



CAMILA MENEGHETTI

**ASSOCIAÇÃO DE ENZIMAS EM RAÇÕES
PARA FRANGOS DE CORTE**

LAVRAS -MG

2013

CAMILA MENEGHETTI

**ASSOCIAÇÃO DE ENZIMAS EM RAÇÕES PARA FRANGOS DE
CORTE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição de Monogástricos, para título de Doutor em Zootecnia.

Orientador
Prof. Dr. Antonio Gilberto Bertechini

**LAVRAS - MG
2013**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Meneghetti, Camila.

Associação de enzimas em rações para frangos de corte / Camila Meneghetti. – Lavras : UFLA, 2013.

93 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Antonio Gilberto Bertechini.

Bibliografia.

1. Fitase. 2. Carboidrase. 3. Protease. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 636.508557

CAMILA MENEGHETTI

**ASSOCIAÇÃO DE ENZIMAS EM RAÇÕES PARA FRANGOS DE
CORTE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição de Monogástricos, para título de Doutor em Zootecnia.

Aprovada em 18 de Janeiro de 2013.

Dr. Édison José Fassani	DZO/UFLA
Dr. Adriano Geraldo	IFMG/BAMBUÍ
Dr. Jerônimo Ávito Gonçalves de Brito	CCAAB/UFRB
Dr. Roberto Maciel de Oliveira	DZO/UFLA

Prof. Dr. Antonio Gilberto Bertechini
Orientador

**LAVRAS – MG
2013**

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo amor e confiança durante esses anos de estudo na UFLA. Apesar de todas as dificuldades, sempre fizeram de tudo para que eu atingisse meus objetivos.

À UFLA, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, pela oportunidade de desenvolver todos meus trabalhos acadêmicos, não apenas no doutorado, mas também na graduação e no mestrado.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq), pela bolsa de estudos concedida durante o doutorado.

A minha família, em especial meus irmãos, Felipe e Ana Carolina e meus avós Neide e Dioley (*in memoriam*), por toda a colaboração e apoio nesses anos de estudo.

Ao meu orientador, prof. Antonio Gilberto Bertechini, pela paciência, aprendizado, compreensão, apoio e confiança depositada em mim durante a realização deste trabalho e toda a minha estada no Núcleo de Estudos em Ciência e Tecnologia Avícolas (NECTA).

Aos meus co-orientadores, professores Paulo Borges Rodrigues e Édison José Fassani, pelos conselhos e opiniões, dispostos e preocupados em ajudar e contribuir nesta pesquisa.

Ao professor Jerônimo Ávito, especialmente pela colaboração, confiança e paciência na elaboração do projeto e, pela humildade em dividir comigo seus conhecimentos, os quais foram imprescindíveis durante esse ano de execução, na qual agradeço por estar sempre presente nos meus projetos.

Ao Júlio César Carrera de Carvalho, Rafael Hermes e Ricardo Esquerre, pelo apoio e fornecimento de insumos para a realização dessa pesquisa.

Ao Antonio, por me amar, ajudar e estar presente em todos os momentos, me animando e compartilhando as preocupações e dificuldades sempre com muito carinho. A sua companhia faz meus dias serem muito melhores.

Ao Matheus, pela amizade, companheirismo, disposição e disponibilidade em todas as atividades desde o projeto até a execução deste trabalho. Realmente um amigo para todas as horas.

As minhas amigas queridas Letícia, Verônica e Nídia, as quais foram a calma dos meus dias difíceis e a leveza dos meus dias calmos.

Aos amigos, bolsistas de iniciação científica, Danilo, Mariana, Nicole e aos graduandos Bernardo, Bruno, Gabriela e Heloísa, me ajudaram constantemente nas atividades diárias dos experimentos.

Aos colegas do NECTA que, me ajudaram em todos esses anos, numa troca de aprendizados, fazendo diferença na minha formação como profissional e no meu amadurecimento pessoal. Agradeço aqueles que não estão mais no NECTA, pois seguiram seus destinos mas deixaram suas raízes e, aqueles que conviveram comigo nos três anos ou em algum momento do doutorado como o Antonio, Alisson, André, Danilo, David, Gustavo, Josimar, Letícia, Levy, Luciana, Matheus, Marcelo Espósito, Mariana, Nicole, Nídia, Pamela, Rafael, Solange, Tiago, Vanessa, Verônica, Yuri, entre outros e aos técnicos de laboratório Marcio e José Virgílio; aos funcionários do Departamento de Zootecnia, Joelma, Keila, Carlos, Borginho, Totonho e Vovo.

Aos amigos e agregados da República Mata Burro (uma grande e especial família que adorei conhecer e participar), como o Bernardo, Bruno, Emerson, Éder, Conrado, Felipe, Matheus, Rodolfo, Renan, Vinicius, Diego e claro, a Dona Lurdes.

RESUMO

Foram realizados dois experimentos com frangos de corte até 42 dias de idade, objetivando avaliar os efeitos de carboidrases, proteases e fitase, suplementadas nas rações. No primeiro utilizou-se 9 tratamentos com 8 repetições, sendo: I) ração controle positivo (CP); II) ração controle negativo 1 (CN1), com redução de 100 kcal/kg de EMA, 3% de aminoácidos (aas) limitantes, 2% de proteína bruta (PB) e 0,12 pontos percentuais (p.p) de fósforo disponível (Pd) e cálcio (Ca); III) ração controle negativo 2 (CN2), com redução de 150 kcal/kg de EMA, 3% de aas limitantes, 2% de PB e 0,12 p.p de Pd e Ca; IV) CN1 + fitase + carboidrase 1 (α - amilase e β - glucanase); V) CN1 + fitase + carboidrase 2 (xilanase e β - glucanase); VI) CN1 + fitase + carboidrase 3 (α -galactosidase, galactomananase, xilanase e β -glucanase); VII) CN2 + fitase + carboidrase 1; VIII) CN2 + fitase + carboidrase 2; IX) CN2 + fitase + carboidrase 3. Na fase de 1 a 21 dias, apenas a carboidrase 1 foi efetiva em aumentar o ganho de peso (GP) das aves e melhorar a conversão alimentar (CA). Não houve diferença na digestibilidade da matéria seca (MS), da proteína bruta (PB) e do extrato etéreo (EE), mas todas as carboidrases suplementadas na ração CN1 recuperaram 100 kcal de EMA/kg de ração. Nas fases subsequentes (de 1 a 35 e 1 a 42 dias), as carboidrases 1 e 3 proporcionaram maiores GP, mas sem melhorias na CA. O aproveitamento dos nutrientes e da energia foi menor em relação ao CP para todas as aves alimentadas com as rações CN. Os tratamentos avaliados, com diferentes enzimas não influenciaram as características de carcaça, cortes e a biometria dos órgãos. Na fase inicial recomenda-se a utilização das enzimas α - amilase, β - glucanase e fitase em rações com redução dos nutrientes e da energia. No segundo experimento foram utilizados 7 tratamentos e 8 repetições. Os tratamentos foram: I) CP; II) CN1, redução de 100 kcal de EMA, 7,0% de aas e PB e 0,12 pontos percentuais de Pd e Ca; III) CN2, redução de 100 kcal de EMA, 10% de aas e PB e 0,12 pontos percentuais de Pd e Ca; IV) CN1 + fitase + carboidrases (α - amilase e β - glucanase) + protease 1; V) CN1 + fitase + carboidrases + protease 2; VI) CN2 + fitase + carboidrases + protease 1; VII) CN2 + fitase + carboidrases + protease 2. Na fase inicial a protease 1 na ração CN1 proporcionou melhoria na CA, sem diferir do CP. Na fase de 1 a 35 dias as proteases melhoraram a CA, assim como na fase total (1 a 42 dias), salvo a protease 1 na ração CN2. A suplementação enzimática aumentou a digestibilidade da PB na fase final e teor de cinzas na tibia. Não houve diferença nas características de carcaça. A suplementação de fitase, α - amilase, β -glucanase e protease pode ser utilizada em rações para frangos de corte, com redução de 100 kcal de EMA, 10% na PB e aas limitantes e 0,12 p.p de Ca e Pd.

Palavras-chave: amilase, glucanase, fitase, protease.

ABSTRACT

Two experiments were conducted with broilers until 42 days of age, to evaluate the effects of carbohydrases, proteases and phytase supplementation in diets. At first used 9 treatments with 8 repetitions: I) positive control diet (PC), II) negative control diet 1 (NC1), reduction of 100 kcal / kg of AME, 3% amino acids (aas) limiting, 2% crude protein (CP) and 0.12 percentage points Pd and Ca, III) negative control diet 2 (NC2), reduction of 150 kcal/kg of AME, limiting aas 3%, 2% CP, 0,12 percentage points Pd and Ca; IV) NC1 + phytase + carbohydrase 1 (α - amylase and β - glucanase), V) NC1 + phytase + carbohydrase 2 (xylanase and β - glucanase), VI) NC1 + phytase + carbohydrase 3 (α -galactosidase, galactomannanase, xylanase and β -glucanase), VII) NC2 + phytase + carbohydrase 1, VIII) NC2 + phytase + carbohydrase 2, IX) NC2 + phytase carbohydrase 3. From 1 to 21 days, only carbohydrase 1 was effective in increasing weight gain (WG) of the birds and improve feed conversion (FC). There was no difference in the digestibility of dry matter (DM), crude protein (CP) and ether extract (EE), but all carbohydrases in diets supplemented NC1 recovered 100 kcal AME/kg. In subsequent phases, the carbohydrases 1 and 3 provided greater WG, but without improvements in FC. The use of nutrients and energy was lower compared to PC for all birds fed diets NC. Enzymes and diets did not affect carcass characteristics, cuts and biometrics organs. In the initial phase it is recommended the use of enzymes α - amylase, β - glucanase and phytase in diets with nutrient reduction and energy. The second experiment used 7 treatments and 8 replications. The treatments were: I) PC, II) NC1, reduction of 100 kcal of AME, 7.0% of aas and CP and 0.12 percentage points Pd and Ca, III) NC2, reduction of 100 kcal of AME, 10 % of aas and CP and 0.12 percentage points Pd and Ca, IV) NC1 + phytase + carbohydrases (α - amylase and β - glucanase) + protease 1, V) NC1 + phytase + carbohydrases + protease 2, VI) NC2 + phytase + carbohydrases + protease 1, VII) NC2 + phytase + carbohydrases+ protease 2. In the initial phase the protease 1 ration NC1 provided improvement in FC without differ from PC. From 1 to 35 days proteases improved FC, as well as the total phase (1-42 days), except for the first protease in the feed NC2. The enzyme supplementation increased digestibility of CP in the finals phase and ash content of the tibia. There were no differences in carcass characteristics. Phytase supplementation, α -amylase, protease and β -glucanase in diets with reduced nutrient and energy, can be used up to 42 days without decrease in performance, digestibility of CP and DM, in carcass characteristics and bone ash of broilers.

Key words: amylase, glucanase, phytase, protease.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE.....	7
1 INTRODUÇÃO.....	7
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	9
2.1 Produtos enzimáticos e formas de utilização	9
2.2 Fitato e a enzima fitase	11
2.3 Carboidrases.....	14
2.3.1 Amido e a enzima amilase	14
2.3.2 Polissacarídeos não amiláceos e suas enzimas específicas	17
2.3.3 Efeitos das carboidrases no aproveitamento da energia, na digestibilidade dos nutrientes das rações e no desempenho de frangos de corte	22
2.4 Proteases	23
2.4.1 Efeitos de proteases monocomponentes	25
2.3 Pesquisas com combinações de enzimas.....	27
3 CONSIDERAÇÕES GERAIS	31
SEGUNDA PARTE - ARTIGOS.....	42
ARTIGO 1- Associação de diferentes carboidrases e fitase em rações para frangos de corte.....	42
ARTIGO 2 - Associação de fitase, carboidrases e diferentes proteases em rações para frangos de corte.....	69

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A utilização de enzimas na produção de aves é amplamente aceita e embasada cientificamente, pois, dependendo do tipo de enzima utilizada, podem-se observar melhorias no desempenho, digestibilidade dos nutrientes, morfometria e saúde intestinal.

Em virtude das fontes inorgânicas de fósforo (P) serem esgotáveis e onerosas, somado as demandas da sociedade relacionadas à redução da poluição ambiental, as fitases foram as pioneiras a serem estudadas e testadas nas dietas avícolas e certamente são responsáveis por mais da metade da fatia do mercado mundial de enzimas, sustentada pela sua eficiência comprovada.

Nos últimos anos, o uso de enzimas evoluiu consideravelmente em função do custo crescente dos ingredientes das formulações para as aves e pelo aumento da oferta de produtos que atuam em diferentes substratos.

O uso de um segundo grupo enzimático e talvez, um terceiro, tais como carboidrases e proteases, em sequência à fitase, é o desafio presente para os nutricionistas. Em dietas baseadas em milho e farelo de soja existem várias oportunidades para ganho de eficiência. Em primeiro lugar, entretanto, é preciso adotar conceitos corretos direcionando a ação desses produtos aos substratos desejados.

As enzimas podem atuar diretamente sobre os substratos ou através da degradação da parede celular permitindo o acesso aos substratos que, por estarem no conteúdo celular, de outra forma não estariam disponíveis.

Proteína e amido são nutrientes considerados com alta digestibilidade, embora, não sejam completamente degradados no trato gastrointestinal. Esses

representam, entretanto, as maiores proporções dos componentes das rações das aves e, dessa forma têm impacto econômico mesmo quando pequenas melhorias na sua digestibilidade são produzidas por enzimas exógenas. O uso de amilases e proteases justifica-se pela oportunidade de otimizar o aproveitamento dos alimentos. Por outro lado, as xilanases e glucanases, cujo substrato localiza-se na parede celular, apesar de não levarem à liberação de grandes quantidades de energia a partir de sua ação direta sobre estes compostos complexos, auxiliam na exposição de proteínas, amido e outros compostos às enzimas de secreção endógena.

A combinação de enzimas em dietas para aves representa um potencial a ser investigado, mas, apesar de existir substratos nas rações para todas as enzimas do mercado, resta estabelecer, consensualmente, as respostas específicas em cada fase de crescimento do frango, limites fisiológicos do aproveitamento de nutrientes e da energia, no momento em que se utiliza diferentes grupos de enzimas em uma mesma formulação.

Portanto, objetivou-se com esse trabalho avaliar reduções nutricionais e da energia metabolizável, em rações suplementadas com fitase, diferentes carboidrases e proteases disponíveis no mercado, através do desempenho, características de carcaça, cinzas ósseas, aproveitamento da energia e digestibilidade de nutrientes para frangos de corte, durante toda a fase de criação (1 a 42 dias).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Produtos enzimáticos e formas de utilização

Estão disponíveis no mercado diferentes tipos de produtos enzimáticos (fitases, amilases, proteases, xilanases, celulasas, glucanases, etc) sendo que a maior parte desses apresenta mais de uma atividade, enquanto uma quantidade menor de produtos apresenta especificidade a apenas um substrato (monocomponentes). Produtos contendo mais de uma atividade enzimática são chamados de complexos, que são originados a partir de fermentação com um micro-organismo original, ou então misturas (“blends”) de enzimas obtidas a partir da fermentação de vários micro-organismos. Entretanto, produtos mono componentes têm apenas uma atividade enzimática e são originados a partir de um micro-organismo de origem.

O fato de as enzimas serem específicas em suas reações determina que os produtos que tenham só uma enzima sejam insuficientes para produzir o máximo benefício, sugerindo que misturas de enzimas sejam mais efetivas no aproveitamento dos nutrientes das dietas (TEJEDOR et al., 2001). Entretanto, resultados inconsistentes e variáveis são frequentemente encontrados pela existência de mais de uma atividade enzimática em um único tratamento, dificultando uma interpretação mais precisa de cada enzima ao nível experimental.

Recentemente, muitas pesquisas demonstram que a associação de diferentes enzimas em dietas para aves promove melhores resultados de desempenho, pois elas atuam de forma sinérgica, de maneira que algumas degradam componentes dos alimentos, que sofrerão posteriormente ação de

outras enzimas adicionadas no complexo, ou até mesmo das enzimas endógenas, melhorando o aproveitamento geral dos nutrientes pela ave.

A incorporação dessas enzimas nas formulações pode ser feita de duas maneiras, ambas com finalidades técnica e econômica. A primeira é a aplicação “on top”, que consiste na suplementação da enzima, como outro aditivo qualquer, sobre uma formulação padrão, com o objetivo de melhorar o ganho de peso e/ou a conversão alimentar das aves. Segundo Bertechini e Brito (2007) o conceito “on top” normalmente apresenta resultado imprevisível por uma série de fatores, entre os quais se destacam: o desajuste de matrizes nutricionais dos ingredientes básicos na formulação, as margens de segurança praticadas pela indústria avícola, aliadas à limitação fisiológica das aves em fases específicas para se melhorar a sua eficiência alimentar, pela melhoria no aproveitamento de nutrientes de uma dieta.

Aves em fases fisiológicas específicas pode ser um foco interessante para esta prática do uso de enzimas, como a fase pré-inicial, onde aves de corte e de postura apresentam limitações no aproveitamento de nutrientes (produção endógena de enzimas) e as exigências preconizadas contribuem para o uso em alto volume de ingredientes com eventuais componentes anti-nutritivos em maior proporção, como o farelo de soja, ingrediente que contém, proporcionalmente, mais fitato e polissacarídeos não amiláceos (PNA's), em relação ao milho. Outra situação a ser avaliada seria o uso de amilase na fase de crescimento ou abate onde mesmo com trato digestório desenvolvido, estudos apontam uma lacuna na digestão de amido por parte de aves de corte, assim como aves poedeiras no pico de produção, com alta demanda nutricional e com baixa capacidade de consumo inerente à genética ou qualquer fator externo como temperatura (BRITO, 2011).

A segunda opção seria alterar a formulação da ração, por meio da redução dos nutrientes, e adicionar enzimas exógenas para restaurar o valor nutricional da dieta padrão que visa o mesmo desempenho de uma dieta com os níveis nutricionais recomendados. O uso mais frequente das enzimas na avicultura brasileira é através da redução de nutrientes das dietas, destacando-se a formulação com matrizes nutricionais específicas. A viabilização econômica dessas formulações sustenta essa prática com a expectativa de, no mínimo, manter o desempenho, impactando diretamente no custo com alimentação por unidade de ganho e conseqüentemente no custo final.

Após a suplementação nas dietas, a ação catalítica das enzimas depende de uma série de fatores, tais como: concentrações do substrato e da enzima, temperatura, variação do pH, umidade e da presença de co-enzimas, resistência à atividade proteolítica e inibidores no local em que ocorrerá a reação. A termoestabilidade da enzima é outro fator que afeta sua ação catalítica, pois depende do tipo de micro-organismo que produz a enzima, sendo menos resistentes (até 75°C) aquelas produzidas por fungos e mais resistentes (80 a 90°C) as produzidas por bactérias (OFFICER, 2000).

2.2 Fitato e a enzima fitase

Três terminologias são usadas na literatura para descrever o substrato para a enzima fitase, que são: fitato, fitina e ácido fítico. O termo mais utilizado é o fitato, que é uma mistura de sais de ácido fítico (hexafosfato de mio-inositol; IP6), ou seja, ocorre quando o ácido fítico se liga a íons de Na^+ , Mg^{++} , K^+ , Ca^{++} e Zn , dentre outros. O termo fitina refere-se especificamente ao complexo depositado de IP6 com potássio, magnésio e cálcio como acontece em plantas, considerando que ácido fítico é a forma livre de IP6. Os minerais e outros

nutrientes, uma vez ligados à molécula de ácido fítico, tornam-se indisponíveis ao animal, ou seja, não são digeridos (DARI, 2006; SELLE; RAVINDRAN, 2007).

A fitase comercial ou mio-inositol hexaquifosfato fosfohidrolase é uma enzima pertencente, na sua maioria, ao grupo das fosfatases de histidina ácida, que hidrolisa o ácido fítico e seus sais, produzindo inositol, inositol monofosfato e P inorgânico (CASEY; WALSH, 2004). Os sais de ácido fítico são complexos orgânicos de armazenagem de fósforo nas plantas, correspondendo, aproximadamente, a 2/3 do total presente nas plantas (ROSTAGNO; SILVA, 1998).

O fitato é sintetizado a partir da fosforilação completa do mio-inositol, que por sua vez, tem a glicose como precursora (ALMEIDA et al., 2003).

Quanto maior é o grau de fosforilação do mio-inositol, maior é o seu poder de complexação com nutrientes, pois o número de cargas iônicas influencia a capacidade complexante e a desprotonação dos grupos fosfatos está intimamente ligada ao pH no qual a molécula se encontra. A maioria das fitases comerciais atuam em baixo pH, em virtude da sua eficiência de atuação sobre o substrato livre (fitato não complexado) e porque a afinidade do fitato com íons ou moléculas aumenta com o aumento do pH de 5,0 a 8,5 no trato digestório das aves (OH et al., 2006).

No Brasil, mais de 50% do plantel de frangos de corte recebe fitase nas dietas, isto, sem dúvida, está alicerçado na especificidade da ação desta enzima sobre um substrato específico, melhorando a disponibilidade do fósforo. Contudo, sabe-se que a mesma pode melhorar também a disponibilidade de outros minerais, bem como de proteínas e a energia das dietas (THOMPSON; YOON, 1984; KORNEGAY, 2001, RAVINDRAN et al., 2001; CAMDEN et

al., 2001; KIES, 2005; COWIESON; ACAMOVIC; BEDFORD, 2006; MENEGHETTI et al., 2011).

O teor preconizado de fitase (FTU) pela indústria, em dietas para frangos de corte, é de 500FTU/kg de dieta, o qual libera, em média, 0,1% de fósforo disponível (DARI, 2006). Porém, o preço da enzima, atualmente, permite maior inclusão como estratégia nutricional para reduzir a inclusão de certos ingredientes, diminuir o custo de formulação e, conseqüentemente, reduzir a excreção de poluentes ao ambiente. Embora alguns trabalhos demonstrem ótimos resultados com teores acima de 1.000FTU/kg em rações para aves, evidenciando, por exemplo, aumentos lineares na retenção de fósforo total, como demonstrado por Shirley e Edwards Junior (2003) e Meneghetti et al. (2011).

Quando se avalia o uso de fitase sobre os coeficientes de digestibilidade de aminoácidos, os efeitos são intermitentes e dependente do aminoácido (SELLE et al., 2000; ADEOLA; SANDS, 2003), com valores proporcionalmente maiores para treonina, cisteína, arginina, e serina, do que, por exemplo, metionina. Este fato sugere que os coeficientes de digestibilidade melhorados são para aqueles aminoácidos encontrados em maiores concentrações em enzimas endógenas e mucinas (FORSTNER; FORSTNER, 1994).

Parece ser que, os efeitos da fitase nas rações dos animais sejam liberação dos nutrientes indisponíveis, bem como redução dos efeitos anti-nutritivos do fitato.

Além de disponibilizar mais energia pela liberação dos nutrientes complexados com o ácido fítico, a fitase diminui os requerimentos energéticos da ave em virtude do fitato da dieta promover alteração no *turnover* das células do intestino, provocando maior produção de mucinas e, conseqüentemente,

aumentando a perda de nitrogênio endógeno, indiretamente via redução da solubilidade da proteína dietética, com uma cascata subsequente que altera a dinâmica intestinal através de mecanismos secretórios e absorptivos. Ou seja, maior liberação de suco gástrico no estômago e bicarbonato de sódio no lúmen intestinal, pode afetar mecanismos absorptivos, em virtude da possível falta de sódio para o transporte dos nutrientes, reduzindo diretamente a digestibilidade (COWIESON; ACAMOVIC; BEDFORD, 2006).

Baseado nessas informações, provavelmente, pesquisas futuras para fitase devem se concentrar em elucidar os efeitos sobre secreções endógenas, *turnover* de proteína e os efeitos do equilíbrio ácido-base e potencial osmótico sobre a eficácia da fitase e desempenho das aves (COWIESON; HRUBY; PIERSON, 2006).

2.3 Carboidrases

O termo carboidrase, quando se refere às enzimas exógenas, inclui duas distintas classes com atividades diferentes, a amilase e aquelas coletivamente classificadas como enzimas que degradam polissacarídeos não amiláceos. A base teórica, geral, seria que o primeiro grupo complementaria a ação das amilases endógenas, enquanto o segundo seria suplementado nas rações devido a ausência da produção dessas enzimas pelas aves.

2.3.1 Amido e a enzima amilase

Estruturalmente, o amido é um homopolissacarídeo composto por cadeias de amilose e amilopectina. A amilose é formada por unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas α -1,4, originando uma cadeia linear. Já a amilopectina é formada por unidades de glicose unidas em α -1,4 e α -1,6,

formando uma estrutura ramificada. As proporções em que essas estruturas aparecem diferem em relação às fontes botânicas, variedades de uma mesma espécie e, mesmo numa mesma variedade, de acordo com o grau de maturação da planta (ELIASSON, 2004).

No grânulo de amilose, as moléculas se encontram em estrutura helicoidal que dificulta a entrada de água, ou até mesmo força a saída de água do interior do grânulo. Com a menor infiltração de água no interior do grânulo, o acesso das enzimas digestivas também se torna dificultado. Assim sendo, as amilases praticamente só tem acesso às extremidades do grânulo fazendo com que a glicose seja liberada de maneira mais lenta, porém com maior constância e durante um tempo maior, quando comparados aos grânulos de amilopectina.

A amilose pode estar presente sob a forma de complexos amilose-lipídios (LAM – *lipid-amylose complexes*) ou de amilose livre (FAM – *free amylose*). Os LAM, embora detectados no amido nativo, possivelmente sejam formados em maior extensão durante altas temperaturas ou durante a retrogradação do amido, inibindo a atuação de enzimas como fosforilases α -amilase e β -amilase. Outros complexos de inclusão helicoidal que podem ser formados com a amilose incluem alguns álcoois e ácidos orgânicos (ELIASSON, 1996; ELIASSON, 2004).

A amilopectina está arranjada também em grânulos, mas sua estrutura ramificada permite um maior espaçamento entre as moléculas facilitando a entrada de água que, por sua vez, carrega com grande facilidade as enzimas digestivas, amilases e amiloglicosidases, no processo de digestão. Desta forma, não somente as extremidades, mas todo o grânulo sofre o ataque enzimático ao mesmo tempo, liberando grandes quantidades de glicose rapidamente.

A digestibilidade do amido é alta em animais não ruminantes, cerca de 85 a 95% (GRACIA; ARANÍBAR; LÁZARO, 2003; SOTO-SOLANOVA et

al., 1996). A idade das aves pode afetar esses valores, pois de acordo com Nitsan et al. (1991) a atividade da α -amilase produzida pelo pâncreas diminui do 3º ao 6º dia após o nascimento do pinto, entretanto, aumenta em seguida aproximadamente 10 a 20% no 11º dia de vida. Dessa forma, reduzida α -amilase endógena pode limitar o aproveitamento do amido nos primeiros dias após eclosão. Entretanto, não se pode generalizar que baixos valores de digestibilidade do amido em aves jovens são decorrentes dos níveis de α -amilase, pois outros fatores intrínsecos e extrínsecos podem ser atribuídos, como interação entre o amido e outros componentes, e as propriedades físico-químicas da estrutura do amido em si (WISEMAN, 2006).

A maior parte da digestão do amido ocorre no intestino delgado (ID), o qual produzirá glicose, entretanto, ao chegar intacto no intestino grosso (IG) ocorrerá fermentação e ácidos graxos serão produzidos por micro-organismos, sendo menor a eficiência de utilização do amido por essa última via (NOBLET et al., 1994). Influência da região do ID também tem sido encontrado em aves, pois a digestibilidade aparente do amido parece aumentar ao longo dessa porção, sendo maior no íleo posterior (WEURDING et al., 2001).

Essas frações de amido não digeridas pelas aves são chamadas de amidos resistente. Cerca de 15% do amido presente no milho pode ser classificado como amido resistente, o qual pode servir de substrato para bactérias presentes na parte distal do trato digestivo (BEDFORD, 2000).

Sobre os diferentes tipos de amido resistente, Cowieson e Adeola (2005) relatam 3 subcategorias: RS1 amido não digerido devido associação ou encapsulamento na matriz do alimento com outros compostos como carboidratos ou proteínas; RS2 amido não digerido devido a estrutura e conformação dos grânulos de amido; RS3 está associado aos efeitos do processamento pelo qual

passa o amido, por exemplo, gelatinização, devido ação térmica e a formação de pontes de hidrogênio

A amilase exógena é produzida a partir de diferentes micro-organismos, como fungos e bactérias (principalmente do gênero *Aspergillus e Bacillus*, respectivamente), são hidrolases capazes de degradar o amido, e seus produtos de hidrólise, até sacarídeos menores.

A suplementação de amilase em dietas animais complementa as enzimas endógenas e auxilia na exposição do amido mais rapidamente à digestão no intestino delgado, conduzindo ao aumento na utilização do nutriente, com consequente melhoria nas taxas de crescimento (SHEPPY, 2001).

No milho, diferenças na digestibilidade do amido parece ser um dos principais fatores que contribui para a variabilidade na energia metabolizável entre diferentes partidas (YU; CHUNG, 2004). Além das diferentes formas de estrutura espacial dos polímeros de amido, a presença de amido resistente e dos polissacarídeos não amiláceos contribuem para esse fato.

A grande quantidade de alimento ingerido (em relação ao seu peso e a secreção endógena de enzimas), a alta velocidade de passagem do alimento pelo trato digestório, bem como o baixo tempo de retenção (aproximadamente 3 horas), podem ser agravantes da digestibilidade do amido pelos frangos. Portanto, justifica-se a utilização de amilase em rações para frangos de corte.

2.3.2 Polissacarídeos não amiláceos e suas enzimas específicas

Os PNA's, principais constituintes da parede celular dos vegetais, são polímeros de açúcar que não podem ser digeridos pelas aves, devido à natureza de suas ligações, sendo resistentes à hidrólise no trato digestivo (ROSA; UTTAPATEL, 2007). O conteúdo de PNA's nas plantas varia não somente pela

espécie vegetal, mas também pelo genótipo e cultivar da mesma espécie (CHOCT; ANNISON, 1990).

A composição dos polissacarídeos, a natureza das ligações entre os monossacarídeos, a solubilidade, as características físico-químicas e o peso molecular, afetam as suas propriedades, assim como o requerimento de enzimas para hidrolisá-los (CLASSEN; BEDFORD, 1991).

O modo de ação é diferente entre os PNA's solúveis e insolúveis e vai depender da quantidade dos mesmos presente no alimento, podendo ser considerado nutriente diluente ou fator anti-nutritivo, de acordo com sua solubilidade (HETLAND; CHOCT; SVIHUS, 2004). A capacidade de provocar viscosidade é maior nos polissacarídeos solúveis em água se comparados aos insolúveis. Exemplo de moléculas insolúveis são a xilose e os xilanos (BEDFORD; SCHUKZE, 1998), enquanto os PNA's solúveis são representados pelos arabinoxilanos, β -glucanos, D-mananos, galactomananos, xiloglucanos, substâncias pécticas, etc. (TORRES et al., 2003).

A viscosidade intestinal causada pela presença de PNA's nas rações de aves age como uma barreira entre enzima e substrato e os produtos da digestão, influenciando os valores de digestibilidade.

Efeitos secundários do aumento na viscosidade da dieta podem acontecer, como a modificação da estrutura e função do intestino e outros órgãos das aves, caracterizando aumento do peso e da atividade secretória do pâncreas, fígado e intestino (ANNISON; CHOCT, 1991; BRENES et al., 1993).

Acredita-se que os componentes insolúveis dos polissacarídeos não amiláceos presentes no milho podem encapsular os nutrientes, que poderiam ser liberados pelas xilanases e celulasas (CLASSEN, 1996; GRACIA; ARANÍBAR; LÁZARO, 2003).

Por outro lado, os efeitos negativos desses polissacarídeos, sobre a digestão de nutrientes e viscosidade intestinal, estão diretamente relacionados à sua localização nos grãos de cereais. A maioria dos arabinoxilanos são insolúveis, mas os que não estão ligados às paredes celulares podem formar soluções altamente viscosas e podem absorver cerca de 10 vezes o seu peso de água (WISEMAN, 2006).

A composição total de PNA's e seus respectivos açúcares, presentes no milho e no farelo de soja, encontram-se na Tabela 1. A variação nos valores analisados para o farelo de soja fica evidente entre diferentes fontes. Vários fatores podem causar essa variação, como condições de crescimento da planta e processamento, além das técnicas laboratoriais utilizadas para avaliação (AFTA, 2012).

Tabela 1 Composição dos carboidratos (g/kg) de polissacarídeos não amiláceos, do milho e farelo de soja.

Componentes	Milho		Farelo de soja					
Rafinose	-	-	3	4	3	4	-	-
Arabinose	22	26	38	28	52	20	28	-
Xilose	30	34	19	13	12	24	12	-
Manose	3	1	13	7	4	11	6	-
Galactose	5	5	41	72	41	89	44	58
Glicose	10	37	7	44	30	52	35	5
Ácido Urônico	7	9	48	14	25	-	28	-
PNA's totais	97	111	217	198	145	148	-	-
Fonte	*	**	*	**	**	***	^	^^

*Bach-Knudsen (1997);** Chesson (2001); ***Kocher et al. (2002);^Meng et al.(2005); ^^Vahjen et al. (2005).

Retirado de AFTA (2012)

Uma estreita relação entre os PNA's e outras moléculas, como lignina e proteína (ANNISTON; CHOCT, 1991) e, uma complexidade de ramificações desses polissacarídeos, são reportados no farelo de soja (CHESSON, 2001). Os efeitos negativos dos PNA's na digestibilidade de aminoácidos pode ser explicado por essa interação entre enzima digestiva e/ou o substrato proteína, com os polissacarídeos, inibindo diretamente a digestão e absorção desses nutrientes, ou pelo aumento nas perdas endógenas dos aminoácidos (ANGKANAPORN et al., 1994).

Em relação a digestão do amido, ainda não há evidências que as enzimas amilases são inibidas diretamente pelos PNA's.

As carbohidrases endógenas produzidas são específicas para carboidratos com ligações alfa, como o amido, não atuando sobre carboidratos com ligações betas e oligossacarídeos contendo galactose, encontrados em várias sementes de plantas (FERNANDES; MALAGUIDO, 2004).

Geralmente, os PNA's insolúveis afetam o aproveitamento da energia da dieta, por manterem no interior de suas estruturas os nutrientes geradores de energia (carboidratos, lipídeos e proteínas) (FIREMAN; FIREMAN, 1998). As pesquisas com enzimas em rações brasileiras, contendo milho e farelo de soja abordam os efeitos desses polissacarídeos insolúveis pois são ingredientes de baixa viscosidade.

Dessa forma, a utilização de enzimas que degradem os PNA's é justificada pela interferência desses PNA's no processo digestivo das aves.

Exemplos de enzimas exógenas com eficácia comprovada são xilanase, arabinoxilanase, β – glucanase e celulase (ODETALLAH et al., 2005; CHOCT; ANNISTON, 1992; BRUFAU; FRANCESCH; PEREZ-VENDRELL, 2006).

Vários trabalhos demonstram melhorias na digestibilidade do amido, da gordura e de proteínas com o uso de enzimas através da liberação dos nutrientes

encapsulados na parede celular dos vegetais. A quebra dessa estrutura e a hidrólise das moléculas de polissacarídeos complexados com proteínas, por exemplo, leva a exposição desse nutriente à enzimas endógenas com atividade proteolítica. Este fato se confirma pelo aumento na digestibilidade ileal de todos os aminoácidos em rações a base de milho e soja contendo carboidrases (α -amilase, β -glucanase e xilanase), entretanto, a magnitude do efeito é diferente entre os aminoácidos (RUTHERFURD; CHUNG; MOUGHAN, 2007; COWIESON; RAVIDRAN, 2008; COWIESON, 2010). O aproveitamento da fração indigestível através da glucanase e xilanase chega a 27% e 20%, respectivamente (COWIESON, 2010).

A ação das enzimas sobre os PNA's, provavelmente, não proporciona grande aproveitamento pelas aves, dos monossacarídeos que o compõem. Na verdade, a despolimerização dos polissacarídeos, quando solúveis, diminui a viscosidade das soluções aquosas na digesta e conseqüentemente aumenta o aproveitamento dos nutrientes e da energia do alimento (CHOCT; ANNISON, 1992). Ao mesmo tempo, a redução no comprimento da cadeia afeta propriedades físicas dos PNA's, proporcionando uma menor capacidade de ligação com outros elementos.

Por outro lado, a redução da viscosidade da digesta associada a adição de enzima não necessariamente é marcado pela diminuição do conteúdo de PNA's solúveis, pois a clivagem de monossacarídeos insolúveis pode liberar as moléculas solúveis (GRUPPEN; KORMELINK; VORAGEN, 1993).

As enzimas, em particular, as glucanases, aumentam o valor nutritivo de algumas dietas a base de milho e soja, provavelmente após alterar a arquitetura das paredes celulares dos grãos, de acordo com Cowieson e Adeola (2005). Outros estudos demonstram benefícios de xilanases na melhoria da viscosidade

intestinal devido à melhor utilização dos compostos do conteúdo celular ocorrendo em paralelo.

Isoladamente, sem emprego de outras enzimas exógenas como proteases, amilases ou fitase, Cowieson (2005) sugere que o uso de xilanase não produz resposta semelhante às obtidas com a combinação das enzimas.

Tais melhorias na disponibilidade de nutrientes com suplementação de carboidrases muitas vezes resultam em reduzidos consumo de ração, como consequência da maior disponibilidade de energia, levando a uma melhor eficiência alimentar (KOCHER et al., 2003).

Vários fatores influenciam as respostas encontradas na literatura com o uso de enzimas específicas para PNA's em rações com milho e farelo de soja, como: qualidade e composição dos ingredientes, forma de processamento da ração, presença de ácidos orgânicos e acidificantes como moduladores de pH, nível de energia e de nutrientes na ração basal, idade das aves, atividade única ou multienzimática, dose utilizada e presença da enzima fitase (AFTA, 2012).

2.3.3 Efeitos das carboidrases no aproveitamento da energia, na digestibilidade dos nutrientes das rações e no desempenho de frangos de corte

De acordo com várias pesquisas, o aumento, médio, na energia metabolizável aparente (EMA) de rações para aves é de 3% (de 80 a 100 kcal/kg) quando há suplementação de carboidrases, em relação a ração controle negativo (KOCHER; CHOCT; BROZ, 2002; GHAZI; ROOKE; GALBRAITH, 2003; GRACIA; ARANÍBAR; LÁZARO, 2003; KOCHER et al., 2003; MENG; SLOMINSKI, 2005; COWIESON; RAVIDRAN, 2008; AO et al., 2009; ZHOU et al., 2009; LI et al., 2010; COWIESON, 2010). Esse efeito

parece ser uma resposta acumulativa do melhor aproveitamento do amido, da gordura e da proteína.

Em relação a digestibilidade do amido e da gordura há muitos resultados conflitantes devido as formas de mensuração, tendo mais resultados positivos com o uso de enzimas, quando se avalia digestibilidade ileal, ao invés da avaliação nas excretas (ZANELLA et al., 1999; MENG; SLOMINSKI, 2005; GRACIA; ARANÍBAR; LÁZARO, 2003, GRACIA et al., 2009 ; LI et al., 2010). Isso sugere que a fermentação microbiana que ocorre no IG pode mascarar os efeitos das enzimas sobre a digestibilidade desses nutrientes.

Apesar do efeito principal na EMA, estudos demonstram melhorias na digestibilidade da proteína de 3,3% até 7,1% (KOCHER; CHOCT; BROZ, 2002; GHAZI et al., 2002; MENG; SLOMINSKI, 2005; LI et al., 2010). Entretanto, poucos trabalhos são encontrados avaliando rações a base de milho e farelo de soja (RUTHERFULD ; SCHUNG ; MOUGHAN, 2007 ; COWIESON, 2010). É importante ressaltar também que, frequentemente, se tornou difícil a avaliação dos efeitos isolados de carboidrases em virtude da maioria dos complexos e blends enzimáticos possuírem também atividade de protease.

Efeitos no desempenho são constantemente observados com a utilização de carboidrases, através do aumento no ganho de peso e melhora na eficiência alimentar das aves (KIDD et al., 2001 ; YU; CHUNG, 2004 ; JIA et al., 2009; LI et al., 2010). Essas respostas parecem ser consequência da ação das enzimas sobre o melhor aproveitamento dos nutrientes e da energia da ração, mas muitas vezes não é possível diferenciar cada contribuição decorrente desses componentes.

2.4 Proteases

As proteases também são enzimas endógenas, com ação proteolítica, e podem ser classificadas como endopeptidases ou exopeptidases. Ambos os tipos de enzimas atacam ligações peptídicas de proteínas e polipeptídeos. A diferença entre elas é que as endopeptidases limitam seu ataque a ligações de dentro da molécula protéica, quebrando grandes cadeias de peptídeos em segmentos de polipeptídeos menores (MOREIRA; SCAPINELLO; SAKAMOTO, 2004).

Estudos realizados no Brasil destinados especificamente para frangos de corte abordam proteases exógenas de serina, tais como as enzimas endógenas, quimiotripsina, tripsina e elastase, entretanto, diferem destas por serem endopeptidases relativamente sem especificidade quanto à hidrólise de ligações peptídicas e, portanto, com potencial de ação sobre todas as proteínas.

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

A adição de proteases exógenas pode representar um potencial desejável em suplementar a atividade proteolítica em animais jovens, liberando peptídeos menores e facilitando a ação das enzimas endógenas. As principais proteínas de armazenamento no milho são zeína e kaferina (MCDONALD; EDWARDS; GREENHALGH, 1990). Zeína é quantitativamente a mais importante e é deficiente em aminoácidos indispensáveis, como o triptofano e lisina. Existem

quatro tipos de zeínas - alfa, beta, gama e delta, estas por sua vez tem um papel importante pois encontram-se encapsulando a superfície dos grânulos de amido do milho (TESTER; KARKALAS; QI, 2004). Essas proteínas são responsáveis, diretamente, pela formação da matriz externa do amido, podendo influenciar sua digestibilidade.

As rações para aves, compostas principalmente de milho, farelo de soja e ingredientes de origem animal, possuem algumas características ou componentes que podem dificultar a digestão e prejudicar a integridade intestinal dos animais. A soja, por exemplo, contribui com cerca de 70% da proteína em dietas avícolas e se não houver tratamento térmico adequado seus fatores anti-nutricionais podem proporcionar decréscimos na digestibilidade da proteína e da gordura, reduzindo a absorção de nutrientes, principalmente de aminoácidos sulfurados (ZANELLA et al., 1999). Esses fatores anti-nutricionais causam aumento na produção de mucina e conseqüentemente, maior perda endógena de aminoácidos. Com estes efeitos a protease exógena aumenta a digestibilidade protéica pela diminuição da perda endógena e dessa forma, também tem um efeito secundário no aproveitamento da energia metabolizável da ração.

As proteases podem ser produzidas por micro-organismos ou plantas, entretanto, as proteases bacterianas parecem ser mais efetivas em neutralizar inibidores de tripsina do que as proteases fúngicas (THORPE; BEAL, 2001).

2.4.1 Efeitos de proteases monocomponentes

A suplementação enzimática possibilita melhoria no ganho de peso e na conversão alimentar (CA) aos 21 e 42 dias. Odetallah et al. (2005) avaliaram duas rações basais contendo milho e farelo de soja, para frangos de corte até 42

dias de idade. Os tratamentos foram: 1) ração controle (C), com 95% das exigências de aminoácidos recomendados pelo NRC, exceto para a treonina e isoleucina; 2) C + 0,1% protease ; 3) ração com 100 a 105% da recomendação de aminoácidos pelo NRC, exceto para a treonina e isoleucina, e 4) ração 3 + 0,1% de protease na dieta inicial. Entretanto, a CA foi melhorada apenas com a ração contendo níveis mais altos de aminoácidos.

Além do desempenho, o rendimento de carcaça e de peito de frangos também foram avaliados por Wang, Garlich e Shih (2006) ao oferecer rações contendo 3 níveis de proteína bruta e aminoácidos (95% (baixo), 100% (médio) e 105% (alto) das exigências da indústria) e, dois níveis de uma protease (0% e 0,10%). A enzima proporcionou aumento de 2,54% no ganho de peso (GP) das aves. Enquanto a CA e o rendimento de carne de peito foram melhorados, em 1,62% e 1,68%, respectivamente ($P < 0,01$). As melhorias no GP e CA foram maiores com a ração de baixa proteína. No rendimento de carne de peito a protease teve maior efeito com níveis proteicos intermediário e alto, talvez pela maior necessidade dos aminoácidos para otimizar essa característica.

A recuperação do desempenho em frangos de corte, com o uso de protease em rações com milho, farelo de soja e farinha de carne e ossos, com reduções protéicas e energéticas, também foi relatada por Favero et al. (2009). Utilizaram a mesma protease suplementada na dose de 200 g/ton e observaram que esta atenuou perdas de ganho de peso de frangos de corte quando reduções de 3 e 6% na proteína bruta das dietas foram feitas.

Estudos com uma protease de serina contendo genes transcritos de *Nocardiosis prasina* suplementada em rações para frangos de corte têm mostrado melhorias na conversão alimentar bem como na digestibilidade da proteína bruta e dos aminoácidos (BERTECHINI et al., 2009; CARVALHO et al., 2009).

Na fase inicial, de 7 a 22 dias de idade, Angel et al. (2011) avaliaram a suplementação de uma protease em dietas para frangos de corte. Foram utilizados um tratamento CP (23% PB) e 5 rações CN (20% PB, redução de 12% na exigência de lisina e metionina e 10% para treonina) com níveis crescentes da enzima (0, 100, 200, 400 e 800 mg/kg de ração). As aves do grupo CN sem suplementação enzimática obtiveram GP e CR 7% menor em relação as aves do CP, entretanto, quando a protease foi suplementada a partir de 200 mg/kg o desempenho foi equalizado. Esse resultado foi sustentado pela melhoria na digestibilidade da maioria dos aminoácidos essenciais e a partir da dose mínima utilizada. No entanto, o grau de melhoria era dependente do aminoácido específico, tendo menores ganhos com isoleucina (3,2%), e maiores respostas com a treonina (7,8%).

Quando se utiliza protease associado a outro grupo de enzimas deve-se levar em consideração a resistência deste à atividade proteolítica, devido a inespecificidade quanto à hidrólise de ligações peptídicas e, portanto, com potencial de ação sobre todas as proteínas, inclusive as enzimas exógenas.

Os trabalhos com proteases nem sempre são claramente interpretados, isto se deve a diferença no tipo de micro-organismo de origem, a diversidade de ingredientes, ao desenho experimental, especialmente a valorização dos nutrientes na dieta controle negativo e a utilização de complexos enzimáticos ao invés da enzima monocomponente, a qual não permite a avaliação dos efeitos isolados da protease (ZANELLA et al., 1999; GHAZI et al., 2002; PINHEIRO et al., 2004; OLUKOSI; COWIESON; ADEOLA, 2007; COWIESON; RAVINDRAN, 2008).

2.3 Pesquisas com combinações de enzimas

Como já foi exposto anteriormente, na fase inicial de criação, a digestão do amido é menor em relação a fase final do frango de corte, em decorrência da imaturidade do trato digestório, tanto em relação ao enterócito, que é considerado imaturo, pois nos primeiros dias do frango ainda está direcionando para a transferência de imunoglobulinas, além da absorção dos nutrientes, e, quanto a baixa produção de enzimas, sendo uma possibilidade o uso das amilases exógenas. Outras alternativas que se mostram viáveis seriam as enzimas que degradam os PNA's e as proteases, visto a maior quantidade de farelo de soja na fase inicial e quando há a utilização de ingredientes de origem animal, como farinha de carne e ossos, de penas e vísceras. Por outro lado, na fase final, reduz-se a soja e aumenta-se o milho, proporcionando mais uma alternativa ao uso da amilase exógena, devido a maior quantidade do substrato amido nas rações.

Além do desenvolvimento do trato digestório, do perfil de nutrientes e dos ingredientes das dietas em função da idade, vale ressaltar também que o frango de corte moderno é diferente daquele dos anos 90, em virtude da seleção e do melhoramento genético visar a hiperfagia associada aos altos ganhos de tecido muscular, por isso, talvez, o frango moderno exceda a capacidade de uma absorção otimizada dos nutrientes.

Quando se pesquisam carboidrases e proteases, as reduções nutricionais ou valorizações são da ordem de 1-2% para aminoácidos e de 2-3% para energia metabolizável. Quando se trata de mais combinações, como fitase, carboidrase e protease, normalmente, o efeito da fitase sobre o cálcio e fósforo estão padronizados, com pouca variação (redução de 0,10-0,13 e 0,10-0,15 pontos percentuais para fósforo disponível e cálcio, respectivamente). Entretanto, os níveis energéticos das rações normalmente variam entre 80-150 kcal/kg, ao passo que as estimativas de melhoria na digestibilidade dos aminoácidos são

entre 2-5% (ZANELLA et al., 1999; YU; CHUNG, 2004; COWIESON, 2005; MENG; SLOMINSKI, 2005; RUTHERFURD; CHUNG; MOUGHAN, 2007; COWIESON; RAVINDRAN, 2008; FRANCESCH; GERAERT, 2009; SORBARBA et al., 2009; COWIESON, 2010).

Essas variações são decorrentes, principalmente, das diferentes matrizes dos alimentos e das próprias enzimas, entretanto, há possibilidades de que as altas reduções no valor energético da ração aliada a valorizações de nutrientes como fósforo, cálcio, proteína e aminoácidos, possa comprometer o desempenho dos animais em virtude de maior dificuldade em se adaptar e se manter em situação de deficiência nutricional. Além disso, as reduções nutricionais podem levar a resultados distintos em diferentes fases, de acordo com o nutriente mais limitante para a fase estudada (FRANCESCH; GERAERT, 2009), portanto, é necessário avaliar se há limitação fisiológica em algum momento, quando se utiliza vários grupos de enzimas nas formulações.

Os trabalhos conduzidos para avaliar os efeitos da suplementação enzimática nas rações de aves, referem-se, quase sempre, ao uso de carboidrases e/ou proteases. A utilização de fitases já é uma realidade nas rações para aves e por isso, considera-se um aditivo usual nas formulações.

Dois experimentos (metodologias semelhantes) foram avaliados com a suplementação de fitase em combinação com um complexo contendo xilanase, amilase e protease em rações de frangos de corte (COWIESON; SINGH; ADEOLA, 2006a, b). Utilizaram 3 grupos de CN onde se reduziu a EM em relação ao CP em 140 e 145 kcal/kg de EMAn no CN1, 88 e 100 kcal/kg no CN2, 49 e 52 kcal/kg no CN3, nas fases inicial e final, respectivamente, além de reduzir 0,13 e 0,12 pontos percentuais para fósforo e cálcio e entre 1 e 2% no teor de aminoácidos. Houve significativas melhorias no desempenho e no aproveitamento dos nutrientes com a combinação das enzimas nas diversas

reduções de nutrientes comparado com aves do grupo CP, mas quase sempre sem diferenciação entre os CN's em várias ocasiões para ganho de peso e conversão alimentar.

Avaliando a combinação de fitase e do complexo amilase, protease e xilanase, em rações de frangos de corte, Barbosa et al. (2008) observaram aumento na digestibilidade da proteína, da energia e do fósforo, refletindo em melhor desempenho, entretanto, as enzimas não foram suficientes em equalizar ou recuperar o desempenho das aves submetidas ao controle negativo, com redução de 130 e 145 kcal/kg de EMAn nas fases inicial e final, respectivamente, e 0,13 e 0,12 pontos percentuais para fósforo e cálcio, em relação as aves submetidas ao controle positivo.

Francesch e Geraert (2009) avaliaram um complexo enzimático (xilanase, glucanase e fitase) utilizando 9 tratamentos, sendo um CP e 4 CN's (com e sem suplementação enzimática) com reduções nutricionais (1)-65 kcal/kg EMAn, -0,15 e 0,12 pontos percentuais para fósforo e cálcio e 1,5% nos aminoácidos digestíveis; 2) -85 kcal/kg EMAn, -0,15 e 0,12 pontos percentuais para fósforo e cálcio e 3,0% nos aminoácidos digestíveis; 3) -65 kcal/kg EMAn, -0,20 e 0,15 pontos percentuais para fósforo e cálcio e 1,5% nos aminoácidos digestíveis; 4) -85 kcal/kg EMAn, -0,20 e 0,15 pontos percentuais para fósforo e cálcio e 3% nos aminoácidos digestíveis). A suplementação do complexo foi capaz de melhorar o desempenho e a mineralização óssea com efeito mais expressivo quando houve maior redução de cálcio e fósforo disponível que efetivamente para energia e aminoácidos digestíveis. Não foi possível estabelecer alguma conclusão em relação a redução dos nutrientes estabelecidos baseado nos resultados de desempenho dos CN's sem suplementação enzimática.

Frequentemente, os trabalhos não demonstram diferenças entre o CN sem enzimas e o CP, assim como ocorreu com Fortes et al. (2012), que testaram um complexo de carboidrases e uma fitase em duas rações, contendo ou não enzimas, compondo um tratamento CP, e outro CN com redução de 4% na EMA, 3% de PB e 10% nas recomendações dos aminoácidos. Entretanto, a suplementação enzimática proporcionou maior consumo de ração e ganho de peso.

De acordo com Brito (2011), a dificuldade na mensuração de respostas, principalmente com expectativa de ganho extra, com o uso de enzimas, pode se dar em virtude de uma formulação errônea de dietas denominadas controle positivo, e principalmente as do grupo controle negativo (matriz de alimentos), a baixa representatividade da amostra de animais e especialmente ao pequeno número de repetições/tratamento avaliado.

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Espera-se com os resultados obtidos nos experimentos propostos, disponibilizar para a comunidade científica e para os produtores e indústria, esclarecimentos práticos em relação ao uso de diferentes enzimas, em rações para frangos de corte. Apesar do grande número de trabalhos de pesquisa sobre a utilização de enzimas nas rações avícolas, vários questionamentos ainda precisam ser esclarecidos, como o uso de vários grupos enzimáticos (blends monocomponentes) ao mesmo tempo. Busca-se com os resultados, demonstrar o os efeitos das valorizações energéticas e de nutrientes em rações para frangos de durante toda a fase de criação.

REFERÊNCIAS

ADEOLA O.; SANDS, J. S. Does supplemental dietary phytase improve amino acid utilization? A perspective that it does not. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 81, p. 78-85, 2003.

AFTA, U. Exogenous carbohydrases in cor-soy diets for broilers. **World's Poultry Science Journal**, Ithaca, v. 68, p.v447-464, 2012.

ALMEIDA, M. V. et al. A cascata dos fosfoinosítídeos. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 105-111, jan./fev. 2003.

ANGEL, C. R. et al. Effects of a monocomponent protease on performance and protein utilization in 7- to 22-day-old broiler chickens. **Poultry Science**, Champaign, v. 90, p. 2281-2286, 2011.

ANGKANAPORN, K. et al. Effects of wheat pentosans on endogenous amino acid losses in chickens. **Journal Science Food Agriculture**, Davis, v. 66, p. 399-404, 1994.

ANNISTON, G.; CHOCT, M. Anti-nutritive activities of cereal non-starch polysaccharides in broiler diets and strategies minimizing their effect. **World's Poultry Science Journal**, Ithaca, v. 47, p. 232-242, 1991.

AO, T. et al. Effects of enzyme supplementation and acidification of broiler diets on nutrient digestibility and growth performance of broiler chicks. **Poultry Science**, Champaign, v. 88, p.111-117, 2009.

BACH-KNUDSEN, K. E. Carbohydrate and lignin contents of plant materials used in animal feeding. **Animal Feed Science Technology**, Amsterdam, v. 67, p. 319-338, 1997.

BARBOSA, N. A. A. et al. Enzimas exógenas no desempenho e na digestibilidade ileal de nutrientes em frangos de corte. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 6, p. 755-762, 2008.

BEDFORD, M. Removal of antibiotic growth promoters from poultry diets: implications and strategies to minimize subsequent problems. **World's Poultry Science Journal**, Ithaca, v. 56, p. 347-365, 2000.

BEDFORD, M. R.; SCHUKZE, H. Exogenous enzymes in poultry diets. **Nutrition Research Reviews**, Wallingford, v. 11, n. 1, p. 91-114, June 1998.

BERTECHINI, A. G.; BRITO J. A. G Utilização correta de enzimas em rações de aves. In: FÓRUM INTERNACIONAL DE AVICULTURA, 2., 2007, Curitiba. **Anais...** Curitiba: Animal World, 2007. CD-ROM.

BERTECHINI, A. G. et al. Use of a protease to enhance the utilization of soybean meal amino acids by broilers. In: INTERNATIONAL POULTRY SCIENTIFIC FORUM, 2009, Atlanta. **Abstracts...** Atlanta: Poultry Science, 2009. p. 69.

BRENES, A. et al. Effect of enzyme supplementation on the performance and digestive tract size of broiler chickens fed wheat- and barleybased diets. **Poultry Science**, Champaign, v. 72, p. 1731-1739, 1993.

BRITO, J. A. G. Desenhos experimentais e recentes pesquisas com enzimas e suas combinações. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE AVICULTURA, 22., 2011, Buenos Aires. **Anais...** Buenos Aires: [s.n.], 2011. CD-ROM.

BRUFAU, J.; FRANCESCH, M.; PEREZ-VENDRELL, A. M. The use of enzymes to improve cereal diets for animal feeding. **Journal Science Feed Agriculture**, Amsterdam, v. 86, p. 1705-1713, 2006.

CAMDEN, B. J. et al. Effectiveness of exogenous microbial phytase in improving the bioavailabilities of phosphorus and other nutrients in maize – soya-bean meal diets for broilers. **Animal Science**, Penicuik, v. 73, n. 2, p. 289-297, 2001.

CARVALHO, J. C. C. et al. Use of a protease to enhance the utilization of corn amino acids by broilers. In: INTERNATIONAL POULTRY SCIENTIFIC FORUM, 2009, Atlanta. **Abstracts...** Atlanta: Poultry Science, 2009. p. 69-70.

CASEY, A.; WALSH, G. Identification and characterization of a phytase of potential commercial interest. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 3, p. 313-322, 2004.

CHESSON, A. Non-starch polysaccharide degrading enzymes in poultry diets: influence of ingredients on the selection of activities. **World's Poultry Science Journal**, Ithaca, v. 57, p. 251-263, 2001.

CHOCT, M., ANNISON, G. Anti-nutritive activity of wheat pentosans in broiler diets. **British Poultry Science**, London, v.30, p.81 1-821, 1990.

CHOCT, M.; ANNISON, G. Anti-nutritive effects of wheat pentosans in broiler-chickens: Role of viscosity and gut microflora. **British Poultry Science**, London, v. 33, p. 821-834, 1992.

CLASSEN, H. L. Cereal grain starch and exogenous enzymes in poultry diets. **Animal Feed Science Technology**, Amsterdam, v. 62, p. 21-27, 1996.

CLASSEN, H. L.; BEDFORD, M. R. The use of enzymes to improve the nutritive value of poultry feeds. In: HARESIGN, W.; COLE, D. J. A. (Ed.). **Recent advances in animal nutrition**. Surry: Butterworth Heinemann, 1991. p. 95-116.

COWIESON, A. J. Factors that affect the nutritional value of maize for broilers. **Animal Feed Science and Technology**, Davis, v. 119, n. 3/4, p. 293-305, 2005.

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

COWIESON, A. J.; ACAMOVIC, T.; BEDFORD, M. R. Phytic acid and phytase: implications for protein utilization by poultry. **Poultry Science**, Champaign, v. 85, p. 878-885, 2006.

COWIESON, A. J.; ADEOLA, O. Carbohydrase, protease, and phytase have an additive beneficial effect in nutritionally marginal diets for broilers chicks. **Poultry Science**, Champaign, v. 84, p.1860-1867, 2005.

COWIESON, J.; HRUBY, M.; PIERSON, E. E. M. Evolving enzyme technology: impact on commercial poultry nutrition. **Nutrition Research Reviews**, Tarrytown, v. 10, n. 1, p. 90-103, 2006.

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

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**, London, v. 47, n. 4, p. 477-489, 2006a.

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. 2. Energy and nutrient utilisation. **British Poultry Science**, London, n. 4, v. 47, p. 490-500, 2006b.

DARI, R. L. Porque utilizar um blend de enzimas e não apenas uma? In: SEMINÁRIOS TÉCNICOS NUTRON, 2006, Campinas. **Anais...** Campinas: Nutron, 2006. CD-ROM.

ELIASSON, A. C. **Carbohydrates in food**. New York: Marcel Dekker, 1996. 664 p.

ELIASSON, A. C. **Starch in food**: structure, function and applications. New York: CRC, 2004. 605 p.

FAVERO, A. et al. Effect of protease enzyme on performance and ileal digestibility of broilers grown to 42 days of age in floor pens. In: INTERNATIONAL POULTRY SCIENTIFIC FORUM, 2009, Atlanta. **Abstracts...** Atlanta: Poultry Science, 2009. p. 9.

FERNANDES, P. C. C.; MALAGUIDO, A. Uso de enzimas em dietas de frangos de corte. In: CONFERENCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIAS AVÍCOLAS, 2004, Santos. **Anais...** Santos: FACTA, 2004. p. 117-126.

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

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**, Champaign, v. 88, p. 1915-1924, 2009.

FORSTNER, J. F.; FORSTNER, G. G. **Gastrointestinal mucus**. 3. ed. New York: Raven 1994. p. 1255-1283.

FORTES, B. D. et al. Avaliação de programas nutricionais com a utilização de carboidrases e fitase em rações de frangos de corte. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 13, p. 24-32, 2012.

GHAZI, S. et al. The potential for the improvement in the nutritive value of soya-bean meal by different proteases in broiler chicks and broiler cockerels. **British Poultry Science**, London, v. 43, p. 70-77, 2002.

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

GRACIA, M. I.; ARANÍBAR, M. J.; LÁZARO, R. α -Amylase supplementation of broiler diets based on corn. **Poultry Science**, Champaign, v. 82, p. 436-442, 2003.

GRACIA, M. I. et al. Influence enzyme supplementation of diets and cooking-flaking of maize on digestive traits and growth performance of broilers from 1 to 21 days of age. **Animal Feed Science Technology**, Amsterdam, v. 150, p. 303-315, 2009.

GRUPPEN, H.; KORMELINK, F. J. M.; VORAGEN, A. G. J. Water-unextractable cell wall material from wheat flour. 3. A structural model for arabinoxylans. **Journal Cereal Science**, Manhattan, v. 18, p.111-28, 1993.

HETLAND, H.; CHOCT, M.; SVIHUS, B. Role of insoluble no-starch polysaccharides in poultry nutrition. **World's Poultry Science Journal**, Ithaca, v. 60, p. 415-422, 2004.

HILTON, A. ; BUME, M. E.; DELOACH, J. R. Role of metabolic intermediates in the inhibition of Salmonella typhimurium and Salmonella enteritidis by Veillonella. **Journal Food Protection**, Des Moines, v. 56, p. 932-937, 1993.

JIA, W. et al. Effects of diet type and enzyme addition on growth performance and gut health of broiler chickens during subclinical Clostridium perfringens challenge. **Poultry Science**, Champaign, v. 88, p.132-140, 2009.

KIES, A. K. et al. Effect of graded doses of microbial phytase on the digestibility of various minerals in piglets. In: KIES, A. K. **Phytase studies in pigs and poultry: effect on protein digestion and energy utilization**. Wageningen: Wageningen University, 2005. chap. 6, p. 77-87.

KIDD, M. T. et al. Commercial broiler responses to enzyme and diet density. **Poultry Science**, Champaign, v. 80, n. 7, 2001. Abstract 114.

KOCHER, A.; CHOCT, M.; BROZ, J. Effects of feed enzymes on nutritive value of soybean meal fed to broilers. **British Poultry Science**, London, v. 43, p. 54-63, 2002.

KOCHER, A. et al. Effects of enzyme combinations on apparent metabolizable energy of corn-soybean meal-based diets in broilers. **Journal Applied Poultry Research**, Champaign, v. 12, n. 3, p. 275-283, 2003.

KORNEGAY, E. T. Digestion of phosphorus and other nutrients: the role of phytases and factors influencing their activity. In: BEDFORD, M. R.; PARTRIDGE, G. G. **Enzymes in farm nutrition**. Londres: Cab International, 2001. p. 237-271.

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

LI, Y. et al. Effects of β – mannanase expressed by pichia pastoris in corn-soybean meal diets on broiler performance, nutrient digestibility, energy utilization and immunoglobulin levels. **Animal Feed Science and Technology, Amsterdam**, v. 159, n.1, p. 59-67, 2010.

MCDONALD, P.; EDWARDS, R. A.; GREENHALGH, J. F. D. **Animal nutrition**. 4. ed. New York: Longman Scientific & Technical, 1990.

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

MENG, X.; SLOMINSKI, B. A. Nutritive value of corn, soybean meal, canola meal, and peas for broiler chickens as affected by a multicarbohydrase

preparation of cell wall degrading enzymes. **Poultry Science**, Champaign, v. 84, p. 1242-1251, 2005.

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

NIR, I.; NITSAN, Z.; MAHAGNA, M. Comparative growth and development of the digestive organs and of some enzymes in broiler and egg type chicks after hatching. **British Poultry Science**, London, v. 34, p.523–532, 1993.

NITSAN, Z. et al. Growth and development of the digestive organs and some enzymes in broiler chicks after hatching. **British Poultry Science**, London, v. 32, p. 515-523, 1991.

NOBLET, J. et al. Prediction of net energy value of feeds for growing pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 72, p. 344-354, 1994.

ODETALLAH, N. H. et al. Versazyme Supplementation of Broiler Diets Improves Market Growth Performance. **Poultry Science**, Champaign, v. 84, p. 858-864, 2005.

OFFICER, D. I. Feed enzymes. In: D'MELLO, J. P. F. (Ed.). **Farm animal metabolism and nutrition**. Edinburgh: The Scottish Agricultural College, 2000. p. 405-426.

OH, B. C. et al. Ca⁺²- inositol phosphate checation mediates the substrate specificity of β -propeller phytase. **Biochemistry**, New York, v. 45, n. 31, p. 9531-9539, Aug. 2006.

OLUKOSI, O. A.; COWIESON, A. J.; ADEOLA, O. Age-related influence of a cocktail of xylanase, amylase, and protease or phytase individually and in combination in broilers. **Poultry Science**, Champaign, v. 86, p. 77-78, 2007.

PERSIA, M. E.; DEHORITY, B. A.; LILBURN, M. S. The effects of enzyme supplementation of corn – and wheat-based diets on nutrient digestion and cecal microbial populations in Turkeys. **Journal Applied Poultry Research**, local Savoy, v. 11, p. 134-145, 2002.

- PINHEIRO, D. F. et al. Effect of early feed restriction and enzyme supplementation on digestive enzyme activities in broilers. **Poultry Science**, Champaign, v.83, p. 1544-1550, 2004.
- RAVINDRAN, V. et al. Microbial phytase improves performance, apparent metabolizable energy and ileal amino acid digestibility of broilers fed a lysine-deficient diet. **Poultry Science**, Champaign, v. 80, p. 338-344, 2001.
- ROSA, A. P.; UTTPATEL, R. Uso de enzimas nas dietas para frangos de corte. IN: SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA, 8., 2007, Chapecó. **Anais...** Chapecó: Embrapa Suínos e Aves, 2007. p. 102-115.
- ROSTAGNO, H. S.; SILVA, M. A. Exigências nutricionais e biodisponibilidade de fósforo para frangos de corte. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE NUTRIÇÃO DE AVES, 1998, Campinas. **Anais...**Campinas: CBNA, 1998. p. 1-27.
- RUTHERFURD, S. M.; CHUNG, T. K. ; MOUGHAN, P. J. The effect of a commercial enzyme preparation on apparent metabolizable energy, the true ileal amino acid digestibility, and endogenous ileal lysine losses in broiler chickens. **Poultry Science**, Champaign, v. 86, p. 665-672, 2007.
- SELLE, P. H. et al. Phytate and phytase: consequences for protein utilisation. **Nutrition Research Reviews**, Tarrytown, v. 13, p. 255-278, 2000.
- SELLE, P. H.; RAVINDRAN, V. Microbial phytase in poultry nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 135, n. 1/2, p. 1-41, 2007.
- SHEPPY, C. The current feed enzyme market and likely trends. In: BEDFORD, M. R.; PARTRIDGE, G. G. **Enzymes in farm nutrition**. Londres: Cab International, 2001. p. 1-10.
- SHIRLEY, R. B.; EDWARDS JUNIOR, J. A. Graded levels of phytase past industry standards improves broilers performance. **Poultry Science**, Champaign, v. 82, p. 671-680, 2003.
- SORBARA, J. O. B. et al. Enzymatic Programs for Broilers. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 52, p. 233-240, 2009.

SOTO-SALANOVA, M. F. et al. Uso de enzimas em dietas de milho e soja para frangos de corte. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1996, Curitiba. **Anais...** Campinas: FACTA, 1996. p. 71-76.

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

TESTER, F.; KARKALAS, J.; QI, X. Starch-composition, fine structure and architecture. **Journal Cereal Science**, Manhattan, v. 39, p. 151-165, 2004.

THOMPSON, L. U.; YOON, J. H. Starch digestibility as affected by polyphenols and phytic acid. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 49, p. 1228-1229, 1984.

THORPE, J.; BEAL, J. D. Vegetable protein meals and the effects of enzymes. In: BEDFORD, M. R.; PARTRIDGE, G. G. **Enzymes in farm nutrition**. Londres: Cab International, 2001. p. 125-143.

TORRES, D. M. et al. Eficiência das enzimas amilase, protease e xilanase sobre o desempenho de frangos de corte. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, p. 1401-1408, 2003.

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 broiler chickens. **Jornal Applied Poultry Research**, local Savoy, v. 15, p. 544-550, 2006.

WANG, Z. R. et al. Effects of enzyme supplementation on performance, nutrient digestibility, gastrointestinal morphology, and volatile fatty acid profiles in the hindgut of broilers fed wheat-based diets. **Poultry Science**, Champaign, v. 84, p. 875-881, 2005.

WEURDING, R. E. et al. In vitro starch digestion correlates well with rate and extent of starch digestion in broiler chickens. **Journal of Nutrition**, Cambridge v. 131, p. 2336-2342, 2001. Disponível em: <<http://jn.nutrition.org/cgi/reprint/131/9/2336.pdf>>. Acesso em: 23 jan. 2013.

WISEMAN, J. Variations in starch digestibility in non-ruminants. **Animal Feed Science Technology**, Amsterdam, v. 130, p. 66-77, 2006.

YU, B.; CHUNG, T. K. Effects of multiple-enzyme mixtures on growth performance of broilers fed corn-soybean meal diets. **Journal Applied Poultry Research**, Savoy, v. 13, p. 178-182, 2004.

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

ZHOU, Y. et al. Improved energy-utilizing efficiency by enzyme preparation supplement in broiler diets with different metabolizable energy levels. **Poultry Science**, Champaign, v. 88, p. 316-322, 2009.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1- Associação de diferentes carboidrases e fitase em rações para frangos de corte

Meneghetti, C.; Bertechini, A.G. et al.

Artigo redigido conforme normas da Revista Animal Feed Science and Technology – versão preliminar

Resumo

Um experimento foi realizado para avaliar as reduções nutricionais e da energia metabolizável de rações suplementadas com diferentes carboidrases e fitase, para frangos de corte. Um total de 2160 pintos machos, Cobb 500, foram distribuídos em 72 parcelas, onde receberam 9 tratamentos com 8 repetições cada. Os tratamentos foram: I) ração CP; II) ração CN1 (redução de 100 kcal/kg de EMAn, 3% de as limitantes, 2% de PB e 0,12 pontos percentuais de Pd e Ca); III) ração CN2 (redução de 150 kcal/kg de EMA, 3% de as limitantes, 2% de PB e 0,12 pontos percentuais de Pd e Ca); IV) CN1 + fitase + carboidrase 1 (α – amilase e β – glucanase); V) CN1 + fitase + carboidrase 2 (xilanase e β – glucanase); VI) CN1 + fitase + carboidrase 3 (α -galactosidase, galactomananase, xilanase e β -glucanase); VII) CN2 + fitase + carboidrase 1; VIII) CN2 + fitase + carboidrase 2; IX) CN2 + fitase + carboidrase 3. No 14º dia, cinco aves de sete repetições foram alojadas em gaiolas de metabolismo para a coleta total de excretas. Aos 42 dias de idade, uma ave de cada repetição foi abatida para a obtenção do rendimento de carcaça, cortes, gordura abdominal

e biometria dos órgãos. Na fase de 1 a 21 dias, as enzimas α – amilase e β – glucanase foram efetivas em aumentar o GP das aves e melhorar a CA. Não houve diferença entre os tratamentos para os CDA da MS, PB e EE, porém, todas as carboidrases suplementadas na ração CN1 recuperaram 100 kcal de EMAn/kg de ração. Nas avaliações de 1 a 35 e 1 a 42 dias, as carboidrases 1 e 3 proporcionaram maiores GP, mas sem melhorias na CA. O aproveitamento dos nutrientes e da energia foi menor em relação ao CP para todas as aves alimentadas com as rações dos CN's, independente da presença de enzimas. As enzimas e as rações não influenciaram as características de carcaça e a biometria dos órgãos. Na fase inicial recomenda-se a utilização de α - amilase, β – glucanase e fitase em rações com redução de nutrientes e da energia metabolizável.

*Palavras-chave:*enzimas, desempenho, digestibilidade, rendimento.

Abreviações:

Aas: aminoácidos; Ca: cálcio; CA: conversão alimentar; CDA: coeficientes de digestibilidade aparente; CP: controle positivo; CN: controle negativo; EE: extrato etéreo; EMAn: energia metabolizável aparente corrigida para balanço de nitrogênio; GP: ganho de peso; MS: matéria seca; PB: proteína bruta; Pd: fósforo disponível.

1.Introdução

Inicialmente, o uso de carboidrases na alimentação das aves, visava à redução de alguns fatores anti-nutricionais em dietas de alta viscosidade, constituídas por cereais de inverno. O uso de enzimas em rações de baixa viscosidade, como as dietas brasileiras, compostas por milho e farelo de soja, só

foi iniciado a partir da década de 1990, principalmente com estudos em perus e frangos de corte (Ritz et al., 1995; Pack et al., 1997; Zanella et al., 1999).

O termo carboidrase, quando se refere às enzimas exógenas, inclui duas distintas classes com atividades diferentes, a amilase e aquelas coletivamente classificadas como enzimas que degradam polissacarídeos não amiláceos (PNA's). A base teórica, geral, seria que o primeiro grupo complementaria a ação das amilases endógenas, enquanto o segundo seria suplementado nas rações devido à ausência da produção dessas enzimas pelas aves.

Os trabalhos conduzidos para avaliar os efeitos da suplementação enzimática nas rações de aves, referem-se, quase sempre, ao uso de carboidrases, fitase e/ou protease em um mesmo produto. Por isso, nem sempre é possível inferir os reais resultados de cada grupo enzimático.

As enzimas fitases são consideradas um aditivo fixo nas formulações de rações para aves pelo objetivo de maximizar o aproveitamento do fósforo dos vegetais. Entretanto, outros efeitos secundários são reportados, como aumento na disponibilidade de outros minerais, bem como proteínas e a energia das rações (Thompson and Yoon, 1984; Kornegay, 2001, Ravindran et al., 2001; Camden et al., 2001; Kies, 2005; Cowieson et al., 2006; Meneghetti et al., 2011).

O melhor aproveitamento dos nutrientes através do uso de enzimas e, principalmente da energia, componente mais caro das formulações para frangos de corte, permitirá que as empresas avícolas se tornem mais eficientes e com menores custos, além de reduzirem a poluição ambiental.

Portanto, objetivou-se com este estudo, determinar até que ponto pode-se reduzir os níveis energéticos e de nutrientes, sustentado pela fitase e grupos de carboidrases em rações fareladas, a base de milho e farelo de soja para frangos de corte, no período de 1 a 42 dias de idade, avaliando o desempenho,

rendimento de carcaça, características biométricas dos órgãos das aves, o aproveitamento energético e a digestibilidade dos nutrientes das rações experimentais.

2. Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Centro de Pesquisas em Tecnologia Avícolas (CPTA/Convênio UFLA), rodovia BR 265, km 344 (Lavras, MG), no período de abril de 2012 a julho de 2012. Todos os procedimentos realizados durante o experimento foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Lavras (UFLA) (protocolo nº 066/12).

2.1 Delineamento experimental e tratamentos

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 9 tratamentos e 8 repetições, totalizando 72 parcelas experimentais.

Foram utilizadas três rações, uma ração CP, sem suplementação enzimática e duas rações CN, com redução de 100 (CN1) e 150 (CN2) kcal/kg de EMAn, respectivamente. Em ambas as rações dos CN's também reduziu-se 3% dos aas limitantes (metionina, lisina e treonina), 2% de PB e 0,12 pontos percentuais de Pd e Ca. A partir dessas rações, foram suplementados três complexos de carboidrases e uma fitase em cada CN, constituindo os tratamentos, listados a seguir:

1. CP, sem enzimas
2. CN1, sem enzimas
3. CN2, sem enzimas

- 4.CN1 + fitase (50g/ton) + carboidrases 1 (300 g/ton)
- 5.CN1 + fitase (50g/ton) + carboidrases 2 (200 g/ton)
- 6.CN1 + fitase (50g/ton) + carboidrases 3(100 g/ton)
- 7.CN2 + fitase (50g/ton) + carboidrases 1(300 g/ton)
- 8.CN2 + fitase (50g/ton) + carboidrases 2 (200 g/ton)
- 9.CN2 + fitase (50g/ton) + carboidrases 3 (100 g/ton)

As reduções energéticas das rações se fez por meio da redução do óleo de soja, e as enzimas foram adicionadas substituindo parcialmente o inerte (caulim) das rações dos CN's.

Os complexos de carboidrases (C) testados foram: C1, composto por α - amilase (200 kNU) e β - glucanase (350 FGB) produzido por *Bacillus amyloliquefaciens*; C2, composto por α -galactosidase (35 U/g), galactomananase (110 U/g), xilanase (1500 U/g) e β – glucanase (1100 U/g), produzido a partir da fermentação dos micro-organismos *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae*, C3, composto por xilanase (12200 U/g) e β - glucanase (1250 U/g), produzido por *Trichoderma longibrachiatum*. A fitase utilizada possui atividade mínima declarada de 10.000 FTU/g de produto e é produzida por *Schizosaccharomyces pombe* geneticamente modificado com o gene de *Escherichia coli*.

2.2 Rações

As rações foram fareladas, compostas por milho e farelo de soja, formuladas seguindo as exigências de Bertechini (2012), de acordo com as fases de criação (1 a 21; 22 a 35 e 36 a 42 dias) (Tabelas 1,2 e 3).

A composição, em nutrientes, dos ingredientes usados na formulação foi obtida das Tabelas brasileiras (Rostagno et al., 2011), assim como a EM e a PB dos aminoácidos sintéticos utilizados.

Foram realizadas análises das rações experimentais para teor de nitrogênio (N) pelo método micro Kjeldahl (AOAC,2005), Ca e P total, seguindo métodos descritos por Silva (2002).

Tabela 1 Composição das rações basais experimentais, da fase inicial (1-21 dias).

Ingredientes (g/kg de ração, em matéria natural)	Rações Basais		
	CP ¹	CN1 ²	CN2 ³
Milho	560,83	607,57	618,22
Farelo de soja	362,98	345,5	343,48
Óleo de soja	34,36	9,67	1,00
Fosfato bicálcico	18,34	11,93	11,92
Bicarbonato de sódio	2,00	2,43	2,45
Calcário calcítico	7,07	8,16	8,17
Sal comum	3,59	3,28	3,26
Premix Mineral ⁴	0,50	0,50	0,50
Premix Vitamínico ⁵	1,00	1,00	1,00
DL-Metionina 99%	3,56	3,33	3,32
L-Lisina HCl 78%	3,20	3,16	3,20
L-Treonina 98%	1,18	1,07	1,07
Cloreto de colina 60%	0,60	0,60	0,60
Bacitracina Zn 15%	0,30	0,30	0,30
Salinomicina 12%	0,50	0,50	0,50
Inerte (Caulim)	0	1,00	1,00
Composição nutricional calculada e analisada (valores entre parênteses) (g/kg de ração, em matéria natural)			
EMA (kcal/kg)	3050	2950	2900
Proteína Bruta	217 (215)	212,70 (212)	212,70 (212)
Cálcio	8,45 (8,38)	7,25 (7,18)	7,25 (7,22)
Fósforo total	7,26 (7,4)	6,02 (5,93)	6,02 (6,05)
Fósforo disponível	4,6	3,4	3,4
Sódio	2,15	2,15	2,15
Lisina digestível	13,03	12,64	12,64
Metionina+cistina digestível	9,35	9,07	9,07
Treonina digestível	8,48	8,23	8,23
Balanço eletrolítico ⁶ (mEq/kg)	230	230	230

¹ Ração controle positivo. ² Ração controle Negativo 1. ³ Ração controle Negativo 2.

⁴Suplementado por kg de ração: vitamina A - 12.000 UI; vitamina D3- 2.500 UI; vitamina E -30 UI; vitamina B1 - 2 mg; vitamina B6 - 3 mg; pantotenato de cálcio- 10 mg; biotina- 0,07 mg; vitamina k3 - 3 mg; ácido fólico - 1 mg; ácido nicotínico - 35 mg; vit. B12 - 15 µg; selênio - 0,12 mg; BHT - 5 mg.

⁵Suplementado por kg de ração: manganês - 80 mg; ferro- 50 mg; zinco 50 mg; cobre - 10 mg; cobalto- 1 mg; iodo - 1 mg.

⁶ Balanço eletrolítico calculado segundo a equação de Mogin (1981).

Tabela 2 Composição das rações basais experimentais, da fase de crescimento (22-35 dias).

Ingredientes (g/kg de ração, em matéria natural)	Rações Basais		
	CP	CN1	CN2
Milho	610,66	654,58	666,51
Farelo de soja	312,38	296,1	293,85
Óleo de soja	39,00	15,85	6,14
Fosfato bicálcico	15,51	9,06	9,05
Bicarbonato de sódio	1,58	1,99	2,01
Calcário calcítico	7,23	8,4	8,41
Sal comum	3,52	3,23	3,21
Premix Mineral ⁴	0,50	0,50	0,50
Premix Vitamínico ⁵	0,80	0,80	0,80
DL-Metionina 99%	3,13	2,92	2,91
L-Lisina HCl 78%	3,26	3,23	3,27
L-Treonina 98%	1,13	1,03	1,03
Cloreto de colina 60%	0,50	0,50	0,50
Bacitracina Zn 15%	0,30	0,30	0,30
Salinomicina 12%	0,50	0,50	0,50
Inerte (Caulim)	0	1,00	1,00
Composição nutricional calculada e analisada (valores entre parênteses) (g/kg de ração, em matéria natural)			
EMA (kcal/kg)	3150	3050	3000
Proteína Bruta	197,90 (198)	194,00 (194)	194,00 (195)
Cálcio	7,67 (7,52)	6,50 (6,48)	6,50 (6,58)
Fósforo total	6,51 (6,58)	5,28 (5,33)	5,28 (5,2)
Fósforo disponível	3,98	2,78	2,78
Sódio	2,00	2,00	2,00
Lisina digestível	11,86	11,51	11,51
Metionina+cistina digestível	8,50	8,25	8,25
Treonina digestível	7,77	7,54	7,54
Balanço eletrolítico ⁶ (mEq/kg)	205	205	205

¹ Ração controle positivo. ² Ração controle Negativo 1. ³ Ração controle Negativo 2.

⁴ Suplementado por kg de ração: vitamina A - 12.000 UI; vitamina D3- 2.500 UI; vitamina E -30 UI; vitamina B1 - 2 mg; vitamina B6 - 3 mg; pantotenato de cálcio- 10 mg; biotina- 0,07 mg; vitamina k3 - 3 mg; ácido fólico - 1 mg; ácido nicotínico - 35 mg; vit. B12 - 15 µg; selênio - 0,12 mg; BHT - 5 mg.

⁵ Suplementado por kg de ração: manganês - 80 mg; ferro- 50 mg; zinco 50 mg; cobre - 10 mg; cobalto- 1 mg; iodo - 1 mg.

⁶ Balanço eletrolítico calculado segundo a equação de Mogin (1981).

Tabela 3 Composição das rações basais experimentais, da fase final (36-42 dias).

Ingredientes (g/kg de ração, em matéria natural)	Rações Basais		
	CP ¹	CN1 ²	CN2 ³
Milho	646,48	691,32	703,25
Farelo de soja	277,92	262,00	259,74
Óleo de soja	40,69	16,31	6,60
Fosfato bicálcico	13,64	7,22	7,21
Bicarbonato de sódio	1,47	1,86	1,88
Calcário calcítico	7,33	8,41	8,43
Sal comum	3,34	3,06	3,04
Premix Mineral ⁴	0,50	0,50	0,50
Premix Vitamínico ⁵	0,60	0,60	0,60
DL-Metionina 99%	2,83	2,63	2,62
L-Lisina HCl 78%	3,30	3,29	3,33
L-Treonina 98%	1,09	1,00	1,00
Cloreto de colina 60%	0,50	0,50	0,50
Bacitracina Zn 15%	0,30	0,30	0,30
Inerte (Caulim)	0	1,00	1,00
Composição nutricional calculada e analisada (valores entre parênteses) (g/kg de ração, em matéria natural)			
EMA (kcal/kg)	3200	3100	3050
Proteína Bruta	185,1 (185)	181,43 (181)	181,43 (181)
Cálcio	7,15 (7,10)	5,96 (6,1)	5,96 (6,15)
Fósforo total	6,02 (6,06)	4,79 (4,85)	4,79 (4,75)
Fósforo disponível	3,57	2,38	2,38
Sódio	1,90	1,90	1,90
Lisina digestível	11,07	10,75	10,75
Metionina+cistina digestível	7,93	7,69	7,69
Treonina digestível	7,28	7,07	7,07
Balanço eletrolítico ⁶ (mEq/kg)	190	190	190

¹ Ração controle positivo. ² Ração controle Negativo 1. ³ Ração controle Negativo 2.

⁴ Suplementado por kg de ração: vitamina A - 12.000 UI; vitamina D3- 2.500 UI; vitamina E -30 UI; vitamina B1 - 2 mg; vitamina B6 - 3 mg; pantotenato de cálcio- 10 mg; biotina- 0,07 mg; vitamina k3 - 3 mg; ácido fólico - 1 mg; ácido nicotínico - 35 mg; vit. B12 - 15 µg; selênio - 0,12 mg; BHT - 5 mg.

⁵ Suplementado por kg de ração : manganês - 80 mg; ferro- 50 mg; zinco 50 mg; cobre - 10 mg; cobalto- 1 mg; iodo - 1 mg.

⁶ Balanço eletrolítico calculado segundo a equação de Mogin (1981).

2.4 Procedimentos experimentais

No total, 2160 frangos de corte machos da linhagem Cobb-500[®] foram utilizados no experimento. Os pintos foram adquiridos de incubatório comercial, devidamente vacinados contra a doença de Marek, com um dia de idade e criados em galpão convencional de alvenaria, com telhas de cimento amianto, cortinas laterais com dispositivos de catraca para controle parcial da temperatura e ventilação, equipado com boxes experimentais contendo maravalha, comedouro tubular e bebedouro nipple. Em cada box 30 pintos foram alojados, correspondendo a 15 aves/m².

As aves e as rações foram pesadas no primeiro, 21^o, 35^o e 42^o dia de idade, obtendo dessa forma o consumo de ração (CR), o GP e a CA nos períodos de 1 a 21, 1a 35 e de 1 a 42 dias de criação. A mortalidade em cada parcela foi registrada diariamente para controle da viabilidade de criação e correção do CR e CA das aves.

Os registros diários de temperatura interna do galpão foram obtidos com a instalação de dois termômetros de máxima e mínima, colocados em diferentes partes da instalação, à altura das aves, cujas médias encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4 Médias, referentes ao valores de temperatura dentro do galpão registrados durante o experimento.

Semana	Temperaturas (médias)	
	Máxima	Mínima
1 ^o	32,86	27,36
2 ^o	30,78	24,16
3 ^o	26,87	22,32
4 ^o	23,56	18,07
5 ^o	24,10	17,29

6°

27,78

17,50

No 14° dia de idade, todas as aves de 7 repetições (boxes), de cada tratamento, foram pesadas e obtido o peso médio para a transferência de 5 aves (de cada box) em sala de metabolismo com ambiente semi-controlado para temperatura e ventilação. As gaiolas de metabolismo, de 0,473 m², eram providas de bandejas metálicas coletoras, revestidas com plástico para facilitar as coletas de excretas.

As coletas na fase inicial ocorreram do 18° ao 20° dia de vida e na fase final do 38° ao 40° dia de idade.

Utilizou-se quatro dias para adaptação à gaiola e três dias para a coleta total de excretas. As coletas foram realizadas uma vez ao dia, na parte da manhã.

As excretas coletadas de cada parcela (gaiola) foram acondicionadas em sacos plásticos previamente identificados e armazenados em freezer a temperatura de -5⁰C até o período final do experimento. Ao final das coletas, as amostras foram descongeladas, pesadas e homogeneizadas e delas retiradas amostras de 400 gramas para análises laboratoriais de MS, N, EE e energia bruta (EB) (AOAC, 2005). Estas amostras sofreram uma pré-secagem em estufa de ventilação forçada (55⁰C) durante o período de 72 horas. Posteriormente, foram pesadas e moídas em moinho “tipo faca”, com peneiras de 0,5 mm. Paralelamente, alíquotas homogêneas de cada ração foram coletadas, moídas e armazenadas até a realização das mesmas análises químicas propostas para as excretas.

As rações experimentais foram pesadas no início do ensaio metabólico e as sobras descontadas ao final para quantificação do consumo de alimento por ave, referente ao período de coleta de excretas.

Determinou-se nesse estudo, a EMAn e os coeficientes de digestibilidade aparente da MS, do EE e da PB das rações experimentais. A EMAn foi calculada utilizando a equação descrita por Matterson et al. (1965). Para os cálculos dos coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes (MS, PB e EE) utilizou-se a equação: $CDA \text{ nutriente} = [(g \text{ de nutriente ingerido (em MS)} - g \text{ de nutriente excretado (em MS)}) / g \text{ de nutriente ingerido (em MS)}] \times 100$.

Aos 42 dias de idade, uma ave de cada repetição foi pesada e selecionada para abate, após período de jejum de, aproximadamente, 8 horas, seguida de sangria, escaldagem, depenagem e evisceração. Foram realizadas ao mesmo tempo biometria do fígado, pâncreas, ceco e intestino delgado.

Na determinação do rendimento de carcaça, considerou-se o peso da carcaça eviscerada (sem vísceras, pés e pescoço), em relação ao peso vivo da ave depois do jejum. Os cortes de pernas (coxa e sobrecoxa) e peito foram pesados em balança com precisão de 1 g e seus rendimentos calculados em relação ao peso da carcaça eviscerada. A gordura abdominal foi constituída pelo peso do tecido adiposo presente ao redor da cloaca, da bursa de Fabricius e dos músculos abdominais adjacentes.

2.5 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância utilizando-se o software Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados (SISVAR, 5.3), descrito por Ferreira (2010). A comparação entre os tratamentos foi feita pelo teste Scott-Knotta 5% de probabilidade.

3. Resultados

Os resultados de desempenho das fases de 1 a 21, 1 a 35 e de 1 a 42 dias de idade das aves encontram-se nas Tabelas 5, 6 e 7, respectivamente. Os coeficientes de digestibilidade aparente da MS, da PB, do EE e a EMAn das rações iniciais e finais encontram-se na Tabela 7 e 8, respectivamente e, o rendimento de carcaça, cortes, gordura abdominal e a biometria dos órgãos estão dispostos na Tabela 9 e 10.

Na fase inicial (1 a 21 dias), a utilização do C1, contendo α – amilase e β – glucanase, recuperou o GP e a CA dos frangos, de forma semelhante ao CP ($p < 0,05$).

O consumo de ração não foi influenciado na fase de 1 a 35 dias pelas valorizações nutricionais, inclusive, pelas diferentes carboidrases ($p > 0,05$).

Os efeitos positivos encontrados na primeira fase foram acumulativos em relação ao ganho de peso na fase de 1 a 35 dias. Ou seja, as aves do tratamento CN1 contendo oC1 novamente obtiveram maiores ganhos (121 g a mais em relação ao CN1) junto ao CP, porém, nessa fase, as carboidrases xilanase e β – glucanase no CN1 também equalizaram o peso das aves ($p < 0,05$).

Ainda na fase de 1 a 35 dias, em relação ao CN2, com suplementação enzimática, apenas o C1 resultou em melhor GP ($p < 0,05$), proporcionando para as aves 98 g a mais de peso em relação as aves do CN2, sem enzimas. Por outro lado, nenhuma carboidrase foi capaz de equalizar os valores de CA das aves do CP, mas é evidente que houve melhorias através da suplementação das carboidrases em todos os CN's, salvo o C2, na ração CN1 ($p < 0,05$).

Na fase integral (1 a 41 dias) os resultados obtidos seguem o mesmo padrão verificado na fase anterior, sem influencia no consumo de ração ($p > 0,05$) e maior GP com a utilização dos complexos de carboidrases 1 e 3, compostos por α – amilase e β – glucanase e xilanase e β – glucanase, respectivamente, sendo semelhantes ao CP ($p < 0,05$). Todas as enzimas foram eficazes em

melhorar a CA das aves, quando comparado às rações dos CN's, sem enzimas, menos o complexo de carboidrase 2 (α -galactosidase, galactomananase, β – xilanase e β – glucanase), com redução de 100 kcal de EMAn/kg de ração. Em relação ao CP, nenhuma carboidrase utilizada conseguiu resultado semelhante. A viabilidade das aves não foi influenciada pelas enzimas e rações ($p>0,05$).

Não foi detectada nenhuma diferença na digestibilidade aparente da MS, da PB e do EE entre as rações avaliadas na fase inicial (do 18° ao 20° dia de idade)($p>0,05$). Porém, todas as aves que consumiram a ração do CN1 com carboidrases, aproveitaram melhor a energia advinda dos nutrientes, não diferindo das aves do CP ($p<0,05$).

Em relação à fase final, do 38° ao 40° dia de criação, observa-se que nenhuma das aves recebendo as rações dos CN's, suplementadas ou não com carboidrases e fitase foram capazes de aproveitar a MS e a PB da ração como as aves do tratamento CP ($p<0,05$). Entretanto, os complexos 1 e 3, na ração CN1 proporcionaram os maiores valores dos CDAPB entre todas as rações com reduções de aminoácidos, PB, Ca, Pd e EMA($p<0,05$).

O rendimento de carcaça, de peito, coxa e sobre coxa e gordura abdominal não foram influenciados pelas reduções nutricionais, energéticas e pelas diferentes carboidrases. Da mesma forma ocorreu para a medida de peso dos órgãos e comprimento do intestino delgado ($p>0,05$).

Tabela 4 Consumo de ração (CR), ganho de peso (GP) e conversão alimentar (CA) de frangos de corte de 1 a 21 dias, alimentados com rações contendo ou não fitase e diferentes carboidrases.

Tratamentos	CR (g/ave)	GP* (g/ave)	CA* (g/g)
CP	1214	853 a	1,42 a
CN 1	1166	789 c	1,49 b
CN2	1208	801 c	1,50 b
CN1 (F + C 1)	1214	848 a	1,43 a
CN1 (F + C 2)	1219	824 b	1,48 b

CN1 (F + C 3)	1213	818 b	1,48 b
CN2 (F + C 1)	1202	816 b	1,48 b
CN2 (F + C 2)	1202	812 b	1,48 b
CN2 (F + C 3)	1183	791 c	1,49 b
Média	1202	817	1,47
Probabilidade	0,024	0,000	0,015
CV (%)	3,36	3,36	3,47

CV: Coeficiente de variação. CP: ração controle positivo. CN1: ração controle negativo 1. CN2: ração controle negativo 2. F: fitase. C: complexo de carboidrase.

*Médias com letras distintas, nas colunas, diferem entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$).

Tabela 5 Consumo de ração (CR), ganho de peso (GP) e conversão alimentar (CA) de frangos de corte, de 1 a 35 dias, alimentados com rações contendo ou não fitase e diferentes carboidrases.

Tratamentos	CR (g/ave)	GP* (g/ave)	CA* (g/g)
CP	3664	2307 a	1,58 a
CN 1	3580	2149 c	1,66 c
CN2	3669	2123 c	1,72 d
CN1 (F + C 1)	3694	2270 a	1,62 b
CN1 (F + C 2)	3656	2207 c	1,65 c
CN1 (F + C 3)	3700	2260 a	1,63 b
CN2 (F + C 1)	3653	2221 b	1,64 b
CN2 (F + C 2)	3642	2172 c	1,67 c
CN2 (F + C 3)	3614	2163 c	1,67 c
Média	3652	2208	1,65
Probabilidade	0,128	0,000	0,000
CV (%)	2,26	2,36	2,30

CV: Coeficiente de variação. CP: ração controle positivo. CN1: ração controle negativo 1. CN2: ração controle negativo 2. F: fitase. C: complexo de carboidrase.

*Médias com letras distintas, nas colunas, diferem entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$).

Tabela 6 Consumo de ração (CR), ganho de peso (GP), conversão alimentar (CA) e viabilidade (Viab.) de frangos de corte de 1 a 41 dias, alimentados com rações contendo ou não fitase e diferentes carboidrases.

Tratamentos	CR (g/ave)	GP* (g/ave)	CA* (g/g)	Viab. (%)
CP	4781	2755 a	1,73 a	98,75
CN 1	4721	2599 b	1,81 c	98,80
CN2	4883	2604 b	1,87 d	99,50
CN1 (F + C 1)	4855	2732 a	1,77 b	99,58
CN1 (F + C 2)	4816	2672 b	1,80 c	98,80
CN1 (F + C 3)	4868	2722 a	1,78 b	96,24
CN2 (F + C 1)	4842	2677 b	1,80 c	98,34
CN2 (F + C 2)	4813	2623 b	1,83 c	98,75
CN2 (F + C 3)	4802	2638 b	1,82 c	98,33
Média	4820	2669	1,8	98,56
Probabilidade	0,83	0	0	0,09
CV (%)	2,17	2,44	1,86	2,09

CV: Coeficiente de variação. CP: ração controle positivo. CN1: ração controle negativo 1. CN2: ração controle negativo 2. F: fitase. C: complexo de carboidrase.

*Médias com letras distintas, nas colunas, diferem entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$).

Tabela 7 Coeficientes de digestibilidade aparente da matéria seca (CDAMS), da proteína bruta (CDAPB), do extrato etéreo (CDAEE) e energia metabolizável aparente corrigida para balanço de nitrogênio (EMAn, na matéria seca) de rações contendo ou não fitase e diferentes carboidrases, para frangos de corte de 18 a 20 dias de idade.

Tratamentos	CDAMS (%)	CDAPB (%)	CDAEE (%)	EMAn* (kcal/kg)
CP	70,94	61,68	79,56	3225 a
CN 1	71,71	61,21	79,50	3144 b
CN2	71,85	62,76	82,16	3051 b
CN1 (F + C 1)	72,25	62,70	78,88	3216 a
CN1 (F + C 2)	72,74	62,67	80,81	3204 a
CN1 (F + C 3)	71,45	61,59	80,16	3192 a
CN2 (F + C 1)	72,55	62,29	80,86	3110 b
CN2 (F + C 2)	71,92	62,20	78,91	3111 b
CN2 (F + C 3)	71,33	62,21	78,92	3105 b
Média	71,97	62,04	79,97	3150
Probabilidade	0,057	0,435	0,306	0,000
CV (%)	1,52	3,07	3,37	1,88

CV: Coeficiente de variação. CP: ração controle positivo. CN1: ração controle negativo 1. CN2: ração controle negativo 2. F: fitase. C: complexo de carboidrase.

*Médias com letras distintas, na coluna, diferem entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$).

Tabela 8 Coeficientes de digestibilidade aparente da matéria seca (CDAMS), da proteína bruta (CDAPB), do extrato etéreo (CDAEE) e energia metabolizável aparente corrigida para balanço de nitrogênio (EMAn) de rações contendo ou não fitase e diferentes carboidrases, para frangos de corte de 38 a 40 dias de idade.

Tratamentos	CDAMS* (%)	CDAPB* (%)	CDAEE (%)	EMAn* (kcal/kg)
CP	76,84 a	66,99 a	86,84	3549 a
CN 1	73,83 b	60,11 c	84,38	3185 c
CN2	72,10 b	58,83 c	83,50	3123 c
CN1 (F + C 1)	74,00 b	63,27 b	85,41	3272 b
CN1 (F + C 2)	72,82 b	61,59 c	84,76	3233 b
CN1 (F + C 3)	73,33 b	63,59 b	84,56	3268 b
CN2 (F + C 1)	72,43 b	60,44 c	82,84	3130 c
CN2 (F + C 2)	71,45 b	60,40 c	83,27	3171 c
CN2 (F + C 3)	73,33 b	60,34 c	84,46	3258 b
Média	73,32	61,73	84,36	3243
Probabilidade	0,001	0,000	0,629	0,000
CV (%)	2,85	4,44	3,88	2,46

CV: Coeficiente de variação. CP: ração controle positivo. CN1: ração controle negativo 1. CN2: ração controle negativo 2. F: fitase. C: complexo de carboidrase.

*Médias com letras distintas, na coluna, diferem entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$).

Tabela 9 Rendimentos de carcaça (RC), peito (RP), coxa e sobrecoxa (RC+S) e gordura abdominal (GA), expressos em porcentagem, dos frangos aos 42 dias de idade, alimentados com rações contendo ou não fitase e diferentes carboidrases.

Tratamentos	RC (%)	RP (%)	R C+S (%)	GA (%)
CP	71,81	40,11	30,10	2,38
CN 1	73,92	39,32	28,77	2,20
CN2	73,09	39,76	28,78	2,46
CN1 (F + C 1)	72,52	41,53	28,36	2,08
CN1 (F + C 2)	72,98	39,45	28,84	2,80
CN1 (F + C 3)	73,19	39,76	29,10	2,60
CN2 (F + C 1)	73,43	39,68	28,50	2,33
CN2 (F + C 2)	73,22	39,25	29,23	2,53
CN2 (F + C 3)	72,71	39,11	29,48	2,38
Média	72,99	39,77	29,02	2,42

Probabilidade	0,471	0,317	0,586	0,374
CV (%)	2,35	4,74	5,76	23,00

CV: Coeficiente de variação. CP: ração controle positivo. CN1: ração controle negativo 1. CN2: ração controle negativo 2. F: fitase. C: complexo de carboidrase.

*Médias com letras distintas, na coluna, diferem entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$).

Tabela 10 Peso, em gramas, do pâncreas, fígado, ceco, intestino delgado (ID) e comprimento (cm) do ID dos frangos aos 42 dias de idade, alimentados com rações contendo ou não fitase e diferentes carboidrases.

Tratamentos	Pâncreas (g)	Fígado (g)	Ceco (g)	ID (g)	ID (cm)
CP	4,73	45,20	12,85	82,25	211,75
CN 1	4,98	43,35	14,31	74,50	196,12
CN2	5,05	46,01	13,38	78,12	206,87
CN1 (F + C 1)	4,70	45,52	14,80	78,00	199,75
CN1 (F + C 2)	4,81	47,97	11,88	79,50	197,37
CN1 (F + C 3)	4,83	43,42	12,81	75,12	197,37
CN2 (F + C 1)	4,65	47,52	13,08	77,87	191,62
CN2 (F + C 2)	5,07	45,88	13,43	69,37	191,75
CN2 (F + C 3)	4,89	47,38	13,76	76,25	207,00
Média	4,87	45,80	13,37	76,77	200,12
Probabilidade	0,947	0,262	0,881	0,360	0,157
CV (%)	15,41	9,07	26,99	12,59	7,97

CV: Coeficiente de variação. CP: ração controle positivo. CN1: ração controle negativo 1. CN2: ração controle negativo 2. F: fitase. C: complexo de carboidrase.

*Médias com letras distintas, na coluna, diferem entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$).

4. Discussão

Nos primeiros dias de vida da ave, a digestão do amido, geralmente, é menor em relação à fase final, em decorrência da imaturidade do trato digestório, tanto em relação ao enterócito, que é considerado imaturo, pois nos primeiros dias do frango ainda está direcionando para a transferência de imunoglobulinas além da absorção dos nutrientes, quanto a baixa produção de enzimas, como a α - amilase. Provavelmente, os melhores resultados de desempenho com a utilização de α - amilase e β - glucanase na ração, na fase de

1 a 21 dias, aconteceram em virtude da complementação da α - amilase endógena, maximizando a atuação nas moléculas de amido do alimento. O ganho de peso proporcionado por estas carboidrases representou, 7,4% a mais em relação ao CN1, sem suplementação enzimática.

Ao mesmo tempo, a presença de β -glucanase pode ter alterado a arquitetura das paredes celulares do milho, propiciando melhor contato da amilase com seu substrato no interior do grão, como sugerem Cowieson and Adeola, 2005.

A idade das aves pode afetar os valores de digestibilidade do amido, pois de acordo com Nitsan et al. (1991) a atividade da α -amilase produzida pelo pâncreas diminui do 3º ao 6º dia após o nascimento do pinto, entretanto, aumenta em seguida, aproximadamente, 10 a 20% no 11º dia de vida. Dessa forma, reduzida α -amilase endógena pode limitar o aproveitamento do amido nos primeiros dias após eclosão. No 13º dia de criação, todas as aves de cada box experimental foram pesadas (dados não publicados) e o ganho de peso das aves consumindo α - amilase e β - glucanase na ração CN1 já era maior significativamente em relação aos demais tratamentos dos CN's e, semelhante ao CP ($p < 0,05$), confirmando outros resultados encontrados na literatura (Zhou et al., 2009; Gracia et al., 2009).

Observa-se que na fase inicial não houve diferenças nos coeficientes de digestibilidade aparente da MS, da PB e do EE entre os tratamentos, entretanto, todas as carboidrases utilizadas nas rações CN1 geraram maiores valores de EMAn, confirmando a disponibilidade de mais 100 kcal/kg de ração pela ação das enzimas exógenas. Apesar desse resultado, o ganho de peso das aves alimentadas com o complexo enzimático 2 (α - galactosidase, galactomananase, β -xilanaase e β - glucanase) e 3 (β - xilanaase e β - glucanase) não foi suficiente para se igualar ao CN1 contendo α - amilase e β - glucanase, provavelmente,

porque a valorização proteica e de aminoácidos deve ter sido alta para estas enzimas, em conjunto com a fitase.

Esses resultados também sustentam a possível ação da amilase exógena na molécula de amido, pois a retenção de energia não foi mediada por maior aproveitamento da gordura, mas devido a outros nutrientes que compõem a energia da ração, como o amido, verificado em outros trabalhos por Knuckles and Betschart, 1987, Cowieson et al., 2004 and Cowieson, 2005.

Apesar de alguns autores afirmarem que os efeitos na digestibilidade dos nutrientes são melhor percebidos quando se avalia a digesta ileal, na fase inicial, os cecos das aves ainda não estão completamente desenvolvidos e a fermentação da digesta é pequena (Rostagno et al., 1999), portanto, possivelmente, não houve influencia nos valores pelo método adotado no estudo, de coleta total de excretas.

Nas fases de crescimento e final pode ter havido efeito residual da fase anterior, entretanto, deve se considerar a satisfatória atuação do complexo enzimático 3 com o avançar da idade das aves, com aumento no ganho de peso em 111g e 123 g, quando compara-se ao CN1, sem enzimas, nas avaliações de 1 a 35 e 1 a 41 dias de idade, respectivamente. Esses resultados representaram melhoria de 1,8% e 1,65% na conversão alimentar das aves, porém, não foram suficientes para equalizar aos valores de CA das aves alimentadas com a ração CP, assim como ocorreu com o complexo de carboidrase 1 (CN1).

O efeito positivo do complexo 3 pode ser devido a ação da xilanase na diminuição da viscosidade da digesta, proporcionando menor constante de difusão e dessa forma, aumentando o aproveitamento da proteína indigestível do alimento como um todo. Avaliando todos os aminoácidos, na maioria dos ingredientes vegetais, Cowieson and Bedford(2009) observaram melhorias na digestibilidade ileal de 16%, em média, com o uso de xilanase. Embora, alguns

trabalhos realizados com fitase e xilanase em rações contendo trigo para aves tenham mostrado que há um efeito subaditivo em todos os aminoácidos, principalmente aqueles encontrados na mucina, como serina, treonina, e ácido aspártico. Isso parece acontecer em virtude de um conflito de ações entre as enzimas, onde a xilanase exógena estimula as células de *globet* a produzir mucina, relacionado a diminuição da viscosidade, enquanto a fitase age contrariamente, diminuindo a atividade destas células (Sharma et al., 1997; Fernandez et al., 2000). Porém, outros trabalhos devem ser realizados para confirmar esse efeito em rações com milho e farelo de soja.

Associando os resultados de desempenho e metabolismo da fase final, pode-se hipotetizar que as reduções estipuladas para aminoácidos, PB e EMA das rações, foram superestimadas. Os valores dos coeficientes de digestibilidade da MS e da PB foram menores para todas as rações dos CN's, em relação ao CP, porém, os maiores valores dos CDAPB foram decorrentes da suplementação com β – xilanase e β – glucanase e α – amilase e β – glucanase, no CN1, sustentando, dessa forma, os resultados de desempenho.

Vários trabalhos demonstram melhorias na digestibilidade do amido, da gordura e de proteínas com o uso de enzimas através da liberação dos nutrientes encapsulados na parede celular dos vegetais. A quebra dessa estrutura e a hidrólise das moléculas de polissacarídeos não amiláceos complexados com proteínas, por exemplo, leva a exposição deste nutriente à enzimas endógenas com atividade proteolítica (AFTA, 2012).

A aceitação geral de que as carboidrases aumentam somente o conteúdo energético dos alimentos é contestado por alguns trabalhos na literatura (Kocher et al., 2002; Ghazi et al., 2003; Meng and Slominski, 2005; Rutherford et al., 2007; Cowieson et al., 2010; Li et al., 2010), os quais demonstram aumento de 3,3% a 7,1% (média de 5,2%) na digestibilidade de proteínas. No presente

estudo houve melhoria de 5,25% e 5,78% no aproveitamento desse nutriente quando se utilizou os complexos 1 e 3, respectivamente, na fase final.

A EMAn dos CN's com enzimas, não foi recuperada, em relação ao tratamento CP na fase final, embora todos os complexos de carboidrases utilizados no CN1 foram capazes de aumentar o aproveitamento da energia pelas aves, principalmente o complexo 3, composto por xilanase e β – glucanase, que também foi efetivo na ração CN2 (quando compara-se a ração sem enzimas). Contudo, a interação entre fitase e carboidrases não sustenta a redução de 100 kcal de EMAn/kg na ração, nas fases avaliadas de 1 a 35 e 1 a 41 dias.

Várias evidências sugerem que a utilização de produtos com várias atividades enzimáticas atuando em diferentes substratos podem promover melhores resultados (Meng et al., 2005; Kocher et al., 2003) em relação a produtos de atividade única, entretanto, de acordo com os resultados da carboidrase 2 deste trabalho, isso nem sempre acontece.

O diferencial energético das rações com redução de até 150 kcal de EMA, 2% de PB e de 3% de aminoácidos, independentemente do uso das enzimas, não interferiu no rendimento de carcaça, peito, coxa e sobrecoxa e gordura abdominal das aves com 42 dias de idade. Esses resultados corroboram com Zanella et al. (1999), Torres et al. (2003) e Fortes et al. (2012). Entretanto, Neto et al. (2012) demonstraram que a suplementação enzimática reduz a gordura abdominal de frangos de corte, provavelmente por disponibilizar mais nutrientes para a síntese muscular, sem a necessidade de desaminar aminoácidos para fornecer energia. Por outro lado, torna-se importante avaliar esses parâmetros quando se reduz o nível proteico da ração, porque pode ocorrer maior porcentagem de gordura abdominal nas carcaças, em função do menor incremento calórico e conseqüentemente, maior energia líquida. A energia líquida é usada para a manutenção e produção e o excesso é depositado na

forma de gordura (Musharaf and Latshaw, 1999). Portanto, as reduções propostas não foram suficientes para causar esse aumento na gordura abdominal.

O peso do fígado, pâncreas, ceco e ID, além do comprimento, não foi afetado pelas enzimas e rações experimentais. Na literatura, não há ainda evidências sobre trabalhos demonstrando efeito sobre a biometria de órgãos com o uso de enzimas em rações a base de milho e farelo de soja, com valorizações nutricionais.

Wang et al. (2005) avaliaram frangos de corte alimentados com dietas contendo trigo e níveis crescentes de um complexo enzimático (xilanase e β – glucanase). O peso e comprimento de todos os segmentos do intestino delgado tiveram uma diminuição linear de acordo com os níveis crescentes de suplementação enzimática. Houve também uma relação linear negativa entre o peso do fígado e pâncreas com os níveis do complexo na ração, aos 21 e 42 dias, respectivamente. Esses efeitos podem estar diretamente relacionados com a capacidade do trigo em aumentar a viscosidade da digesta, gerando uma modificação da estrutura e função do intestino e outros órgãos das aves, caracterizando aumento do peso e da atividade secretória do pâncreas, fígado e intestino (Annison and Choct, 1991; Brenes et al., 1993).

5. Conclusão

Na fase inicial de criação (1 a 21 dias), recomenda-se rações suplementadas com α - amilase, β – glucanase e fitase, com redução da energia em 100 kcal/kg de EMAn, 2% de PB, 3% de aminoácidos limitantes e 0,12 pontos percentuais de Ca e Pd.

Na fase de 1 a 35 e 1 a 42 dias de idade, a enzima fitase e os complexos de α - amilase, β - glucanase e xilanase com β - glucanase são efetivas em melhorar a CA comparado a aves dos CN's sem suplementação.

O rendimento de carcaça, cortes, gordura abdominal, o peso do pâncreas, fígado, ceco e intestino delgado, além do comprimento do ID, aos 42 dias de idade, não são influenciados pelas reduções nutricionais e da energia da ração, nem pelas enzimas suplementadas.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) e à Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro. Às todas as empresas, pelo fornecimento das enzimas.

Referências

- Annison, G., Choct. M., 1991. Antinutritive activities of cereal non-starch polysaccharides in broiler diets and strategies for minimizing their effects. *World's Poult Sci. J.* 47, 232–242.
- Afta, U., 2012. Exogenous carbohydrases in cor-soy diets for broilers. *World's Poult Sci.* 68, 447-464.
- Association of Official Analytical chemists – Internacional [AOAC]. 2005. *Official Methods of Analysis*. 18ed. AOAC, Gaithersburg, MD, USA.
- Bertechini, A.G., 2012. *Nutrição de monogástricos*. 2 ed. UFLA, Lavras.
- Brenes, A., Guenter, W., Marquardt, R.R., vRotter, B. A., 1993. Effect of -glucanase/ pentosanase enzyme supplementation on the performance of chickens and laying hens fed wheat, barley, naked oats and rye diets. *Can. J. Anim. Sc.* 73, 941–951.
- Camden, B.J.; Morel, P.C.H.; Thomas, D.V., Ravindran, V., Bedford., M.R., 2001. Effectiveness of exogenous microbial phytase in improving the bioavailabilities of phosphorus and other nutrients in maize–soya-bean meal diets for broilers. *Anim. Sc.* 73, 289-297.

- Cowieson, A. J., T. Acamovic, and M. R. Bedford. 2004. The effects of phytase and phytic acid on the loss of endogenous amino acids and minerals from chickens. *British Poultry Science*, 45, 101–108.
- Cowieson, A.J. 2005. Factors that influence the nutritional value of maize for broilers. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 119, 293-305.
- Cowieson, A. J.; Adeola, O, 2005. Carbohydrase, protease, and phytase have an additive beneficial effect in nutritionally marginal diets for broilers chicks. *Poult Sci.*, 84, 1860–1867.
- Cowieson, A.J., Acamovi, C.T., Bedford, M.R., 2006 . Phytic acid and phytase: implications for protein utilization by poultry. *Poult Sci.* 85, 878–885.
- Cowieson, A.J.; Bedford, M.R., 2009. The effect of phytase and carbohydrase on ileal amino acid digestibility in mono-gastric diets: complementary mode of action? *World's Poultry Sci. J.* 65, 609-624.
- Cowieson, A.J., 2010. Strategic Selection of Exogenous Enzymes for corn/soy-based Poultry Diets. *Poult Sci.*, 47, 1-7.
- Fernandez, F., Sharma, R., Hinton, M., Bedford, M.R. 2000. Diet influences the colonisation of *Campylobacter jejuni* and distribution of mucin carbohydrates in the chick intestinal tract. *Cell. Mol. Life Sci.* 57, 1793-1801.
- Ferreira, D.F. Sistema para análise de variância para dados balanceados – SISVAR 5.3. Lavras: UFLA, 2010. Software.
- Fortes, B. D.; Café, M.B.; Stringuini, J.H.; Brito, J.A.G.; Rezende, P.L.P.; Silva, R.D. 2012. Avaliação de programas nutricionais com a utilização de carboidrases e fitase em rações de frangos de corte. *Ci. Anim. Bras.* 13, 24–32.
- Ghazi, S., Rooke, J.A., Galbraith, H., 2003. Improvement of the nutritive value of soybean meal by protease and α – galactosidase treatment in broiler cockerels and chicks. *Br. Poultry Sci.*, 44, 410-418.
- Gracia, M.I, Lázaro, R., Latorre, M.A., Medel, P., Aranibar, M.J., Jimenez-Moreno, E., Mateos, G.G., 2009. Influence of enzyme supplementation of diets and cooking-flaking of maize on digestive traits and growth performance of broilers from 1 to 21 days of age. *Anim. Feed Sci. Technol.* 150, 303-315.
- Kies, A.K. et al. Effect of graded doses of microbial phytase on the digestibility of various minerals in piglets. 2005. In: KIES, A. K. *Phytase studies in pigs and poultry: effect on protein digestion and energy utilization*. Wageningen: Wageningen University, chap. 6, p. 77-87.
- Kocher, A.; Choct, M.; Porter, M.D., Broz, J. 2002. Effects of feed enzymes on nutritive value of soybean meal fed to broilers. *Br Poultry Sci.* 43, 54-63.

- Kocher, M.T.; Choct, M.; Ross, G.; Broz, J.; Chung, T.K., 2003. Effects of enzyme combinations on apparent metabolizable energy of corn-soybean meal-based diets in broiler. *J Appl. Poult Res.* 12, 275-285.
- Kornegay, E.T., 2001. Digestion of phosphorus and other nutrients: the role of phytases and factors influencing their activity. In: BEDFORD, M. R.; PARTRIDGE, G. G. *Enzymes in farm nutrition*. Londres: Cab International, pp. 237-271.
- Knuckles, B.E., Betschart A.A., 1987. Effect of phytate and other myo-inositol esters on α -amylase digestion of starch. *J. Food Sci.*, 52, 719–721.
- Li, Y., Xiang, G.; Yiqun, C., Zhimin, L., Yunhe, C. 2010. Effects of β – mannanase expressed by *pichia pastoris* in corn-soybean meal diets on broiler performance, nutrient digestibility, energy utilization and immunoglobulin levels. *Anim. Feed Sci. Technol.*
- Matterson, L.D., Potter, L.M., Stutz ,M.W., Singsen, E.P. 1965. The metabolizable energy of feed ingredients for chickens. Storrs, Connecticut: The University of Connecticut, Agricultural Experiment Station; 1965. p.11. Research Report, 7.
- Meneghetti, C., Bertechini, A.G., Rodrigues, P.B., Fassani, E.J., Brito, J.A.G., Reis, M.P., Garcia Junior, A.M.P. 2011. Altos níveis de fitase em rações para frangos de corte. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 63, 624-632.
- Meng, X., Slominski, B. A., 2005. Nutritive values of corn, soybean meal, canola meal, and peas for broiler chickens as affected by a muticarbhydrase preparation of cell wall degrading enzymes. *Poult. Sci.* 84, 1242-1251.
- Meng, X., Slominski, B. A., Nyachoti, C.M., Campbell, L. D., Guenter, W., 2005. Degradation of cell wall polysaccharides by combinations of carbohydrase enzymes and their effect on nutrient utilization and broiler chicken performance. *Poult Sci.* 84, 37–47.
- Mogin, P. 1981. Recent Advances in dietary anion-cation balance: application in poultry. *Proc Nutr Soc.* 50, 285-294.
- Musharaf, N.A.; Latshaw, J.D., 1999. Heat increment as affected by protein and amino acid nutrition. *World's Poult Sci. J.* 55, 233-240.
- Neto, R.M. , Ceccantini, M.L., Fernandes, J.I., 2012. Productive Performance, Intestinal Morphology and Carcass Yield of Broilers Fed Conventional and Alternative Diets Containing Commercial Enzymatic Complex. *Int. J. Poult Sci.* 11, 505-516.
- Nitsan, Z., Ben-Avraham, G., Zoref, Z., Nir, I., 1991. Growth and development of the digestive organs and some enzymes in broiler chicks after hatching. *Br. Poult. Sci.* 32, 515–523.

- Pack, M.; Bedford, M. 1997. Feed enzymes for corn-soybean broiler diets: new concept to improve nutritional value and economics. *World's Poult Sci. J.* 53, 87-93.
- Ravindran, V.; Selle, P.H.; Ravindran, G., Morel, P. C. H., Kies, A. K., Bryden, W. L. 2001. Microbial phytase improves performance, apparent metabolizable energy and ileal amino acid digestibility of broilers fed a lysine-deficient diet. *PoultSci.* 80, 338–344.
- Ritz, C. W. et al. 1995. Growth and intestinal morphology of male turkeys as influenced by dietary supplementation of amylase and xylanase. *Poult Sci.* 74, 1329–1334.
- Rostagno, H.S., Nascimento, A.H., Albino, L.F.T. Aminoácidos totais e digestíveis para aves. In: *Simpósio Internacional sobre Nutrição SP, 1999. Anais...* Campinas: FACTA, p. 65-83, 1999.
- Rostagno, H.S., Albino, L.F.T., Donzele, J.L., Gomes, P.C., Oliveira, R.F. de Lopes, D.C., Ferreira, A.S, Barreto, S.L. de T., Euclides, R.F., 2011. *Tables for Poultry and Swine: Composition of Feedstuffs and Nutritional Requirements*, 3ed. Federal University of Viçosa, Viçosa, p. 252.
- Rutherford, S.M., Chung, T.K.; Moughan, P.J., 2007. The effect of a commercial enzyme preparation on apparent metabolizable energy, the true ileal amino acid digestibility, and endogenous ileal lysine losses in broiler chickens. *Poult Sci.*, 86,665–672.
- Sharma, R., Fernandez, F., Hinton, M., Schumacher, U.,1997. The influence of diet on the mucin carbohydrates in the chick intestinal tract. *Cell. Mol. Life Sci.* 53, 935-942
- Silva, D.J., Queiroz, A.C. *Análises de alimentos: métodos químicos e biológicos.* Viçosa, MG: UFV, 2002. 235p.
- Thompson, L.U., Yoon, J.H. 1984. Starch digestibility as affected by polyphenols and phytic acid. *J. Food Sci.*49, 1228-1229.
- Torres, D. M., Teixeira, A. S., Rodrigues, P. B.; Bertechini, A. G.; Freitas, R. T. F., Santos, E. C. 2003. Eficiência das enzimas amilase, protease e xilanase sobre o desempenho de frangos de corte. *Ciênc. Agrotec.* 27, 1401-1408.
- Wang, Z. R., Qiao, S. Y., Lu, W. Q., Li, D. F.,2005. Effects of Enzyme Supplementation on Performance, Nutrient Digestibility, Gastrointestinal Morphology, and Volatile Fatty Acid Profiles in the Hindgut of Broilers Fed Wheat-based Diets. *Poult Sci.*84, 875– 881.
- Zanella, I., Sakomura, N.K., Silversides, F.G., Figueirido, A., Pack, M.,1999.Effect of enzyme supplementation of broiler diets based on corn and soybeans. *Poult Sci.* 78, 561-568.

Zhou, Y., Jiang, Z., Lv, D., Wang, T., 2009. Improved energy-utilizing efficiency by enzyme preparation supplement in broiler diets with different metabolizable energy levels. *Poult Sci.* 88, 316–322.

ARTIGO 2 - Associação de fitase, carboidrases e diferentes proteases em rações para frangos de corte

Meneghetti, C.; Bertechini, A.G. et al.

Artigo redigido conforme normas da Revista Animal Feed Science and Technology – versão preliminar

Resumo

Um experimento foi realizado para avaliar as reduções nutricionais e da energia metabolizável de rações suplementadas com fitase, carboidrases e diferentes proteases, para frangos de corte. Foram avaliados 7 tratamentos com 8 repetições cada, totalizando 56 parcelas. Os tratamentos foram: I) CP; II) CN1 (redução de 100 kcal/kg de EMAn, 7,0% de aas e PB e 0,12 pontos percentuais de Pd e Ca); III) CN2 (redução de 100 kcal/kg de EMAn, 10% de aas e PB e 0,12 pontos percentuais de Pd e Ca); IV) CN1 + fitase + carboidrase (α – amilase e β – glucanase) + protease 1; V) CN1 + fitase + carboidrase + protease 2; VI) CN2 + fitase + carboidrase + protease 1; VII) CN2 + fitase + carboidrase + protease 2. Na fase inicial, a protease 1, na ração CN1, proporcionou melhoria na CA, sem diferir do CP. Na fase de 1 a 35 dias, as proteases melhoraram a CA, assim como na fase total (1 a 42 dias), salvo a protease 1 na ração CN2. A digestibilidade da PB foi aumentada na fase final com o uso das enzimas, assim como o teor de cinzas da tíbia. Não houve diferença nas características de carcaça, cortes e na gordura abdominal. A suplementação de fitase, α -amilase, β -glucanase e protease em rações com redução nutricional e da energia, pode ser usada até 42 dias de idade, sem causar

prejuízos no desempenho, na digestibilidade da PB e da MS, nas características de carcaça e cinzas ósseas de frangos de corte.

Palavras-chave: enzimas, desempenho, digestibilidade, rendimento.

Abreviações:

aas: aminoácidos; Ca: cálcio; CA: conversão alimentar; CDA: coeficiente de digestibilidade aparente; CP: controle positivo; CN: controle negativo; EMAn: energia metabolizável aparente corrigida para balanço de nitrogênio; GP: ganho de peso; MS: matéria seca; PB: proteína bruta; Pd: fósforo disponível.

1.Introdução

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

Além disso, as proteases exógenas podem amenizar os efeitos de fatores anti-nutricionais da soja, como lecitinas e inibidores de proteases, caso não haja tratamento térmico adequado. Dentre esses efeitos há decréscimos na digestibilidade da proteína e da gordura, reduzindo a absorção de nutrientes, principalmente de aminoácidos sulfurados (Zanella et al., 1999). Esses fatores anti-nutricionais causam aumento na produção de mucina e conseqüentemente,

maior perda endógena de aminoácidos. Nesse contexto, a protease exógena aumenta a digestibilidade proteica pela diminuição da perda endógena, proporcionando um efeito secundário no aproveitamento da energia da ração.

O farelo de soja é a fonte proteica mais utilizada em rações brasileiras para frangos de corte, entretanto, o seu alto custo no últimos anos sustenta a suplementação de proteases a fim de otimizar seu valor nutricional.

Estudos realizados no Brasil destinados especificamente para frangos de corte abordam proteases de serina, tais como quimiotripsina, tripsina e elastase, entretanto, diferem destas por serem endopeptidases relativamente sem especificidade quanto à hidrólise de ligações peptídicas e, portanto, com potencial de ação sobre todas as proteínas.

A interpretação de resultados a partir de estudos publicados com proteases é confundida pela existência de mais de uma atividade enzimática em um único tratamento, mas também pela diversidade de ingredientes e tipos de proteases usadas nos mesmos (Marsman et al., 1997; Simbaya et al., 1996; Naveed et al., 1998;). Assim, resultados inconsistentes e variáveis são frequentemente encontrados. Por outro lado, produtos que possuem apenas atividades de protease permitem uma interpretação mais fácil dos resultados a nível experimental, ainda que estes sejam mais escassos na literatura.

Ghazi et al. (2002) observaram efeitos positivos usando uma protease, tanto *in vitro* como *in vivo*, quando dietas foram marginalmente deficientes em aminoácidos. Diferenças consideráveis na digestibilidade de nitrogênio e na energia metabolizável foram encontradas quando duas proteases monocomponentes foram utilizadas (Ghazi et al., 1997a, b). Melhorias na digestibilidade da matéria seca e energia têm sido citadas quando proteases exógenas foram utilizadas, mas estas podem ocorrer em paralelo a diminuição da

atividade de quimiotripsina no pâncreas, e de amilase, tripsina e quimiotripsina no intestino delgado (Ghazi et al., 2002; Mahagna et al., 1995).

Recuperação do ganho de peso e conversão alimentar quando se suplementa proteases monocomponentes em rações com redução nutricional de aminoácidos e proteína bruta também são reportados em várias pesquisas (Odetallh et al., 2005; Wang et al., 2006; Bertechini et al, 2009; Carvalho et al, 2009; Angel et al, 2011).

A associação de proteases e outro grupo de enzimas deve ser investigada em relação a resistência deste à atividade proteolítica, devido a inespecificidade quanto à hidrólise de ligações peptídicas e, portanto, com potencial de ação sobre todas as proteínas, inclusive as enzimas exógenas. Sendo assim, objetivou-se com o trabalho determinar até quanto se pode reduzir os nutrientes de rações contendo fitase, carboidrases e diferentes proteases para frangos de corte, avaliando o desempenho, rendimento de carcaça, digestibilidade dos nutrientes e cinzas ósseas.

2. Material e Métodos

O experimento foi conduzido na Universidade Federal de Lavras (UFLA) na cidade de Lavras (Minas Gerais), no período de setembro de 2012 a dezembro de 2012. Todos os procedimentos realizados durante o experimento foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Lavras (UFLA) (protocolo nº 066/12).

2.1 Delineamento experimental e tratamentos

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 7 tratamentos e 8 repetições cada, totalizando 56 parcelas experimentais.

Foram utilizadas três rações, uma ração CP, sem suplementação enzimática e duas rações CN, sem enzimas, com redução de 7% e 10% nos primeiros aminoácidos limitantes (metionina, lisina e treonina) e na proteína bruta, respectivamente. Em ambas as rações dos CN's também reduziu-se 100 kcal/kg de EMA e 0,12 pontos percentuais de fósforo disponível e cálcio. A partir dessas rações, foram suplementados uma enzima fitase, carboidrases e duas diferentes proteases monocomponentes em cada CN, constituindo os tratamentos, listados a seguir:

- 1.CP, sem enzimas
- 2.CN1, sem enzimas
- 3.CN2, sem enzimas
- 4.CN1 + fitase (50g/ton) + carboidrases(300 g/ton) + Protease 1 (500 g/ton)
- 5.CN1 + fitase (50g/ton) + carboidrases (300 g/ton) + Protease 2 (200 g/ton)
- 6.CN2 + fitase (50g/ton) + carboidrases (300 g/ton) + Protease 1(500 g/ton)
- 7.CN2 + fitase (50g/ton) + carboidrases(300 g/ton) + Protease 2 (200 g/ton)

As enzimas foram adicionadas nas rações substituindo-se parcialmente o inerte (caulim) das rações dos CN's. As proteases usadas foram: protease 1 (P1), com atividade mínima de 600.000 U/g e produzida por *Bacillus licheniformis*; protease 2 (P2), com atividade mínima declarada de 75.000 U/g, produzida a partir do micro-organismo *Bacillus licheniformis*, contendo gene de *Nocardiopsis prasina*.

A fitase utilizada apresentava atividade mínima declarada de 10.000 FTU/g de produto, produzida por *Schizosaccharomyces pombe* geneticamente

modificado com o gene de *Escherichia coli*. O complexo de carboidrase (C) testado é composto por α – amilase (200 kNU) e β –glucanase (350 FGB) por grama de produto, produzida por *Bacillus amyloliquefaciens*.

2.2 Rações

Foram realizadas análises do milho e do farelo de soja anteriormente a formulação das rações experimentais, em seus principais componentes de interesse (aminoácidos, proteína bruta, cálcio e fósforo), pelo CBO Análises Laboratoriais, em Campinas, São Paulo (Tabela 1). A composição, em nutrientes, dos demais ingredientes, assim como a EM e da PB dos aminoácidos sintéticos utilizados foi obtida das Tabelas brasileiras (Rostagno et al., 2011).

As rações foram fareladas, formuladas seguindo as exigências de Bertechini (2012), de acordo com as fases de criação (1 a 21; 22 a 35 e 36 a 42 dias) (Tabelas 2, 3 e 4).

Tabela 1 Composição analisada do milho e farelo de soja utilizados no experimento.

Componentes	Milho	Farelo de soja
	%	
Alanina	0,53	2,10
Arginina	0,35	3,52
Ácido Aspártico	0,44	5,38
Glicina	0,29	2,21
Isoleucina	0,22	1,93
Leucina	0,87	3,75
Ácido Glutâmico	1,26	8,73
Lisina	0,20	2,91
Cistina	0,13	0,44
Metionina	0,15	0,58
Fenilalanina	0,33	2,44
Tirosina	0,27	1,75
Treonina	0,27	1,93

Prolina	0,70	2,60
Valina	0,32	2,05
Histidina	0,18	1,27
Serina	0,31	2,67
Total	6,82	46,26
Proteína Bruta	6,86	46,37
Cálcio	0,02	0,25
Fósforo total	0,22	0,58

Tabela 2 Rações basais da fase inicial (1 a 21 dias) para frangos de corte.

Ingredientes (g/kg de ração, em matéria natural)	Rações Basais		
	CP ¹	CN1 ²	CN2 ³
Milho	552,12	628,65	648,25
Farelo de Soja	370,03	327,39	316,80
Óleo de soja	36,02	6,37	3,17
Fosfato bicálcico	18,96	12,79	12,93
Bicarbonato de sódio	0,00	1,30	1,85
Calcário calcítico	7,33	8,41	8,42
Sal comum	4,95	4,05	3,67
Premix Mineral ⁴	0,50	0,50	0,50
Premix Vitamínico ⁵	1,00	1,00	1,00
DL-Metionina 99%	3,71	3,35	3,20
L-Lisina 78%	2,76	2,91	2,93
L-Treonina 98%	0,91	0,86	0,85
Cloreto de colina 60%	0,60	0,60	0,60
Bacitracina Zn 15%	0,30	0,30	0,30
Salinomicina 12%	0,50	0,50	0,50
Caulim	0,00	1,00	1,00
Composição nutricional calculada (g/kg de ração, em matéria natural)			
EMA (kcal/kg)	3050	2950	2950
Proteína Bruta	214,80	200,10	193,68
Cálcio	8,45	7,25	7,25
Fósforo total	7,06	5,77	5,75
Fósforo disponível	4,60	3,40	3,40
Sódio	2,15	2,15	2,15
Metionina + Cistina digestível	9,35	8,70	8,41
Lisina digestível	13,0	12,1	11,7

Treonina digestível	8,48	7,88	7,63
BE (mEq/kg) ⁶	210	210	210

¹ Ração controle positivo. ² Ração controle Negativo 1. ³ Ração controle Negativo 2.

⁴ Suplementado por kg de ração: vitamina A - 12.000 UI; vitamina D3- 2.500 UI; vitamina E -30 UI; vitamina B1 - 2 mg; vitamina B6 - 3 mg; pantotenato de cálcio- 10 mg; biotina- 0,07 mg; vitamina k3 - 3 mg; ácido fólico - 1 mg; ácido nicotínico - 35 mg; vit. B12 - 15 µg; selênio - 0,12 mg; BHT - 5 mg.

⁵ Suplementado por kg de ração: manganês - 80 mg; ferro- 50 mg; zinco 50 mg; cobre - 10 mg; cobalto- 1 mg; iodo - 1 mg.

⁶ Balanço eletrolítico calculado segundo a equação de Mogin (1981).

Tabela 3 Rações basais da fase de crescimento (22-35 dias) para frangos de corte.

Ingredientes (g/kg de ração, em matéria natural)	Rações Basais		
	CP ¹	CN1 ²	CN2 ³
Milho	589,35	650,00	655,40
Farelo de Soja	329,38	296,97	295,95
Óleo de soja	43,95	17,40	13,00
Fosfato bicálcico	16,03	9,07	9,07
Bicarbonato de sódio	0,00	1,98	1,99
Calcário calcítico	7,44	10,58	10,58
Sal comum	4,60	3,24	3,23
Premix Mineral ⁴	0,50	0,50	0,50
Premix Vitamínico ⁵	0,80	0,80	0,80
DL-Metionina 99%	3,23	2,93	2,92
L-Lisina 78%	2,60	3,21	3,23
L-Treonina 98%	0,81	1,03	1,03
Cloreto de colina 60%	0,50	0,50	0,50
Bacitracina Zn 15%	0,30	0,30	0,30
Salinomicina 12%	0,50	0,50	0,50
Caulim	0	1,00	1,00
Composição nutricional calculada (g/kg de ração, em matéria natural)			
EMA (kcal/kg)	3150	3050	3050
Proteína Bruta	198,0	183,5	177,6
Cálcio	7,70	6,50	6,50
Fósforo total	6,33	5,04	5,02
Fósforo disponível	4,00	2,80	2,80
Sódio	2,00	2,00	2,00
Metionina + Cistina digestível	8,50	7,90	7,70
Lisina digestível	11,9	11,0	10,7
Treonina digestível	7,80	7,20	7,00
BE (mEq/kg) ⁶	190	190	191

¹ Ração controle positivo. ² Ração controle Negativo 1. ³ Ração controle Negativo 2.

⁴ Suplementado por kg de ração: vitamina A - 12.000 UI; vitamina D3- 2.500 UI; vitamina E -30 UI; vitamina B1 - 2 mg; vitamina B6 - 3 mg; pantotenato de cálcio- 10 mg; biotina- 0,07 mg; vitamina k3 - 3 mg; ácido fólico - 1 mg; ácido nicotínico - 35 mg; vit. B12 - 15 µg; selênio - 0,12 mg; BHT - 5 mg.

⁵ Suplementado por kg de ração: manganês - 80 mg; ferro- 50 mg; zinco 50 mg; cobre - 10 mg; cobalto- 1 mg; iodo - 1 mg.

⁶ Balanço eletrolítico calculado segundo a equação de Mogin (1981).

Tabela 4 Rações basais da fase final (36-42 dias) para frangos de corte.

Ingredientes (g/kg de ração, em matéria natural)	Rações Basais		
	CP ¹	CN1 ²	CN2 ³
Milho	624,05	695,01	711,90
Farelo de Soja	296,93	258,69	244,20
Óleo de soja	44,77	16,02	13,30
Fosfato bicálcico	14,12	7,91	8,04
Bicarbonato de sódio	0,00	1,09	2,00
Calcário calcítico	7,51	8,58	8,59
Sal comum	4,34	3,58	2,96
Premix Mineral ⁴	0,50	0,50	0,50
Premix Vitamínico ⁵	0,60	0,60	0,60
DL-Metionina 99%	2,95	2,65	2,53
L-Lisina 78%	2,63	2,79	2,82
L-Treonina 98%	0,80	0,77	0,76
Cloreto de colina 60%	0,50	0,50	0,50
Bacitracina Zn 15%	0,30	0,30	0,30
Caulim	0,00	1,00	1,00
Composição nutricional calculada (g/kg de ração, em matéria natural)			
EMA (kcal/kg)	3200	3100	3100
Proteína Bruta	185,10	172,20	165,90
Cálcio	7,15	5,96	0,96
Fósforo total	5,84	4,57	4,55
Fósforo disponível	3,57	2,38	2,38
Sódio	1,90	1,90	1,90
Metionina + Cistina digestível	7,93	7,38	7,13
Lisina digestível	1,10	1,03	0,99
Treonina digestível	7,28	6,77	6,55
BE (mEq/kg) ⁶	180	180	180

¹ Ração controle positivo. ² Ração controle Negativo 1. ³ Ração controle Negativo 2.

⁴ Suplementado por kg de ração: vitamina A - 12.000 UI; vitamina D3- 2.500 UI; vitamina E -30 UI; vitamina B1 - 2 mg; vitamina B6 - 3 mg; pantotenato de cálcio- 10

mg; biotina- 0,07 mg; vitamina k3 - 3 mg; ácido fólico - 1 mg; ácido nicotínico - 35 mg; vit. B12 - 15 µg; selênio - 0,12 mg; BHT - 5 mg.

⁵ Suplementado por kg de ração: manganês - 80 mg; ferro- 50 mg; zinco 50 mg; cobre - 10 mg; cobalto- 1 mg; iodo - 1 mg.

⁶ Balanço eletrolítico calculado segundo a equação de Mogin (1981).

2.4 Procedimentos experimentais

No total, 1400 frangos de corte machos da linhagem Cobb-500[®] foram utilizados no experimento. Os pintos foram adquiridos de incubatório comercial, vacinados contra doença de Marek, com um dia de idade e criados em galpão convencional, contendo cortinas laterais com dispositivos de catraca (subida e descida) para controle parcial da temperatura e ventilação, equipado com boxes experimentais contendo maravalha, comedouro tubular e bebedouro pendular. Cada box continha 25 frangos, correspondendo a 8,33 aves/m².

As aves e as rações foram pesadas no primeiro, 21^o, 35^o e 41^o dia de idade, obtendo dessa forma o consumo de ração (CR), o GP e a CA nos períodos de 1 a 21, 1 a 35 e 1 a 41 dias de criação. A mortalidade em cada parcela foi registrada diariamente para controle da viabilidade de criação e correção do CR e CA das aves.

A temperatura e a umidade relativa (máxima e mínima) foram registradas diariamente, às 16 horas, por meio de um termo-higrômetro localizado na parte central do galpão, cujas médias encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5 Médias, referentes ao valores de temperatura e umidade dentro do galpão registrados durante o experimento.

Semana	Temperatura		Umidade	
	Máxima	Mínima	Máxima	Mínima
1 ^o	34,76	20,27	68,14	39,86
2 ^o	34,97	21,48	79,83	32,67

3°	34,97	21,48	79,83	32,67
4°	32,64	19,47	94,14	34,57
5°	29,87	18,89	98,29	42,71
6°	32,17	16,80	96,43	35,14

No 13° e 35° dia de idade, todas as aves das parcelas foram pesadas e obtido o peso médio para a transferência de 5 e 3 aves, respectivamente, para gaiolas de metabolismo (50 x 50 x 45 cm) providas de bandejas metálicas coletoras, revestidas com plástico para facilitar as coletas de excretas. O comedouro e bebedouro eram individuais “tipo calha”, construídos em chapa de ferro galvanizado dispostos externamente na parte frontal da gaiola. Entretanto, na fase inicial, utilizou-se o bebedouro individual de pressão “tipo infantil”, disposto no interior da gaiola e os pisos das gaiolas foram revestidos com tela plástica de polipropileno de 1cm de diâmetro, para permitir melhor alojamento das aves.

O ensaio de metabolismo foi realizado em sala de 72 m² (12 m x 6 m), construída em alvenaria, com controle de temperatura ambiente por dispositivo digital de controle e sistema de exaustão de calor e gases por ventiladores.

Utilizou-se quatro dias para adaptação à gaiola e três dias para a coleta total de excretas. As coletas foram realizadas uma vez ao dia, na parte da manhã.

As excretas de cada parcela foram acondicionadas em sacos plásticos previamente identificados e armazenados em freezer a temperatura de -5^oC até o período final do experimento. Ao final das coletas, as amostras foram descongeladas, pesadas e homogeneizadas e delas retiradas amostras de 400 gramas para análises laboratoriais de MS,N,EE e energia bruta (EB) (AOAC, 2005). Essas amostras sofreram uma pré-secagem em estufa de ventilação forçada (55^oC) durante o período de 72 horas. Posteriormente, foram pesadas e

moídas em moinho “tipo faca”, com peneiras de 0,5 mm. Paralelamente, alíquotas homogêneas de cada ração foram coletadas, moídas e armazenadas até a realização das mesmas análises químicas propostas para as excretas.

As rações experimentais foram pesadas no início do ensaio metabólico e a sobras descontadas ao final para quantificação do consumo de alimento por ave, referente ao período de coleta de excretas.

Determinou-se nesse estudo, os coeficientes de digestibilidade aparente da matéria seca (CDAMS) e da proteína bruta (CDAPB) das rações experimentais. Para os cálculos dos coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) dos nutrientes (MS e PB) utilizou-se a equação: $CDA \text{ nutriente} = [(g \text{ de nutriente ingerido (em MS)} - g \text{ de nutriente excretado (em MS)}) / g \text{ de nutriente ingerido (em MS)}] \times 100$.

Aos 42 dias de idade, 2 aves de cada box foram pesadas individualmente antes do abate (peso vivo), após período de jejum de, aproximadamente, 8 horas, seguida de sangria, escaldagem, depenagem e evisceração. Na determinação do rendimento de carcaça, considerou-se o peso da carcaça eviscerada (sem vísceras, pés e pescoço), em relação ao peso vivo da ave depois do jejum. Os cortes de pernas (coxa + sobrecoxa), peito e asas foram pesados em balança com precisão de 1 g e seus rendimentos calculados em relação ao peso da carcaça eviscerada. A gordura abdominal foi constituída pelo peso do tecido adiposo presente ao redor da cloaca, da bursa de Fabricius e dos músculos abdominais adjacentes. Para a determinação de cinzas ósseas retirou-se a tíbia esquerda das aves, a qual foi descarnada, seca a 105 °C, desengordurada em éter etílico e incinerada a 600 °C.

2.5 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância utilizando-se o software Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados (SISVAR, 5.3), descrito por Ferreira (2010). A comparação entre os tratamentos foi feita pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

3. Resultados

Os resultados de desempenho das fases de 1 a 21, 1 a 35 e de 1 a 42 dias de idade das aves encontram-se nas Tabelas 6, 7 e 8, respectivamente. Os coeficientes de digestibilidade aparente da MS e da PB das rações iniciais e finais encontram-se na Tabela 9 e, o rendimento de carcaça, cortes e gordura abdominal estão dispostos na Tabela 10. Os valores de cinzas da tíbia esquerda das aves aos 42 dias de idade estão na Tabela 11.

O consumo de ração e o ganho de peso das aves de uma 21 dias de idade não foram afetados pelas enzimas e pelas valorizações nutricionais ($p>0,05$). Entretanto, observa-se que as aves alimentadas com a ração CN1 contendo a P1 obtiveram a melhor conversão alimentar, em relação a todos os CN's ($p<0,05$), sem diferença entre as aves do CP.

Avaliando a fase de 1 a 35 dias de idade, novamente não houve diferenças entre os tratamentos para o consumo de ração e para o ganho de peso das aves ($p>0,05$). Diferentemente da fase anterior, todas as aves consumindo rações dos CN's, suplementadas com enzimas, obtiveram maior eficiência no ganho de peso em relação ao consumo de ração ($P<0,05$), comparadas com as aves dos CN 1 e 2, sem enzimas, contudo, sem diferença entre o CP.

Com a mesma tendência nos resultados, o consumo de ração e o ganho de peso das aves, assim como a viabilidade não foram afetados estatisticamente pelas enzimas e pelas reduções nutricionais impostas, no período total de avaliação (1 a 42 dias). Entretanto, as rações CN1, CN2, sem enzimas e CN2

contendo a P1 proporcionaram os piores valores de conversão alimentar ($p < 0,05$). As demais rações dos CN's com enzimas foram semelhantes ao CP.

Na fase inicial, a digestibilidade aparente da MS foi menor para as aves do CP ($p < 0,05$) e os demais tratamentos obtiveram médias semelhantes entre si. O aproveitamento da PB das rações não diferiu entre as aves nessa fase ($p > 0,05$). Na fase final, a resposta foi diferente, pois não houve diferenças na digestibilidade da MS entre os tratamentos, mas todas as enzimas suplementadas, independente da protease e da valorização nutricional da ração, foram efetivas em equalizar a digestibilidade aparente da PB pelas aves, em relação ao CP ($p < 0,05$). Os CN's 1 e 2, sem enzimas, proporcionaram os piores valores.

Para as variáveis rendimento de carcaça, cortes e gordura abdominal não foram encontradas diferenças entre as aves dos diferentes tratamentos ($p > 0,05$). Entretanto, os teores de cinzas da tibia foram menores nas aves dos CN's, sem suplementação enzimática. ($p < 0,05$).

Tabela 6 Consumo de ração (CR), ganho de peso (GP) e conversão alimentar (CA) de frangos de corte de 1 a 21 dias, alimentados com rações contendo ou não fitase, carboidrases e diferentes proteases.

Tratamento	CR (g/ave)	GP (g/ave)	CA (g/g)*
CP	1197	869	1,377 a
CN1	1247	855	1,461b
CN2	1240	849	1,462 b
CN1 (F + C + P1)	1237	874	1,415 a
CN1 (F + C + P2)	1239	862	1,438 b
CN2 (F + C + P1)	1254	850	1,476 b
CN2 (F + C + P2)	1257	870	1,444 b
Média	1239	861	1,439
CV (%)	3,180	3,860	3,610
Probabilidade	0,074	0,606	0,010

CV: Coeficiente de variação. CP: ração controle positivo. CN1: ração controle negativo 1. CN2: ração controle negativo 2. F: fitase. C: complexo de carboidrase. P: protease

*Médias com letras distintas, nas colunas, diferem entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$).

Tabela 7 Consumo de ração (CR), ganho de peso (GP) e conversão alimentar (CA) de frangos de corte de 1 a 35 dias, alimentados com rações contendo ou não fitase, carboidrases e diferentes proteases.

Tratamentos	CR (g/ave)	GP (g/ave)	CA (g/g)*
CP	3639	2257	1,612 a
CN1	3667	2194	1,672 b
CN2	3610	2191	1,648 b
CN1 (F + C + P1)	3631	2241	1,605 a
CN1 (F + C + P2)	3626	2232	1,624 a
CN2 (F + C + P1)	3599	2216	1,624 a
CN2 (F + C + P2)	3592	2244	1,601 a
Média	3624	2225	1,626
CV (%)	3,030	2,940	2,400
Probabilidade	0,848	0,318	0,016

CV: Coeficiente de variação. CP: ração controle positivo. CN1: ração controle negativo 1. CN2: ração controle negativo 2. F: fitase. C: complexo de carboidrase. P: protease

*Médias com letras distintas, nas colunas, diferem entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$).

Tabela 8 Consumo de ração (CR), ganho de peso (GP), conversão alimentar (CA) e viabilidade (Viab.) de frangos de corte de 1 a 42 dias, alimentados com rações contendo ou não fitase, carboidrases e diferentes proteases.

Tratamentos	CR (g/ave)	GP (g/ave)	CA (g/g)*	Viab. (%)
CP	4716	2847	1,657 a	98,00
CN1	4787	2787	1,717 b	98,00
CN2	4784	2793	1,713 b	98,50
CN1 (F + C + P1)	4756	2835	1,678 a	98,50
CN1 (F + C + P2)	4781	2840	1,684 a	96,50
CN2 (F + C + P1)	4759	2808	1,695 b	98,50
CN2 (F + C + P2)	4712	2805	1,680 a	99,00
Média	4757	2816	1,689	98,14
CV (%)	2,38	2,86	2,14	2,97
Probabilidade	0,716	0,65	0,022	0,724

CV: Coeficiente de variação. CP: ração controle positivo. CN1: ração controle negativo 1. CN2: ração controle negativo 2. F: fitase. C: complexo de carboidrase. P: protease.

*Médias com letras distintas, nas colunas, diferem entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$).

Tabela 9 Coeficientes de digestibilidade aparente da matéria seca (CDAMS) e da proteína bruta (CDAPB) de rações contendo ou não fitase, carboidrases e diferentes proteases para frangos de corte na fase inicial e final de criação.

Tratamentos	Fase Inicial		Fase final	
	CDAMS*	CDAPB	CDAMS	CDAPB*
CP	72,03 b	66,29	75,44	73,24 a
CN1	73,51 a	64,74	76,67	70,02 b
CN2	73,80 a	65,81	76,49	70,94 b
CN1 (F + C + P1)	73,81 a	66,25	75,97	74,38 a
CN1 (F + C + P2)	73,57 a	63,82	76,95	72,91 a
CN2 (F + C + P1)	74,23 a	66,66	76,69	74,21 a
CN2 (F + C + P2)	74,35 a	65,39	77,67	74,10 a
Média	73,61	65,57	76,55	72,83
CV (%)	1,55	4,21	1,95	4,25
Probabilidade	0,004	0,404	0,083	0,038

CV: Coeficiente de variação. CP: ração controle positivo. CN1: ração controle negativo 1. CN2: ração controle negativo 2. F: fitase. C: complexo de carboidrase. P: protease.

*Médias com letras distintas, nas colunas, diferem entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$).

Tabela 10 Rendimentos de carcaça, peito, coxa e sobrecoxa (C+S) e gordura abdominal (Gord. Abd.), expressos em porcentagem, dos frangos aos 42 dias de idade, alimentados com rações contendo ou não fitase, carboidrases e diferentes proteases.

Tratamentos	Carcaça (%)	Peito (%)	C +S (%)	Asa (%)	Gord. Abd. (%)
CP	74,19	38,32	28,62	10,16	1,38
CN1	75,17	38,55	27,42	10,07	1,51
CN2	74,38	38,62	27,92	10,09	1,54
CN1 (F + C + P1)	74,98	37,32	28,02	10,45	1,41
CN1 (F + C + P2)	74,96	38,87	27,56	10,03	1,46
CN2 (F + C + P1)	74,51	38,47	27,98	10,01	1,55
CN2 (F + C + P2)	74,48	37,24	28,42	10,13	1,63
Média	74,67	38,20	27,99	10,14	1,50
CV (%)	1,88	3,79	3,46	4,23	10,85
Probabilidade	0,764	0,16	0,18	0,45	0,06

CV: Coeficiente de variação. CP: ração controle positivo. CN1: ração controle negativo 1. CN2: ração controle negativo 2. F: fitase. C: complexo de carboidrase. P: protease.

*Médias com letras distintas, nas colunas, diferem entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$).

Tabela 11 Teor de cinzas na tíbia das aves aos 42 dias de idade, alimentadas com rações contendo ou não fitase, carboidrases e diferentes proteases.

Tratamentos	Cinzas (g/100 g de MSD)*
CP	51,85 a
CN1	50,41 b
CN2	50,56 b
CN1 (F + C + P1)	51,28 a
CN1 (F + C + P2)	51,71 a
CN2 (F + C + P1)	51,19 a
CN2 (F + C + P2)	52,09 a
Média	51,3
CV (%)	2,19
Probabilidade	0,023

CV: Coeficiente de variação. CP: ração controle positivo. CN1: ração controle negativo 1. CN2: ração controle negativo 2. F: fitase. C: complexo de carboidrase. P: protease.

*Médias com letras distintas, nas colunas, diferem entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$).

MSD: matéria seca desengordurada.

4. Discussão

Geralmente, os resultados de desempenho de frangos de corte na fase inicial de criação, com a suplementação de protease na ração, demonstram melhorias significativas sobre o ganho de peso das aves (Odetallah et al., 2003, Strada et al. (2005), Wang et al.(2006), Angel et al., 2011). Entretanto, neste estudo este fato não ocorreu, embora a CA foi melhorada com a utilização da protease 1 na ração CN1 (1,42 vs 1,46 do CN1). Na fase inicial, havia mais substrato para ação das enzimas com atividade proteolítica, devido a maior exigência de proteína bruta e aminoácidos e consequentemente, maior inclusão do farelo de soja na ração. Por isso, esperava-se uma diferença no ganho de peso entre as aves dos CN's sem enzimas e as demais que receberam rações com as proteases.

Resultado benéfico no ganho de peso com a combinação de carboidrases, fitase e proteases para frangos de corte até os 21 dias de idade, pode estar correlacionado com o aumento no consumo de MS e nutrientes digestíveis, como nitrogênio, Ca, P e a energia (Cowieson et al. 2008). No presente estudo, não houve essa resposta em relação ao aproveitamento da proteína bruta até 21 dias, mas a digestibilidade da MS foi maior para as aves alimentadas com as rações dos CN's. Provavelmente, pode ter havido uma compensação orgânica das aves, em relação a deficiência marginal dos nutrientes.

Na fase de 1 a 35 dias ambas as proteases, a fitase e o complexo de carboidrases nas diferentes rações, foram efetivas em melhorar a conversão alimentar das aves. Isto pode ser sustentado, em partes, pela maior digestibilidade da proteína bruta dessas rações. Em média, houve um aumento de 4,4% no aproveitamento da PB com o uso das enzimas, tanto na ração CN1 quanto na ração CN2, porém, sem contabilizar a protease 1, que proporcionou 6,23% de melhoria na ração com maior redução de aminoácidos e PB.

Estudos anteriores com uma protease de serina contendo genes transcritos de *Nocardiosis prasina* suplementada em rações para frangos de corte também apresentou melhorias na conversão alimentar bem como na digestibilidade da proteína bruta e dos aminoácidos (Bertechini et al, 2009; Carvalho et al, 2009).

Alguns trabalhos mostram que as enzimas fitase, carboidrases e proteases, associadas ou utilizadas isoladamente são capazes de aumentar a digestibilidade de aminoácidos em rações a base de milho e farelo de soja para frangos de corte. Provavelmente, isso ocorre pelo efeito das enzimas nas secreções endógenas, particularmente, porque a magnitude da resposta é maior

para os aminoácidos encontrados em altas concentrações na mucina e nas enzimas. As enzimas exógenas podem reduzir os efeitos adversos dos fatores anti-nutricionais, nas perdas endógenas, aumentando a retenção de aminoácidos e minerais (Marquardt et al., 1996; Cowieson et al., 2004; Onyango et al., 2004; Cowieson and Adeola, 2005; Cowieson et al., 2006, Maiorka et al., 2009).

De acordo com Odetallah et al. (2003), a maior disponibilidade de aminoácidos para a síntese proteica, através da redução da síntese de enzimas endógenas pela inclusão de proteases na ração é provavelmente a causa de melhorias significativas no crescimento das aves. Esse benefício pode ter sido alcançado, paralelamente, à redução da viscosidade do jejuno com a inclusão da protease na ração, diretamente proporcional ao aumento dos níveis suplementados da enzima. A taxa de difusão entre enzimas e substratos diminui quando há redução na viscosidade intestinal, aumentando a absorção dos nutrientes, assim como facilita a formação de micelas e o aproveitamento de gordura, vitaminas lipossolúveis e pigmentos (Bedford et al., 1991).

A avaliação do período total de criação (1 a 42 dias) demonstra que as enzimas utilizadas são capazes de melhorar o aproveitamento dos nutrientes da ração devido ao fato das aves consumirem a mesma quantidade de ração entre os tratamentos. Esse resultado é extremamente interessante em relação a criação de frangos de corte, onde o índice de produção calculado, o qual mede o desempenho zootécnico de um lote, leva em consideração a CA das aves.

A protease 1 quando suplementada na ração CN2, não foi capaz de recuperar a CA, entretanto, vários fatores podem ter influenciado esse resultado, como a fonte proteica utilizada na ração. Talvez, essa enzima atue mais residual e efetivamente em proteínas de origem animal, além disso, a ração CN2 era composta por menor quantidade de substrato proteico, em virtude da redução de 10% da PB e aminoácidos limitantes.

Apesar desse grupo de enzimas ser composto por várias atividades proteolíticas distintas, com ampla ação em diferentes fontes proteicas, existe diferenças entre as proteases do mercado, a começar pelo micro-organismo de origem (Ghazi et al., 1997 a, b; Naveed et al., 1998; Ghazi et al., 2002).

Ghazi et al. (2003) testaram 3 proteases monocomponentes, uma oriunda de *Bacillus subtilis* e duas de *Aspergillus niger*, com atividades diferentes. Os valores de energia metabolizável e digestibilidade verdadeira do nitrogênio foram aumentados com o uso da protease de *Aspergillus niger*, mas sem efeitos com a suplementação da outra fonte. Por outro lado, Angel et al. (2011) reportaram melhorias com o uso da protease de *Bacillus subtilis* de até 7% e 5,18% no ganho de peso e na conversão alimentar, respectivamente, em relação ao CN, sem diferir das aves do CP.

Outro aspecto importante notado neste estudo foi a resistência das enzimas fitase e carboidrases na presença das proteases utilizadas. De acordo com os resultados de desempenho, metabolismo e cinzas ósseas, provavelmente a fitase disponibilizou mais minerais para a formação e sustentação óssea e as carboidrases e a protease proporcionaram maior retenção e aproveitamento da proteína e da energia da ração. Embora seja impossível afirmar a exata contribuição de cada enzima nos diferentes resultados.

Vários trabalhos demonstram que os rendimentos de carcaça, de cortes e de gordura abdominal de frangos de corte consumindo rações a base de milho e farelo de soja, não são influenciados com a suplementação de enzimas exógenas (Zanella et al., 1999; Dessiminoni et al., 2011; Fortes et al., 2012). Por outro lado, Souza et al. (2009) observaram aumento significativo da gordura abdominal de frangos a medida que se aumentou o nível da suplementação com carboidrases. Da mesma forma, Neto et al. (2012) também verificaram esse aumento com a inclusão de um complexo enzimático.

Ingredientes alternativos ao milho e ao farelo de soja, o nível proteico e/ou desequilíbrio de aminoácidos na ração, provavelmente, influenciam mais sensivelmente essas variáveis de rendimento, principalmente a gordura abdominal (Summers et al., 1992; Delezie et al., 2010; Neto et al., 2012).

Quando as rações são deficientes em proteína parece haver maior potencial de resposta pelas proteases na liberação de mais aminoácidos no trato digestório, suprimindo as exigências das aves. Entretanto, para otimizar o rendimento de carcaça e cortes, a exigência de aminoácidos pode ser maior em relação ao ganho de peso. Sibbald and Wolinetz (1986) e Sabino et al. (2004) confirmaram essa afirmativa em seus trabalhos, assim como Wang et al. (2006), que constataram aumento no rendimento de peito em rações contendo protease, mas com o nível proteico da ração acrescido em 5% à exigência das aves.

A enzima fitase foi capaz de melhorar a mineralização óssea em relação aos frangos dos CN's sem enzimas, demonstrando a sua eficiência catalítica na liberação de mais fósforo disponível para essas aves. Alguns relatos sugerem que carboidrases que atuam nos PNA's da parede celular dos vegetais podem facilitar o acesso da fitase na molécula de fitato (Olukosi et al., 2007). No presente estudo a redução de proteína bruta e aminoácidos nas rações não influenciou essa variável, mas Francesch and Geraert (2009) avaliaram um complexo enzimático (xilanase, glucanase e fitase) em dietas de frangos de corte e observaram que as enzimas foram capazes de melhorar a mineralização óssea, mas de forma menos efetiva quando houve uma maior redução de aminoácidos na ração. Esse resultado sugere que não apenas os níveis de Pd e Ca influenciam essa característica, e o fornecimento inadequado de aminoácidos, talvez, possa dificultar a formação da região orgânica da matriz óssea, afetando também a mineralização.

5. Conclusão

A suplementação de fitase, α -amilase, β -glucanase e protease pode ser utilizada em rações com redução de até 10% na proteína bruta e aminoácidos, 100 kcal/kg de EMAn e 0,12 pontos percentuais de cálcio e fósforo disponível, de 1 a 42 dias de idade, sem causar prejuízos no desempenho, na digestibilidade da PB e da MS, nas características de carcaça e gordura abdominal, além das cinzas ósseas de frangos de corte.

Conclui-se também que há diferenças no desempenho das aves quando suplementa-se as rações diferentes proteases, associadas a fitase, α -amilase e β -glucanase.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), à Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro. Às todas as empresas, pelo fornecimento das enzimas.

Referências

- Angel, C.R., Saylor, W., Vieira, S.L., Ward, N., 2011. Effects of a monocomponent protease on performance and protein utilization in 7- to 22-day-old broiler chickens. *Poult Sci.* 90, 2281–2286.
- Bertechini, A. G., Carvalho, J. C. C., Mesquita, F. R., Castro, S. F., Meneghetti, C., Sorbara, J.O. B., 2009. Use of a protease to enhance the utilization of soybean meal amino acids by broilers. *Poult. Sci.*, 88 (Suppl. 1), 69. (Abstr.).
- Bertechini, A.G., 2012. *Nutrição de Monogástricos*. 2 ed. UFLA, Lavras.
- Bedford, M.R., Campbell, G.L., Classen, H.L., 1991. The effect of pelleting, salt and pentosanase on the viscosity of intestinal contents and the performance of broiler fed rye. *Poult. Sci.*, 70, 1571-1577.

- Carvalho, J. C. C., Bertechini, A. G., Rios, R. L., Mesquita, F. R., Lima, E. M. C., Sorbara, J. O. B., 2009. Use of a protease to enhance the utilization of corn amino acids by broilers. *Poult Sci.*, 88 (Suppl. 1), 69–70. (Abstr.)
- Charlton, P. 1996. Expanding enzyme application: higher amino acid and energy values for vegetable proteins. In: *BIOTECHNOLOGY IN THE FEED INDUSTRY*, 12, Nottingham. Proceedings... Nottingham: Nottingham University Press, p.317-326.
- Cowieson, A.J., Adeola, O., 2005. Carbohydrases, protease, and phytase have an additive beneficial effect in nutritionally marginal diets for broiler chicks. *Poult Sci*, 84, 1860–1867.
- Cowieson, A.J., Singh, D.N., Adeola, O. 2006. Prediction of ingredient quality and the effect of a combination of xylanase, amylase, protease and phytase in the diets of broiler chicks. 2. Energy and nutrient utilisation. *Br. Poult Sci.* 47, (August 2006), 490-500.
- Cowieson, A.J.; Ravindran, V., 2008. Effect of exogenous enzymes in maize-based diets varying in nutrient density for young broilers: growth performance and digestibility of energy, minerals and amino acids. *Br Poult Sci.* 49, 37-44,
- Dessimoni, G.V. Planos Nutricionais com suplementação de protease em dietas par frangos de corte. 2011. Dissertação. Universidade Federal do vale do Jequitinhonha (UFVJM). 48 p.
- Delezie, E., Bruggeman, V., Swennen, Q., Decuyper, E., Huyghebaert, G., 2010. The impact of nutrient density in terms of energy and/or protein on live performance, metabolism and carcass composition of female and male broiler chickens of two commercial broiler strains. *J. Anim. Phys. Anim. Nutr.*, 94, 509-518.
- Ferreira, D.F. Sistema para análise de variância para dados balanceados – SISVAR 5.3. Lavras: UFLA, 2010. Software.
- Fortes, B. D.; Café, M.B.; Stringuini, J.H.; Brito, J.A.G.; Rezende, P.L.P.; Silva, R.D., 2012. Avaliação de programas nutricionais com a utilização de carboidrases e fitase em rações de frangos de corte. *Ciênc. Anim. Bras.* 13, 24 – 32.
- 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. *Poult Sci.*, v. 88, p.1915–1924, 2009.
- Ghazi, S., Rooke, J. A., Galbraith, H., Moran, A., 1997a. The potential for improving soybean meal in diets for chickens: treatment with different proteolytic enzymes. *Br. Poult. Sci.* 37:554-555.

- Ghazi, S., Rooke, J. A., Galbraith, H., Moran, A., 1997b. Effect of adding protease and alpha-galactosidase enzyme to soybean meal on nitrogen retention and true razilian ble energy in broilers. *Br. Poult. Sci.* 38, 528-531.
- Ghazi, S., Rooke, J. A., Galbraith, H., Bedford, M. R., 2002. The potential for the improvement in the nutritive value of soybean meal by different proteases in broiler chicks and broiler cockerels. *Br. Poult. Sci.* 43, 70-77.
- Ghazi, S.; Rooke, J.A.; Galbraith, H., 2003. Improvement of the nutritive value of soybean mel by protease and α – galactosidase treatment in broiler cockerels and chicks. *Br Poult Sci.*, 44, 410-418.
- Odetallah, N. H., Wang, J. J., Garlich, J. D., Shih, J. C. H. 2003. Keratinase in Starter Diets Improves Growth of Broiler Chicks. *Poult Sci.* 82:1-7.
- Odetallah, N.H., Wang, J. J., Garlich, J. D., Shih, J. C., 2005. Versazyme supplementation of broiler diets improves Market growth performance. *Poult. Sci.* 84, 858–864.
- Olukosi, A. O., Cowienson, A. J., Adeola, O., 2007. Age-related influence of a cocktail of xylanase, amylase, and protease orphytase individually or in combination in broilers. *Poult. Sci.* 86, 77–86.
- Lemme, A.; Ravindran, V.; Bryden, W.L. 2004. Ileal digestibility of amino acids in feed ingredients for broilers. *World's Poult Sci. J.*, 60, 423–437.
- Mahagna, M., Nir, I., Larbier, M., Nitsan, Z., 1995. Effect 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. *Reprod. Nutr. Dev.*, 35, 201–212.
- Maiorka, A.; Favero, A.; Meurer, R.F.P., Moraes, M.T.T.; Sorbara, J.O.B. 2009. Broiler chicken performance and ileal digestibility is improved by a protease used in corn/soybean meal/meat bone meal diet. In: *INTERNATIONAL POULTRY SCIENTIFIC FORUM, 2009, Atlanta. Proceedings...* Atlanta: Nutrition IV, n.102.
- Marsman, G. J., Gruppen, H., Van der Poel, A. F., Kwakkel, R. P., Verstegen, M. W., Voragen, A. G., 1997. The effect of thermal processing and enzyme treatments of soybean meal on growth performance, ileal nutrient digestibilities, and chime characteristics in broiler chicks. *Poult. Sci.* 76, 864-872.
- Marquardt, R. R. Brenes, A., Zhang, Z., Boros, M.R., 1996. Use of enzymes to improve nutrient availability in poultry feedstuffs. *Anim Feed Sci. Technol.* 60, 321–30.

- Mogin, P. 1981. Recent Advances in dietary anion-cation balance: application in poultry. *Proc Nutr Soc.* 50, 285-294.
- Naveed, A., Acamovic, T., Bedford, M.R.. 1998. Effect of enzyme supplementation of UK-known *Lupinus albus* on growth performance in broiler chickens. *Br. Poult. Sci.* 39, 36-37.
- Neto, R.M., Ceccantini, M.L., Fernandes, J.I. 2012. Productive Performance, Intestinal Morphology and Carcass Yield of Broilers Fed Conventional and Alternative Diets Containing Commercial Enzymatic Complex. *Int J Poult Sci.* 11, 505-516.
- Nir, I., Nitsan, Z.; Mahagna, M., 1993. Comparative growth and development of the digestive organs and of some enzymes in broiler and egg type chicks after hatching. *Br Poult Sci.*, 34, 523-532.
- Sabino, H.F.N; Sakomura, N.K.; Neme, R.E., Freitas, E, R., 2004. Níveis proteicos na ração de frangos de corte na fase de crescimento. *Pesq. Agropec. Bras.* 39, 407-412.
- Strada, E.S.O., Abreu, R.D., Oliveira, G.J.C., Costa, M.C.M.M., Carvalho, A.S. Franca, L., Clarton, J.L.M. 2005. Enzymes in the broiler diets. *Rev. Bras. Zoot.* 34, 2369-2375.
- Simbaya, J., Slominski, B. A., Guenter, W., Morgan, A., Campbell, L. D., 1996. The effects of protease and carbohydrase supplementation on the nutritive value of canola meal for poultry: In vitro and in vivo studies. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 61, 219-234.
- Sibbald, I.R.; Wolynetz, S., 1986. Effects of dietary lysine and feed intake on energy utilization and tissue synthesis by broiler chicks. *Poult Sci.* 65, 98- 105.
- Souza, R.M., Bertechini, A.G., Souza, R.V., Rodrigues, P.B., Carrera, J.C., Brito, J.A.G., 2008. Efeitos da suplementação enzimática e da forma física da ração sobre o desempenho e as características de carcaça de frangos de corte. *Ciênc. Agrotec.*, 32, 584-590.
- Summers, J.D., Spratt, D., Atkinson, J.L., 1992. Broiler weight gain and carcass composition when fed diets varying in amino acid balance, dietary energy and protein level. *Poult. Sci.*, 71: 263-273.
- Wang, J. J., Garlich, J. D., Shih, J. C. H., 2006. 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.
- Zanella, I., Sakomura, N.K., Silversides, F.G., Figueiredo, A., Pack, M., 1999. Effect of enzyme supplementation of broiler diets Based on corn na soybeans. *Poult Sci.* 78, 561-568.