. E. M. Evolving enzyme technology: Impact on commercial poultry nutrition. *Nutrition Research Reviews*, Cambridge, v. 19,n. 1, p. 1-15, 2006;

37. WANG, J.J., GARLICH, J.D., SHIH, J.C.H.. Beneficial effects of versazyme, a keratinase feed additive, on body weight, feed conversion, and breast yield of broilers chickens. *J. Appl. Poult. Res.* 15:544-550, 2006;
38. FREITAS, D. M. Desempenho de frangos de corte e digestibilidade ileal de dietas suplementadas com protease. Mestrado em Zootecnia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, 2010, 111p;
39. MATIAS, C. F. Q. Protease na alimentação de frangos de corte. Mestrado em Zootecnia. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – MG, 2012, 63p;
40. OXENBOLL, K. M; PONTOPIDDAN, K; FRU-NJI, F. Use of a Protease in poultry feed offers promising environmental benefits. *International Journal of Poultry Science* 10 (11): 842-848p, 2011;
41. MENEGHETTI, C., BERTECHINI, A. G., RODRIGUES, P. B., FASSANI, E. J.; BRITO, J. A. G., REIS, M. P., GARCIA JUNIOR, A. A. P. Altos níveis de fitase em rações para frangos de corte. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.63, n.3, p.624-632, 2011;
42. COSTA, F. G. P., BRANDÃO, P. A., BRANDÃO, J. S., SILVA, J. H. V. Efeito da enzima fitase nas rações de frangos de corte, durante as fases pré-inicial e inicial. *Ciênc. agrotec.*, Lavras, v. 31, n. 3, p. 865-870, maio/jun., 2007;
43. BRANDÃO, P. A., PERAZZO, F. G., BRANDÃO, J. S., SILVA, J. H. V. Efeito da adição de fitase em rações de frangos de corte, durante as fases de crescimento e final. *Ciênc. agrotec.*, Lavras, v. 31, n. 2, p. 492-498, mar./abr., 2007;
44. LACERDA, E. G. Adição de fitase de frangos de corte no período de 1 a 42 dias de idade. Mestrado em Ciência Animal. Centro Universitário de Vila Velha, Vila Velha – ES, 2010, 63p;
45. FRANCESCH, M.; GERAERT, P. A. Enzyme complex containing carbohydrases and phytase improves growth performance and bone mineralization of broilers fed reduced nutrient corn-soybean-based diets. *Poultry Science* 88 :1915–1924, 2009;
46. CAFÉ, M. B.; BORGES, C. A.; FRITTS, C.A.; WALDROUP, P.W. Avizyme improves performance of broilers fed corn-soybean meal-based diets. *Journal of Applied Poultry Research*, v. 11, p. 29-33, 2002;
47. LEITE, P. R. S. C.; CAFÉ, M. B.; LEANDRO, N. S. M.; STRINGHINI, J. H. GOMES, N. A.; JARDIM FILHO, R. M. Desempenho de frangos de corte e digestibilidade de rações com sorgo ou milho e complexo enzimático. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.46, n.3, p.280-286, mar. 2011;

48. MASCARELL J., RYAN, M., Technical aspects of enzyme utilization : Dry vs liquid enzymes. In : Moran d-Feh r P. (ed.). Feed manufacturing in Southern Europe: New challenges. Zaragoza : CIHEAM, 1997 . p. 161 -174;
49. SINGH, P.K. Significance of phytic acid and supplemental phytase in chicken nutrition: a review. World's Poultry Science Journal, v.64, p.553-580, 2008;
50. COLOMBATTO, D.; MOULD, F. L.; BHAT, M. K. In vitro evaluation of fibrolytic enzymes as additives for maize (*Zea mays* L.) silage. III. Comparison of enzymes derived from psychrophilic or thermophilic, mesophilic source. Animal Feed science and Technology, v. 11, p. 145-159, 2003;
51. KUNG, L. JR. Enzyme for lactating dairy cows: News theories and applications. In: 12 Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium. Proceedings... Florida, p 29-43, 2002;
52. REIS, T.A.F.C.; DIAS, F. M. V.; FONTES, C. M. G. A.; SOARES, M. C.; FERREIRA, L. M. A. Avaliação do potencial biotecnológico de xilanases do *Clostridium thermocellum* e *Cellvibrio mixtus*: sua utilização na suplementação de dietas à base de trigo para frango de corte. Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias, v 96, p 125-134, 2001;
53. MARQUES, S.F.F. Biotecnologia enzimática: produção de complexo multienzimático de *Trichoderma harzianum* e sua aplicação na alimentação de frangos de corte. Mestrado em Ciência Animal. Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO, 92p, 2007;
54. ROSTAGNO HS, ALBINO LFT, DONZELE JL, GOMES PC, OLIVEIRA RF, LOPES DC, FERREIRA AS, BARRETO SLT, EUCLIDES RF. Tabelas brasileiras para aves e suínos. 3ed. Viçosa: UFV, 2011. 252p;
55. R DEVELOPMENT CORE TEAM R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL: <http://www.R-project.org>, 2010;
56. SILVA, D.J.; QUEIROZ, A. C. Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos 3º Ed. Viçosa, MG: UFV, p.235, 2002;
57. MATTERSON, L.D.; PORTTER, L.M.; STUTZ, M.W.. SINGSEN, E.P. The metabolizable energy of feeds ingredients for chickens, Connecticut: University of Connecticut Press. 1965. p 11;
58. NOY, Y.; SKLAN, D. Nutrient use in chicks during the first week posthatch. Poultry Science, Champaign, v.81, p.391-399, 2002;
59. BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, p.248-254, 1976;
60. MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugar. Analytical Chemistry, v. 31, p. 426-428, 1959.

61. LEITÃO, V.O.; LIMA, R. C. M.; VAINSTEIN, M. H.; ULHOA, C. J. Purification and characterization of an acid phosphatase from *Trichoderma harzianum*. *Biotechnology Letters*, v.32, p.1083-1088, 2010;
62. AIRES, R.S.; STEINDORFF, A. S.; RAMADA, M.H.S.; SIQUEIRA, S.J.L.; ULHOA, C.J. Biochemical characterization of a 27 kDa 1,3--d-glucanase from *Trichoderma asperellum* induced by cell wall of *Rhizoctonia solani*. *Carbohydrate Polymers* 87. (2012) 1219–1223;
63. CABRAL, C. M.; CHERQUI, A.; PEREIRA, A.; SIMÕES, N. Purification and Characterization of Two Distinct Metalloproteases Secreted by the Entomopathogenic Bacterium *Photobacterium* sp. Strain Az29. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 70 (7). p. 3831-3838. 2004;
64. LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, London 227,680- 685, 1970;
65. FERNANDES, J.I.M.; BORTOLUZZI, C.; BURIN JUNIOR, A. M.; PERINI, R.; CRISTO, A.B. Effect of different enzymatic supplements in diets of broilers raised at high stocking density. *Journal of Veterinary Medicine and Research*, 2(1): 1016, 2015;
66. NASCIMENTO, I.M.S.O.; Efeito do complexo enzimático associado ao balanço eletrolítico ou níveis de sódio para frangos. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba - PR, 2011, 72p;
67. CARVALHO, J.C.C.; BERTECHINI, A.G.; FASSANI, E.J.; RODRIGUES, P.B.; PEREIRA, R.A.N. Desempenho e características de carcaça de frangos de corte alimentados com dietas à base de milho e farelo de soja suplementadas com complexos enzimáticos. *R. Bras. Zootec.*, v.38, n.2, p.292-298, 2009;
68. DALÓLIO, F.S. Frangos de corte submetidos às dietas contendo complexo enzimático SSF (solid state fermentation). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina – MG, 2014, 44;
69. KACZMAREK, S.A.; ROGIEWICZ, A.; MOGIEINICKA, M.; RUTKOWSKI, A., JONES, R.O., SLOMINSKI, B.A. The effect of protease, amylase, and nonstarch polysaccharide-degrading enzyme supplementation on nutrient utilization and growth performance of broiler chickens fed corn-soybean meal-based diets. *2014 Poultry Science* 93 :1745–1753;
70. RITZ, C. W. et al. Growth and intestinal morphology of male turkeys as influenced by dietary supplementation of amylase and xylanase. *Poultry Science*, Savoy, v. 74, n. 10, p. 1329–1334, 1995;
71. CARDOSO, D.M.; MACIEL, M.P.; PASSOS, D.P.; SILVA, F.V.; REIS, S.T.; AIURA, F.S. Efeito do uso de complexo enzimático em rações para frangos de corte. *Arch. Zootec.* 60 (232): 1053-1064. 2011;

72. RODRIGUES, P.B.; ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; GOMES, P.C.; BARBOZA, W.A.; TOLEDO, R.S. Desempenho de frangos de corte, digestibilidade de nutrientes e valores energéticos de rações formuladas com vários milhos, suplementadas com enzimas. R. Bras. Zootec., v.32, n.1, p.171-182, 2003;
73. CARVALHO, B.R. Avaliação de um complexo enzimático em rações para frangos de corte com diferentes idades. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, 2013, 86p;
74. LEDUR, V.S. Desempenho e metabolizabilidade em frangos de corte alimentados com dietas contendo farelo de arroz e complexo enzimático. 2011. 73p. Dissertação de Mestrado em Zootecnia- Universidade Federal do Rio Grande do Sul;
75. RIZZOLI, P.W. Desempenho, incremento de energia e digestibilidade de nutrientes em rações para frangos de corte contendo enzimas exógenas. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, Pirassununga – SP, 2009, 64P;
76. BARBOSA, N.A.A. Avaliação de aditivos em dietas de frangos de corte. Tese. Universidade Estadual Julio de Mesquita Filho – UNESP, Jaboticabal – SP, 2009, 190p;
77. SORBARA, J.O.B.; MURAKAMI, A.E.; NAKAGE, E.S.; PIRACÉS, F.; POTENÇA, A. LACHINSKI, R.; GUERRA, H. Enzymatic programs for broilers. Braz. Arch. Biol. Technol. v.52 n. special: pp. 233-240, Nov. 2009;
78. FREITAS, Y. M.; SILVA, V.L.; SANTOS, S.C.; SANTOS, R.B.; GOLYNSKI, A.A.; NOMEINI, Q.S.S.; FERNANDES, K.R. Efeito da suplementação enzimática sobre rendimento de carcaça em frangos de corte. IV Congresso Estadual de Iniciação Científica do IG Goiano. 21 A 24 de setembro de 2015;
79. HAJATI, H. Effects of enzyme supplementation on performance, carcass characteristics, carcass composition and some blood parameters of broiler chicken. American Journal of Animal and Veterinary Sciences 5 (3): 221-227, 2010;
80. GARCIA, E.R.M.; MURAKAMI, A.E.; BRANCO, A.F.; FURLAN, A.G.; MOREIRA, I. Efeito da suplementação enzimática em rações com farelo de soja e soja integral extrusada sobre a digestibilidade de nutrientes, o fluxo de nutrientes na digesta ileal e o desempenho de frangos. Rev. bras. zootec., 29(5):1414-1426, 2000;
81. BAUERMEISTER, A.; REZENDE, M.I.; GIESE, E.C.; DEKKER, R.F.H.; BARBOSA, A.M. β -1,3-Glucanases Fúngicas: produção e aplicações biotecnológicas. Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas, Londrina, v. 31, n. 2, p. 75-86, jul./dez. 2010;

82. PASSARINHO, A.T.P. Produção e caracterização de xilanases derivadas do gene *xynA* de *orpinomyces pc-2* e avaliação da eficiência para hidrólise de farinha e clarificação de sucos. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto – MG, 2014, 67;
83. SCHOULTEN, N.A.; TEIXEIRA, A.S.; RODRIGUES, P.B.; FREITAS, R.T.F.; CONTE, A.J.; SILVA, H.O. Desempenho de frangos de corte alimentados com ração contendo farelo de arroz e enzimas. *Ciênc. agrotec.*, Lavras. V.27, n.6, p.1380-1387, nov./dez., 2003;
84. VERNIZ, L.A.S. Avaliação da produção de complexo celulasico por diferentes isolados bacterianos utilizando bagaço de cana como substrato indutor. Dissertação de Mestrado, São Carlos – SP, 2011, 65p;
85. VILELA, E.D.S. Análise da produção de celulasas e beta glicosidase produzidas por *Streptomyces* sp. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Goiás, Goiânia – GO, 2013, 89p;
86. GRACIA, M.I.; ARANIBAR, LAZARO, R. MEDEL, P. MATEOS, G.G. α -Amylase supplementation of broiler diets based on corn. 2003 Poultry Science 82:436–442;
87. SANTI, L. Produção, caracterização e aplicação de preparados pectinolíticos produzidos por *Penicillium oxalicum* utilizando resíduos agroindustriais. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – Rio Grande do Sul, 2005, 50;
88. IGBASAN, F.A.; GUENTER, W.; SLOMINSKI, B.A. The effect of pectinase and α -galactosidase supplementation on the nutritive value of peas for broiler chickens. *Canadian Journal of Animal Science*, 537-539, 1997;
89. NAVES, L.P. Metodologias para quantificar fitato e uso de fitases em rações para frangos de corte. Tese, Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG, 2012, 152p;
90. SANTOS, P. M.; PROVAZI, M.; SOUZA, G.B. Determinação de atividade de proteases em *Panicum maximum* cv. Tanzânia. Comunicado Técnico EMBRAPA São Carlos – SP, 2006;
91. MAYORGA, M.E.; et al. Efeitos de uma protease monocomponente em dietas de frangos de corte com níveis crescentes de inibidores da tripsina. *Anais... Prêmio Lamas* – 2011;