

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**PROTEASE E FARINHA DE PENAS NA ALIMENTAÇÃO DE FRANGOS DE
CORTE**

CHRISTIANE FERNANDA DE QUEIROZ MATIAS

Belo Horizonte

2016

CHRISTIANE FERNANDA DE QUEIROZ MATIAS

**PROTEASE E FARINHA DE PENA NA ALIMENTAÇÃO DE FRANGOS DE
CORTE**

Tese apresentada à Escola de Veterinária da
Universidade Federal de Minas Gerais como
requisito parcial para a obtenção do Grau de
Doutora em Zootecnia

Área de concentração: Nutrição Animal

Orientador: Prof. Dr. Nelson Carneiro Baião

Belo Horizonte

2016

M433p Matias, Christiane Fernanda de Queiroz, 1985 -
Protease e farinha de penas na alimentação de frangos de corte/ Christiane Fernanda de
Queiroz Matias. -2016.

131 f.:il.

Orientador: Nelson Carneiro Baião.

Tese (Doutorado) apresentado à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas
Gerais, como requisito para obtenção do grau de Doutora em Zootecnia.

Área de concentração: Nutrição Animal.

Bibliografia: f.43 a 56

1. Frango de corte – Teses – 2. Alimentação e rações - Teses – 3. Nutrição animal – Teses –
4. Enzimas proteolíticas - Teses - I. Baião, Nelson Carneiro - II. Universidade Federal de Minas
Gerais, Escola de Veterinária – III. Título.

CDD – 636 085

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569

Biblioteca da Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Escola de Veterinária

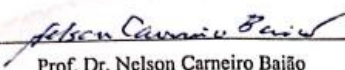
FOLHA DE APROVAÇÃO

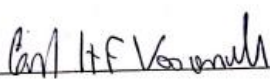
Nome aluno: Christiane Fernanda de Queiroz Matias

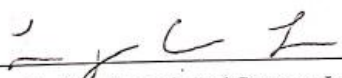
Título: **Protease e farinha de penas na alimentação de frangos de corte**

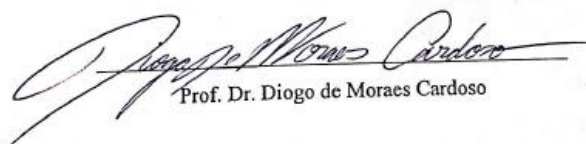
TESE submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia como requisito para obtenção do grau de Doutor em Zootecnia, área de concentração: Nutrição Animal.


Aprovada em 27/04/2016 pela Comissão Examinadora composta pelos seguintes membros:


Prof. Dr. Nelson Carneiro Baião
(Orientador)


Prof. Dr. Carlos Henrique de Figueiredo Vasconcelos


Prof. Dr. Leonardo José Camargos Lara


Prof. Dr. Diogo de Moraes Cardoso


Dra. Mariana Andre Pompeu

DEDICATÓRIA ao meu pai! A toda a minha família principalmente minha mãe, tia Jussara e meu irmão Pira. Ao orientador Nelson Baião e ao professor Leonardo Lara. Ao Rafael e aos grandes amigos da Veterinária.

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai pelo exemplo pessoal e dedicação aos filhos.

À tia Jussara pelos conselhos, constante apoio e indispensáveis ajudas na execução do trabalho.

À minha mãe pelo incentivo aos estudos.

Ao meu irmão pelo apoio.

Ao Rafael pela paciência, companheirismo e pela enorme ajuda ao longo de todo o projeto.

Ao professor Nelson Baião pela orientação, ensinamentos e amizade durante todo esse tempo

Ao professor Leonardo Lara pelos conselhos e apoio.

À Paulinha e ao Diego pela paciência e auxílio com as análises estatísticas.

À Júlia pela co-orientação e por contribuir com conselhos e ricas sugestões ao trabalho.

Ao Tiago e Marcela pelo apoio e auxílio ao longo do período experimental.

Aos amigos do grupo da avicultura pela indispensável colaboração.

Ao José Emilio pela preocupação e disponibilidade para ajudar durante o projeto.

Ao professor Pizauro da Universidade Federal de Jaboticabal

À NOVUS, especialmente ao Jhuan.

À Granja Brasília, Pif Paf, Cogran e Fatec pelos incentivos à pesquisa

À Escola de Veterinária e a Universidade Federal de Minas Gerais.

SUMÁRIO

RESUMO..... 16

ABSTRACT..... 18

CAPÍTULO I

1.1 Introdução Geral..... 20

CAPÍTULO II

2 **REVISÃO DE LITERATURA..... 23**

2.1 Processamento das farinhas de origem animal..... 23

2.1.1 Processamento de produção da farinha de penas..... 25

2.1.1.1 Caracterização das penas de frango..... 25

2.1.1.2 Métodos de hidrólise da farinha de penas..... 25

2.2 Produtos de origem animal provenientes do abate de aves..... 29

2.3 Controle de qualidade para farinha de penas..... 30

2.3.1 Pontos importantes que influenciam a qualidade..... 30

2.4 Uso de farinha de penas sobre o desempenho e rendimento de carcaça em frangos de corte..... 32

2.5 Fisiologia da digestão de proteínas nas aves 34

2.6 Utilização das enzimas 35

2.7 Proteases..... 36

2.7.1 Exopeptidases..... 36

2.7.2 Endopeptidases..... 37

2.7.3 Queratinases..... 37

2.7.3.1 Produção de queratinases..... 38

2.7.3.2 Mecanismo de ação das queratinases microbianas 39

2.7.3.3 Aplicação das queratinases..... 39

2.7.3.4 Efeito da utilização de queratinases 40

2.8 Objetivos..... 42

2.8.1 Objetivos gerais..... 42

2.8.2 Objetivos específicos..... 42

2.9 Referências bibliográficas..... 43

CAPÍTULO III – Experimento I

	EFEITO DO USO DE PROTEASE EM DIETAS COM FARINHA DE PENAS PARA FRANGOS DE CORTE SOBRE O DESEMPENHO, METABOLIZABILIDADE, RENDIMENTO DE CARÇAÇA E ANÁLISE ENZIMÁTICA	57
	RESUMO	57
	INTRODUÇÃO	58
3.1	Material e métodos.....	59
3.1.1	Condições experimentais.....	59
3.1.2	Tratamentos.....	62
3.1.3	Delineamento experimental	63
3.1.4	Metabolizabilidade dos nutrientes.....	63
3.1.5	Desempenho.....	64
3.1.6	Rendimento de carcaça e cortes	64
3.1.7	Análises enzimáticas.....	65
3.1.8	Análises estatísticas.....	67
3.2	Resultados e discussão.....	67
3.2.1	Metabolizabilidade fase inicial (coleta: nove a 12 dias de idade)	67
3.2.2	Metabolizabilidade fase crescimento (coleta: 23 a 26 dias de idade).....	69
3.2.3	Desempenho – fase inicial (um a 18 dias de idade)	70
3.2.4	Desempenho – período total (um a 35 dias de idade).....	71
3.2.5	Rendimento de carcaça.....	72
3.2.6	Análises enzimáticas.....	73
3.3	Conclusões.....	75
3.4	Referências bibliográficas.....	76

CAPITULO IV – Experimento II

	EFEITO DO USO DE PROTEASE EM DIETAS SEM FARINHA DE PENAS PARA FRANGOS DE CORTE SOBRE O DESEMPENHO, METABOLIZABILIDADE, RENDIMENTO DE CARÇAÇA E ANÁLISE ENZIMÁTICA.....	80
	RESUMO	80
4.1	INTRODUÇÃO	81
4.1.1	Material e métodos.....	82
4.1.2	Condições experimentais.....	82
4.1.3	Tratamentos.....	85
4.1.4	Delineamento experimental	85
4.1.5	Metabolizabilidade dos nutrientes.....	86
4.1.6	Desempenho.....	87
4.1.7	Rendimento de carcaça e cortes	87
4.1.8	Análises enzimáticas.....	88
4.2	Análises estatísticas.....	89
4.2.1	Resultados e discussão.....	90
4.2.2	Metabolizabilidade.....	90
4.2.3	Desempenho.....	92
4.2.4	Rendimento de carcaça	94
4.3	Análises enzimáticas.....	95
4.4	Conclusões.....	97
	Referências bibliográficas.....	97

CAPITULO V – Experimento III

	EFEITO DA INCLUSÃO DA PROTEASE EM DIETAS COM E SEM FARINHA DE PENAS PARA FRANGOS DE CORTE SOBRE O DESEMPENHO, METABOLIZABILIDADE, RENDIMENTO DE CARÇAÇA E ANÁLISE ENZIMÁTICA.....	101
	RESUMO	101

	INTRODUÇÃO.....	102
5.1	Material e métodos.....	103
5.1.1	Condições experimentais.....	103
5.1.2	Tratamentos.....	106
5.1.3	Delineamento experimental	106
5.1.4	Metabolizabilidade dos nutrientes.....	107
5.1.5	Desempenho.....	108
5.1.6	Rendimento de carcaça e cortes.....	108
5.1.7	Análises enzimáticas.....	109
5.1.8	Análises estatísticas.....	110
5.2	Resultados e discussão.....	111
5.2.1	Metabolizabilidade	111
5.2.3	Desempenho.....	113
5.2.4	Rendimento de carcaça	115
5.2.5	Análise enzimática.....	116
5.3	Conclusões.....	117
5.4	Referências bibliográficas.....	118

CAPITULO VI – Experimento IV

	EFEITO DA VALORIZAÇÃO DA PROTEASE EM DIETAS COM FARINHA DE PENAS PARA FRANGOS DE CORTE SOBRE O DESEMPENHO E RENDIMENTO DE CARCAÇA	120
	RESUMO.....	120
	INTRODUÇÃO.....	121
6.1	Material e métodos.....	121
6.1.1	Condições experimentais.....	121
6.1.2	Tratamentos.....	124
6.1.3	Delineamento experimental	125
6.1.4	Desempenho.....	125
6.1.5	Rendimento de carcaça e cortes	125
6.2	Análises estatísticas.....	126
6.2.1	Resultados e discussão.....	126

6.2.2	Desempenho.....	126
6.3	Rendimento de carcaça.....	127
6.4	Conclusões.....	128
6.5	Referências bibliográficas.....	128

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO III

Tabela 1 —	Composição das dietas na fase inicial (um a 18 dias).....	60
Tabela 2 —	Composição das dietas na fase de crescimento (19 a 35 dias).....	61
Tabela 3 —	Matriz nutricional da enzima protease, utilizada para a valorização na formulação das rações na fase inicial e de crescimento.....	62
Tabela 4 —	Efeito da protease e da valorização nas dietas para frangos de corte, na fase inicial, sobre o coeficiente de metabolizabilidade da matéria seca (CMMS), coeficiente de metabolizabilidade da proteína bruta (CMPB) e coeficiente de metabolizabilidade do extrato etéreo (CMEE).....	67
Tabela 5 —	Efeito da protease e da valorização nas dietas para frangos de corte, na fase de crescimento, sobre o coeficiente de metabolizabilidade da matéria seca (CMMS), coeficiente de metabolizabilidade da proteína bruta (CMPB) e coeficiente de metabolizabilidade do extrato etéreo (CMEE).....	69
Tabela 6 —	Efeito da protease e da valorização sobre o consumo de ração (CR), ganho de peso (GP) e conversão alimentar (CA) em frangos de corte de um ao 18º dia de idade.....	70
Tabela 7 —	Efeito da protease e da valorização sobre o consumo de ração (CR), ganho de peso (GP), conversão alimentar (CA) e fator de produção (FP) em frangos de corte de um ao 35º dia de idade.....	71
Tabela 8 —	Efeito da protease e da valorização sobre o rendimento de carcaça de frangos de corte ao 38º dia de idade.....	73

Tabela 9 —	Concentração de proteínas totais (mg/ml) e atividade enzimática de tripsina e quimotripsina pancreática (U/mg de proteína) em frangos de corte ao 14º dia de idade.....	74
Tabela 10 —	Concentração de proteínas totais (mg/ml) e atividade enzimática de tripsina e quimotripsina pancreática (U/mg de proteína) em frangos de corte ao 35º dia de idade.....	75

CAPÍTULO IV

Tabela 1 —	Composição das dietas na fase inicial (um a 18 dias)	83
Tabela 2 —	Composição das dietas na fase de crescimento (19 a 35 dias)	84
Tabela 3 —	Matriz nutricional da enzima protease, utilizada para a valorização na formulação na fase inicial e de crescimento.....	85
Tabela 4 —	Efeito da protease e da valorização nas dietas para frangos de corte, na fase inicial e de crescimento, sobre o coeficiente de metabolizabilidade da matéria seca (CMMS), coeficiente de metabolizabilidade da proteína bruta (CMPB) e coeficiente de metabolizabilidade do extrato etéreo (CMEE).....	90
Tabela 5 —	Desdobramento da interação no coeficiente de metabolizabilidade da proteína bruta (CMPB), em percentual, das rações, de acordo com os tratamentos na fase inicial e de crescimento.....	91
Tabela 6 —	Efeito da protease e da valorização sobre o consumo de ração (CR), ganho de peso (GP) e conversão alimentar (CA) em frangos de corte de um aos 18 e de um ao 35º dia de idade.....	92
Tabela 7 —	Efeito da protease e da valorização sobre o rendimento de carcaça de frangos de corte ao 38º dia de idade.....	94
Tabela 8 —	Concentração de proteínas totais (mg/ml) e atividade enzimática de tripsina e quimotripsina pancreática (U/mg de proteína) em frangos de corte ao 14º e 35º dia de idade.....	95

CAPÍTULO V

Tabela 1 —	Composição das dietas na fase inicial (um a 18 dias)	104
------------	--	-----

Tabela 2 —	Composição das dietas na fase de crescimento (19 a 35 dias)	105
Tabela 3 —	Matriz nutricional da enzima protease, utilizada para a valorização na formulação na fase inicial e de crescimento.....	106
Tabela 4 —	Efeito do uso de farinha de pena e da valorização nas dietas com inclusão de enzima protease, para frangos de corte, na fase inicial e de crescimento, sobre o coeficiente de metabolizabilidade da matéria seca (CMMS), coeficiente de metabolizabilidade da proteína bruta (CMPB) e coeficiente de metabolizabilidade do extrato etéreo (CMEE).....	111
Tabela 5 —	Efeito do uso de farinha de pena e da valorização nas dietas com inclusão de enzima protease, sobre o consumo de ração (CR), ganho de peso (GP) e conversão alimentar (CA) em frangos de corte de um ao 18º e de um ao 35º dia de idade.....	113
Tabela 6 —	Efeito do uso de farinha de pena e da valorização nas dietas com inclusão de enzima protease, sobre o rendimento de carcaça de frangos de corte ao 38º dia de idade.....	115
Tabela 7 —	Concentração de proteínas totais (mg/ml) e atividade enzimática de tripsina e quimotripsina pancreática (U/mg de proteína) em frangos de corte ao 14º e 35º dia de idade.....	116

CAPÍTULO VI

Tabela 1 —	Composição das dietas na fase inicial (um a 18 dias)	122
Tabela 2 —	Composição das dietas na fase de crescimento (19 a 35 dias)	123
Tabela 3 —	Matriz nutricional da enzima protease, utilizada para a valorização na formulação na fase inicial e de crescimento.....	124
Tabela 4 —	Efeito da protease e das diferentes formas de valorização sobre o consumo de ração (CR), ganho de peso (GP) e conversão alimentar (CA) em frangos de corte de um ao 18º e de um ao 35º dia de idade...	126
Tabela 5 —	Efeito da protease e das diferentes formas de valorização sobre o rendimento de carcaça de frangos de corte ao 38º dia de idade.....	127

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

Fig. 1	Esquema geral do processamento de resíduos de abatedouro de aves para fabricação de farinhas de vísceras, de penas ou de sangue.....	23
Fig. 2	Estrutura das penas.....	25
Fig. 1	Estrutura tridimensional da α -queratina ou β -queratina.....	26
Quadro 1	Especificações de qualidade da farinha de penas hidrolisada e farinha de vísceras.....	30
Quadro 2	Condições para a produção de queratinases a partir de diferentes micro-organismos da espécie <i>Bacillus</i>	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BWG	Body weight gain
CMEE	Coeficiente de metabolizabilidade do extrato etéreo
CMMS	Coeficiente de metabolizabilidade da matéria seca
CMPB	Coeficiente de metabolizabilidade da proteína bruta
CR	Consumo de ração
FCR	Feed conversion ratio
FI	Feed intake
GP	Ganho de peso
MCCP	Metabolization coefficient of crude protein
MCDM	Metabolization coefficient of dry matter
MCEE	Metabolization coefficient of ether extract
PNAS	Polissacarídeos não amiláceos solúveis

RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito da adição da enzima protease (produzida pelo *Bacillus licheniformis* cepa PWD-1) e o efeito da valorização da matriz nutricional desta enzima em dietas para frangos de corte contendo ou não farinha de penas (FP) sobre a metabolizabilidade dos nutrientes, desempenho, rendimento de carcaça e cortes e produção enzimática. Para tal, foram realizados quatro experimentos. No **experimento I**, todas as rações continham FP. Na fase inicial, foi utilizado DIC em esquema fatorial 2x2 (com e sem adição de protease X com e sem valorização da matriz nutricional da enzima), e na fase de crescimento, foi utilizado DIC em arranjo simples. Observou-se que, no 14º dia de idade, as aves que consumiram ração com enzima, independente da valorização, apresentaram menores valores ($P \leq 0,05$) de concentração de proteínas totais, tripsina e quimiotripsina pancreáticas. Na fase de crescimento, o melhor resultado para GP ($P \leq 0,05$) foi obtido com o uso da enzima sem valorização. No **experimento II**, nenhuma das rações continham FP e foi utilizado DIC em esquema fatorial 2x2 (com e sem adição de protease X com e sem valorização da matriz nutricional da enzima) na fase inicial e de crescimento. Os melhores resultados para CA na fase inicial ($P \leq 0,05$) foram obtidos com os frangos que receberam dietas sem valorização, independente da adição de enzimas. O GP nas duas fases foi melhor ($P \leq 0,05$) para as aves que receberam dietas sem valorização, independente da adição de enzima. As aves que consumiram ração com enzima, independente da valorização, apresentaram no 14º dia de idade das aves, menores valores ($P \leq 0,05$) de concentração de proteínas totais e quimiotripsina pancreáticas; e no 35º dia de idade, menores valores ($P \leq 0,05$) de concentração de proteínas totais e tripsina pancreáticas. No **experimento III**, todas as rações continham enzima e foi utilizado DIC em esquema fatorial 2x2 (com e sem adição de FP X com e sem valorização da matriz nutricional da enzima). Observou-se, na fase inicial, maior CMMS e CMPB ($P \leq 0,05$) para as aves que, independente da inclusão de FP, consumiram ração com valorização. O GP foi maior ($P \leq 0,05$) em aves que receberam dietas sem valorização. Os melhores resultados obtidos para CA, na fase inicial, ($P \leq 0,05$) foram com a inclusão de FP, independente da valorização. No **experimento IV**, todas as rações continham FP e o delineamento foi em esquema fatorial 2x2 (com e sem adição de protease X valorização de energia e proteína e somente valorização de proteína). Nenhuma das variáveis analisadas foi influenciada pelos tratamentos ($P > 0,05$). Como **conclusão geral**, em nenhum dos experimentos realizados, a viabilidade e o rendimento de carcaça e cortes foram influenciados ($P > 0,05$) pelos tratamentos. Os melhores resultados para CMPB e CMEE foram obtidos utilizando-se dietas

valorizadas. A adição de enzima sem valorização melhora o ganho de peso de frangos de corte. A valorização nutricional recomendada para a protease parece ser excessiva nas dietas comerciais para frangos de corte.

Palavras chave: desempenho, metabolizabilidade, atividade enzimática, protease, farinha de penas

ABSTRACT

The purpose of this research is to evaluate the effects of protease use (produced by *Bacillus licheniformis* strain PWD-1) and its nutritional contribution in broiler chicken feed containing or not poultry-feather meal (PFM) on metabolization coefficient of nutrients, performance, slaughter yield and enzymatic production. Four experiments were conducted in a completely randomized design, using four treatments with six replicates each. In **experiment I**, PFM was added to all diets. In the initial phase the design used was a 2x2 factorial arrangement (with or without protease inclusion X considering or not nutrient improvement value from the enzyme), while in the growth phase a completely randomized design was used. It was observed on the 14th day of age, the birds that consumed feed with enzyme, regardless of the nutritional improvement value, presented lower values ($P \leq 0.05$) of total protein concentration, pancreatic trypsin and chymotrypsin. In the growth phase, there was a higher body weight gain (BWG) for the treatment enzyme added in which nutritional contribution of the enzyme was not considered (added on top). In **experiment II**, poultry-feather meal was not added to any diets and its design was in a 2x2 factorial arrangement (with or without protease inclusion X considering or not nutrient improvement value from the enzyme) at initial and growth phases. Broilers fed diets without considering nutrient improvement values from enzyme ($P \leq 0,05$), in initial phase, presented better feed conversion (FC) ($P \leq 0,05$), in spite of enzyme addition. Body weight gain (BWG) at both phases was superior for birds fed diets without considering nutrient improvement values from enzyme ($P \leq 0,05$), regardless of enzyme inclusion. In **experiment III**, the protease was included in all diets and the design was in a 2x2 factorial arrangement (with or without PFM inclusion X considering or not nutrient improvement value from the enzyme). Diets formulated considering enzyme nutritional enhancement resulted in higher MCDM e MCCP ($P \leq 0,05$) throughout initial phase, whether or not PFM was added. Feed diets without PFM inclusion and feed diets with addition of enzyme on top resulted in higher BWG ($P \leq 0,05$). Throughout initial phase, best results of FC were observed in birds fed diets with PFM ($P \leq 0,05$), regardless of whether enzyme nutrient sparing effect were accounted or not. In **experiment IV**, the design used was a 2x2 factorial arrangement (with or without protease inclusion X two nutrients improvement value from the enzyme) and PFM were included in all diets. None of the variables were influenced by the treatments. As a **general conclusion**, in none of the experiments performed, the viability, carcass and cuts yields were not affected by any treatment in all experiments ($P \leq 0,05$). MCCP e MCEE best results were shown when diets were formulated considering enzyme nutritional contribution. Enzyme added on top, without

considering its nutritional value, improved BWG, with no effect on cuts yields. The recommended nutrient sparing effect of the protease appears to be excessive for commercial diets of broiler chickens.

Key words: performance, metabolizability, enzyme activity, protease, feather meal

CAPÍTULO I

1.1 Introdução geral

A produção de carne de frango no Brasil em 2015 atingiu recorde de 13,146 milhões de toneladas, sendo 3,58% acima da produção do ano de 2014, consolidando o Brasil como 2º maior produtor de carne de frango, superando a China (ABPA, 2016). Contudo, apesar das estatísticas favorecerem o PIB Nacional, é necessário considerar que a indústria avícola gera grande quantidade de resíduos que possuem elevado potencial poluente (Bellaver, 2005a). Em média, durante o processamento do frango de corte no abatedouro ocorre perda do produto em torno de 35% (Nunes, 2005).

As graxarias surgiram no início do século XX com a finalidade de promover o aproveitamento dos subprodutos gerados no abate de bovinos, suínos e aves. As graxarias podem ser independentes ou integradas aos abatedouros frigoríficos e a sua função básica é a manipulação de resíduos do abate e processamento de animais, para a produção de farinhas para rações animais (Ferroli et al., 2002; Barros, 2007).

Nos Estados Unidos e no Canadá 250 unidades de tratamento de resíduos de abatedouros processam 62 milhões de toneladas de matéria-prima diariamente. Na América Latina, as graxarias são distribuídas em 70 plantas no Brasil, 14 no México e 10 na Argentina, representando 93% da produção desta região. Sendo que 80% das instalações de processamento de subprodutos são integradas com os frigoríficos (Caparella, 2013).

Os subprodutos de origem animal são matérias-primas alternativas importantes no processo de produção de rações, uma vez que possuem alta disponibilidade no mercado e custo que viabiliza a inclusão (Bellaver et al., 2001c). Além, de apresentar perfil de aminoácidos adequado às necessidades das aves (Rostagno et al., 2005).

Os subprodutos de origem animal são amplamente utilizados nas dietas de aves, contudo, podem ocorrer variações em sua composição, sendo, fundamental a avaliação periódica destes subprodutos pela adoção de controle sistemático das matérias-primas a fim de gerar resultados que norteiem a tomada de decisões na formulação das rações (Sinhorini et al., 2009).

Pode-se estimar que o rendimento de peso da carcaça de frangos, a partir do peso vivo, é de aproximadamente 75%. Os miúdos (coração, fígado, moela) compõem cerca de 8% do peso da ave viva. Desta forma, aproximadamente 17% do peso do frango é representado pelos

resíduos não comestíveis. As penas representam 7% do peso total do frango de corte, sendo considerado um produto residual dos abatedouros (Martelli et al., 2006). Desta forma, no ano de 2015 foram produzidas cerca de 920.000 toneladas de penas, como efluente da produção da carne de frango. Assim, encontrar um destino para esse resíduo se tornou uma preocupação do setor avícola, uma vez que o acúmulo resulta em poluição ambiental e desperdício de proteínas. A comercialização dos subprodutos confere retorno financeiro significativo, auxiliando no equilíbrio da cadeia avícola (Olivo et al., 2006; Laboissière, 2008).

A produção de farinhas e gordura de aves no Brasil no ano de 2014 foi de 1.260.406,00 toneladas sendo observado ligeiro avanço, no período de 2010 a 2014. Deste total a participação da farinha de penas aumentou de 4,1%, para 4,6%. Tal fato parece estar mais relacionado com o aumento do registro desses produtos durante o período avaliado (ABRA, 2015).

O processo de produção de farinhas de origem animal é desafiador, principalmente devido à variação na composição das matérias-primas utilizadas (Aldrich et al., 2007). Alterações na composição das farinhas podem causar efeitos negativos no desempenho zootécnico das aves, uma vez que o uso de farinhas de baixa qualidade pode afetar diretamente a digestibilidade e o teor proteico das rações (Aldrich et al., 2007).

A utilização das penas como matéria-prima em rações para animais é uma alternativa interessante tanto do ponto de vista ambiental quanto econômico. O emprego de biotecnologia no processamento das penas oferece vantagens principalmente relacionadas à maior disponibilidade de aminoácidos essenciais. Assim, microrganismos queratinolíticos e queratinases microbianas vêm sendo explorados quanto à sua aplicação no bioprocessamento das penas. Observa-se enorme potencial a ser explorado relacionado à diversidade microbiana e as possíveis formas de aplicações das queratinases na cadeia alimentícia.

A utilização de enzimas exógenas (hidrólise enzimática) vem sendo empregada com o objetivo de reduzir os custos de produção, por se tratar de um processo capaz de aumentar a metabolizabilidade da proteína. A diminuição nos custos pode estar relacionada a melhoria na eficiência de utilização de alimentos tradicionais (Peixoto e Maier, 1993); e também por viabilizar o uso de matérias-primas alternativas (Guenter, 1997 apud Marquardt, 1997). Portanto, a inclusão de enzimas na alimentação de aves pode facilitar a utilização de alimentos alternativos, como por exemplo as farinhas de origem animal.

A suplementação de enzimas exógenas na ração pode ser usada com dois objetivos: ajudar o sistema enzimático endógeno (amilase, lipase, protease) ou suplementar enzimas que não estão presentes no sistema digestivo do animal (fitase, xilanase) (Cousins, 1999).

As enzimas podem disponibilizar maior quantidade dos nutrientes contidos na ração, com

o objetivo de melhorar ou manter o desempenho dos animais (Sartori et al., 2007). Além da liberação de nutrientes, outro benefício da utilização das enzimas exógenas seria a redução da síntese de enzimas endógenas. Permitindo assim, que o organismo disponibilize mais aminoácidos para síntese proteica. Em situações normais, cerca de 25% das necessidades diárias de nitrogênio podem ser destinadas para síntese de enzimas endógenas, com o uso da suplementação com enzimas exógenas, pode ocorrer redução de 40% da secreção duodenal de tripsina, quimotripsina, lipase e α -amilase (Garcia, 1997).

Nir (1998) verificou diminuição da síntese endógena das enzimas pancreáticas, quando pintos de corte, com duas semanas de idade, receberam dietas suplementadas com enzimas. Zanella et al. (1999) também verificaram que a suplementação de amilase e protease na dieta à base de milho e soja para frangos de corte reduziu a síntese destas mesmas enzimas endógenas em 23,4 e 35,5% respectivamente. Admite-se, que a secreção de enzimas pancreáticas seja afetada pela concentração de enzimas no intestino delgado e/ou substratos ou produtos de hidrólise.

Enzimas digestivas exógenas atuam de forma semelhante as endógenas pois possuem sítio ativo com aptidão para atuar sobre substrato específico, hidrolisando-o. Esta ação catalítica é específica e determinada pelas estruturas primárias, secundárias, terciárias e quaternárias das enzimas. Qualquer modificação na estabilidade das enzimas provoca alteração na sua estrutura e pode provocar a perda de sua capacidade catalítica (Campestrini et al., 2005). A ação catalítica das enzimas pode ser influenciada por alguns fatores, tais como: temperatura, pH, umidade e presença de coenzimas e inibidores (Lehninger et al., 2000).

De acordo com Rotter (1990), as enzimas adicionadas ao alimento são ativadas pela associação dos seguintes fatores: pH dos fluidos digestivos, temperatura do organismo e presença de substrato.

Sendo assim, o êxito na utilização das enzimas exógenas depende do conhecimento sobre os possíveis substratos a serem hidrolisados e das condições nas quais as reações serão executadas (Lima et al., 2002).

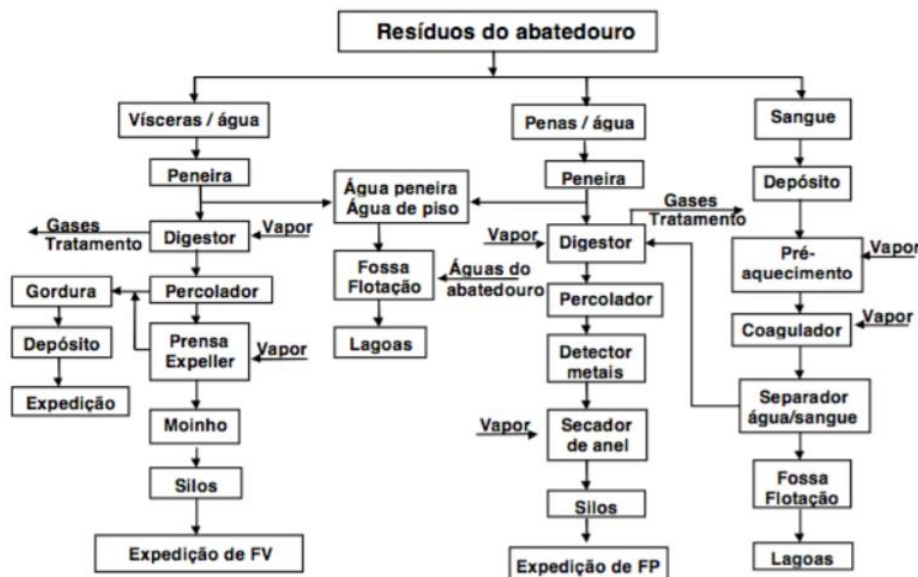
Além da possibilidade de uso de enzimas exógenas para melhorar o aproveitamento das farinhas é fundamental manter a qualidade antes, durante e após o processamento dos resíduos utilizados para a fabricação das farinhas de origem animal (Bellaver, 2001a). A qualidade das matérias-primas é o primeiro e o mais importante item a observar durante a produção de rações. Outro ponto importante é a adequação a legislação vigente e o uso de equipamentos adequados durante o processo de produção no intuito de manter a qualidade dos produtos.

CAPÍTULO II

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Processamento das farinhas de origem animal

Em geral, o processo de produção de farinhas de origem animal consiste em retirar o excesso de água, triturar os resíduos não comestíveis que possuam mais de cinco centímetros, realizar a cocção em digestores, drenar, prensar ou centrifugar a gordura e por fim moer o resíduo sólido na forma de farinha (Figura 1). Segundo a Instrução Normativa nº34 de 28 de maio de 2008, após a trituração os resíduos de animais devem ser aquecidos até atingirem uma temperatura não inferior a 133°C, durante pelo menos 20 minutos, sem interrupção, a uma pressão (absoluta) não inferior a três bar, produzida por vapor saturado. Sendo que, a esterilização pode ser efetuada antes, durante ou depois da fase de cocção, e a água utilizada para a fabricação de vapor injetado deve ser potável (Brasil, 2008).



Fonte: Bellaver (2001b)

Figura 1. Esquema geral do processamento de resíduos de abatedouro de aves para fabricação de farinhas de vísceras, de penas ou de sangue.

O digestor é a peça mais importante da fábrica de farinhas e foi projetado de modo a

proporcionar uma transferência de calor para o produto que está no seu interior. Isso é obtido por meio do vapor fornecido por uma caldeira, que preenche internamente a camisa, o eixo e as pás do digestor, mantendo o produto no seu interior sob pressão. A troca de temperatura ocasionada pelo choque térmico do produto frio em contato com o equipamento quente provoca a condensação do vapor. O vapor é eliminado por duas válvulas conhecidas nas graxarias como pescador e saída de condensador (Ferrolí et al., 2002).

Os digestores em batelada são os mais utilizados e possuem paredes duplas, com eixo giratório central e pás acopladas, o aquecimento é feito por vapor e são providos de válvulas de segurança, linhas de admissão, equipamentos de purga do vapor, redutor de velocidade e chaminé provida de condensador barométrico. Neste tipo de digestor a pressão de dentro da camisa deve ser o dobro da pressão interna que incide diretamente sobre o produto. Os digestores possuem secadores para fazer o controle da umidade e moinhos para padronizar a granulometria das farinhas (Bellaver e Zanotto 2004).

Os digestores em batelada têm sido substituídos pelos sistemas contínuos. Basicamente, os dois processos se baseiam nas operações de moagem, digestão e prensagem. Dentre as principais vantagens do processo contínuo destaca-se a menor exposição da matéria-prima ao calor, o menor espaço físico de instalação e menor gasto de energia e água. Outro ponto positivo da utilização de digestores contínuos é a facilidade de automatização dos equipamentos, que proporciona um controle mais eficiente da relação temperatura, tempo de residência e carga do digestor (The BSE inquiry, 2000). Porém, possuem menor potencial de digestibilidade do produto final quando comparado com os processamentos de batelada. No processo contínuo, a matéria-prima é triturada antes de ser direcionada para a cocção.

Usualmente na cocção utiliza-se digestor cilíndrico horizontal encamisado, equipado com dispositivos que realizam a progressão contínua da matéria-prima (USEPA, 1995). O digestor é aquecido com vapor indireto, a temperaturas entre 121 e 137°C (National Renderers, 2006). Após essa etapa o material é descarregado em drenos que tem a mesma função do percolador (USEPA, 1995). A fase sólida é então prensada para a retirada da gordura remanescente e o restante do processo é semelhante ao de batelada (Prokop, 1992).

2.1.1. Processamento da farinha de penas

2.1.1.1 Caracterização das penas de frango

As penas se formam por meio da diferenciação das células epiteliais especializadas denominadas queratinócitos. Durante o processo de diferenciação, o tecido epitelial é convertido em material inerte, fibroso, resistente e insolúvel em água, que atua como revestimento de proteção externa (Plácido, 2007). De acordo com UNESP (2013), as penas são estruturas de queratina, originada a partir de papilas vivas da derme (origem mesodérmica). As penas das aves possuem as seguintes estruturas (Figura 2):

- cálamo: é a parte do tubo transparente que fica mergulhado dentro da pele;
- raque: é a continuação do cálamo que fica para fora da pele “eixo da pena”;
- barbas: ramificações que saem da raque dos dois lados formando o vexilo;
- bárbulas: ramificação da barba.



Figura 2 - Estrutura das penas

Fonte: Portal Educação UOL (2013)

As penas são constituídas de aproximadamente 1% de gordura, 9% de água e 90% de proteínas estruturais. Apesar das penas conterem alto teor de proteína bruta, 85% a 90% dessa proteína é a queratina. A queratina é uma proteína fibrosa insolúvel em água que desempenha um papel basicamente estrutural e é muito resistente às enzimas proteolíticas presentes no sistema digestivo das aves.

A principal diferença entre a queratina e outras proteínas fibrosas, tais como o colágeno, elastina e proteínas miofibrilares, é a presença de grande quantidade de resíduos de cisteína (Schrooyen et al., 2000)

A baixa digestibilidade e insolubilidade das penas têm sido atribuídas às pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas dentro da molécula de queratina e pontes dissulfeto, que contribuem para manter a maior estabilidade da proteína, quando atacada por enzimas (Schrooyen et al., 2001). Quanto mais rígidas as ligações que mantêm a tridimensionalidade das proteínas, mais difícil é a ação das enzimas proteolíticas e mais baixa é sua digestibilidade (Penz Jr., 1994).

As queratinas podem ser consideradas como flexíveis ou resistentes. A camada mais externa da epiderme é composta por queratinas flexíveis, que apresenta reduzida quantidade de ligações dissulfeto, enquanto as penas, por exemplo, são formadas pelas queratinas resistentes, que possuem maior quantidade de ligações dissulfeto (Schrooyen et al., 2000; Moore et al., 2006).

As queratinas também podem ser classificadas pelos diferentes padrões na difração do raio-X: α -queratina ou β -queratina. Tanto as queratinas flexíveis e as resistentes dos mamíferos são classificadas como α -queratinas, enquanto as queratinas resistentes presentes em répteis e aves são β -queratinas (Schrooyen et al., 2001). A estrutura tridimensional da α -queratina ou β -queratina estão descritas na Figura 3.

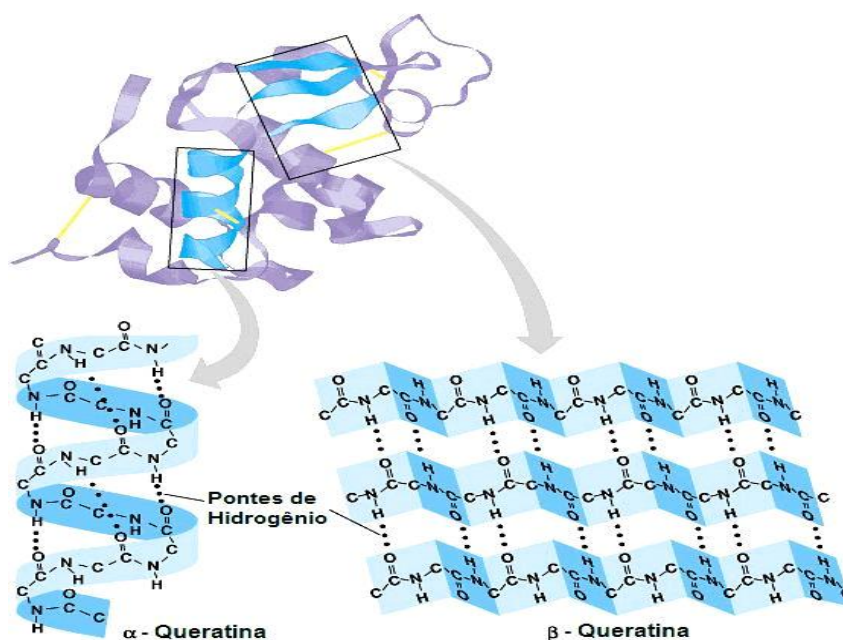


Figura 3 – Estrutura tridimensional da α -queratina ou β -queratina

Fonte: Marzocco e Torres (1999)

Nas α -queratinas ocorre a formação de cabos helicoidais compostos pela associação lateral de duas a três cadeias em α -hélice, que, reunidos, formam fibrilas e fibras. Nestas proteínas, é frequente a formação de pontes de dissulfeto entre resíduos de cisteína, conferindo

grande resistência às fibras. Nas β -queratinas, as fibras são formadas por empilhamento de folhas β -pregueadas (Marzzoco e Torres, 1999).

As penas das aves são comumente direcionadas para a alimentação de monogástricos, porém, devido à estrutura complexa e rígida da queratina a aplicação de métodos de hidrólise são indispensáveis e consistem basicamente em quebrar a estrutura resistente da queratina em aminoácidos e pequenos peptídeos.

2.1.1.2 Métodos de hidrólise da farinha de penas

Existem dois métodos de hidrólise parcial: ácida ou alcalina, sendo que ambas necessitam de temperaturas elevadas e alta pressão de vapor, associado com a adição de ácidos ou bases, tais como o ácido clorídrico, ou hidróxido de sódio (Butolo, 2002).

A hidrólise física é realizada pelos digestores que realizam a cocção das penas por meio de pressão e tempo, sendo que, quanto mais intenso for o processo, maior será a hidrólise e melhor a digestibilidade da farinha (Bellaver, 2009).

Contudo, o processamento no qual as penas são submetidas deve ser adequado para que se obtenha uma farinha de boa qualidade (Holanda, 2009). Vale salientar, que devido à utilização de calor e agitação mecânica, durante o processamento a qualidade da proteína pode ser afetada, ocorrendo a destruição dos aminoácidos (Aldrich et al., 2007).

O processamento excessivo da farinha gera um produto com baixo teor proteico, devido às perdas dos aminoácidos sulfurados, a cistina, por exemplo, é transformada em lantionina (Baker et al., 1981; Papadopoulos et al., 1986). Por outro lado, o processamento insuficiente ocasionará uma hidrólise incompleta das penas, que não serão digeridas pelos animais e o excesso de umidade provocará o aumento de fungos e bactérias, acidificação e rancificação do material e, conseqüentemente, da farinha (Albino et al., 1992).

Para produzir farinhas de penas com altos níveis de proteína bruta, concentração e melhores coeficientes de digestibilidade dos aminoácidos têm sido estudados diferentes métodos de processamento para esse subproduto. Foi observado que se deve buscar uma correlação ideal entre temperatura e pressão durante o processamento, levando-se em conta a matéria-prima e o tipo de equipamento (Scapim et al., 2003; Latshaw, 1990).

De maneira geral, as graxarias das empresas nacionais utilizam o mesmo tipo de equipamento, digestores cilíndricos com camisa de vapor, montados horizontalmente, providos de válvula de segurança e purgador, recebendo injeção direta de vapor sob pressão que varia de 3,9 a 4,4 bar e o tempo de cozimento das penas variando de 30 a 45 minutos (Holanda, 2009).

Segundo Latshaw (1990), as farinhas de penas com alto teor de digestibilidade da proteína em pepsina apresentam baixo valor nutritivo porque o aumento do tempo e/ou da pressão de processamento pode, simultaneamente, aumentar a digestibilidade da proteína em pepsina e afetar negativamente a digestibilidade de alguns aminoácidos.

O tratamento térmico altera a estrutura das proteínas e favorece ligações entre as proteínas, gorduras e carboidratos presentes nas farinhas. Estas ligações químicas podem comprometer a disponibilidade dos aminoácidos (Naber et al., 1961; Papadopoulos et al., 1986).

Contudo, Gregory et al. (1956) contestaram a influência do processamento térmico sobre os aminoácidos presentes na farinha de pena por observarem que os aminoácidos eram relativamente estáveis durante o processamento da farinha, com exceção da arginina, fenilalanina, alanina, isoleucina e cistina, sendo a cistina o aminoácido que apresentou maior perda. Porém, estes autores não estudaram se a disponibilidade destes aminoácidos foi afetada.

Naber et al. (1961) avaliaram a disponibilidade dos aminoácidos da farinha de penas processadas sob pressão e afirmaram que os métodos de processamento causam variações significativas no valor nutritivo das farinhas de penas. O cozimento, embora aumente a disponibilidade de alguns aminoácidos, destrói outros, particularmente os instáveis, sob o efeito do calor.

Portanto, o tempo de processamento é o parâmetro que mais influencia a disponibilidade dos aminoácidos da farinha de penas. O tempo de cocção e a adição de compostos químicos para hidrólise das penas podem causar efeito negativo na digestibilidade dos aminoácidos. Assim, o nível de inclusão da farinha de penas nas rações deve ter como base a digestibilidade individual dos aminoácidos (Papadopoulos et al., 1986).

A biodegradação das penas é um método alternativo à hidrólise hidrotérmica. Algumas cepas de bactérias podem produzir proteases que têm atividade queratinolítica e são capazes de degradar a queratina presente na pena das aves. Estas enzimas ajudam a bactéria a obter o carbono, o enxofre e energia para o seu crescimento e manutenção, a partir da degradação da queratina (Dalev, 1990). Diversas queratinases podem ser produzidas por diferentes microrganismos, tais como *Bacillus sp.*, *Bacillus licheniformis* (Ramnani et al., 2005), *Burkholderia*, *Chryseobacterium*, *Pseudomonas*, *Micobacterium sp.*, *Chryseobacterium sp.* e *Streptomyces sp* (Tamilmani et al., 2008). Uma vantagem importante do método de tratamento enzimático é a biodegradabilidade das enzimas em proteínas. Assim, ao contrário de outros métodos de tratamento, não há acumulação de produtos químicos no final do processo de degradação. Embora o tratamento enzimático seja uma tecnologia promissora, possui algumas

limitações e desvantagens. Atualmente, a principal desvantagem da utilização de proteases é o elevado custo da produção de enzimas.

A associação do processamento térmico com etapa química enzimática pode contribuir significativamente com a melhoria da digestibilidade das farinhas de penas, mas para isso experimentos tecnológicos nas fábricas de farinhas precisam ser executados e analisados com maior cautela (Bellaver, 2009).

2.2. Produtos de origem animal provenientes do abate de aves

a) Farinha de penas e vísceras

É o produto resultante da cocção, sob pressão, de penas limpas e não decompostas, bem como vísceras de aves abatidas. É permitida a participação de carcaças, desde que a sua inclusão não altere significativamente a composição estipulada (Compêndio, 2005).

b) Farinha de penas hidrolisadas

É o produto resultante da cocção, sob pressão, de penas limpas e não decompostas, obtidas no abate de aves, sendo permitida a participação de sangue desde que a sua inclusão não altere significativamente a sua composição média, uma vez que a inclusão caracterizaria outro tipo de farinha, farinha de penas e sangue. Este produto contém um alto teor de proteína bruta, variando entre 78 e 92%, sendo sua coloração de caramelo a marrom (Scapin et al., 2003; Compêndio, 2005).

c) Farinha de vísceras

É o produto resultante da cocção, prensagem e moagem de vísceras de aves, sendo permitida a inclusão de cabeças e pés. Não deve conter penas, exceto aquelas que podem ocorrer não intencionalmente, e nem resíduos de incubatório e de outras matérias estranhas à sua composição. Não deve apresentar contaminação com casca de ovo (Compêndio, 2005).

Na farinha de vísceras permite-se a inclusão de todas as partes resultantes do abate, no entanto, a inclusão de penas caracteriza adulteração. A proteína pode variar de 55 a 65% e sua cor é de dourada a marrom, com densidade de 545 a 593 kg/m³.

d) Óleo de frango:

É o produto resultante do aquecimento dos subprodutos do abate de aves seguido de prensagem, decantação ou filtragem da gordura. Não deve conter outras fontes de gorduras que

não sejam provenientes do abate de aves (Bellaver e Zanotto, 2004). O produto se apresenta na forma líquida, sua cor é clara com tons amarelados, apresentando variação no valor ácidos graxos totais de 97 a 99%.

No Quadro 1, está descrito as especificações de qualidade da farinha de penas hidrolisada e farinha de vísceras.

Quadro 1. Especificações de qualidade de farinha de penas hidrolisada e farinha de vísceras

Parâmetros	Unidade	FPH*	FV*
Umidade (máx.)	%	10,00	8,00
Proteína bruta (min.)	%	80,00	55,00
Extrato etéreo (min.)	%	2,00	10,00
Matéria mineral (máx.)	%	4,00	15,00
Fósforo (min.)	%	-	1,50
Digestibilidade em pepsina 0,002% (min.)	%	40,00	60,00
Acidez (máx.)	mg/NaOH	2,00	3,00
Índice de peróxido (máx.)	meq/1000g	10,00	10,00
<i>Salmonella</i>	AUSENTE EM 25g DE PRODUTO		
Retenção em peneira 1,68mm (máx.)	%	10,00	10,00
Retenção em peneira 2mm (máx.)	%	5,00	5,00

Fonte: Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal (2009)

*FPH- farinha de penas hidrolisada/ FV- farinha de vísceras

2.3. Controle de qualidade para farinhas de pena

2.3.1. Pontos importantes que influenciam a qualidade

Para classificar os subprodutos de origem animal quanto a sua qualidade, devem ser consideradas as propriedades mensuráveis do produto, uma vez que existe grande variabilidade entre lotes produzidos em empresas com processamentos diferentes, dentro de uma mesma empresa, em diferentes épocas do ano e dias da semana. Tal variação pode ser decorrente de diversos aspectos.

a) Tempo entre o abate e o processamento

Existem dois sistemas básicos de produção de farinhas: frigoríficos com produção própria e o sistema de coleta de resíduos por processadores independentes. Em ambos os casos

a legislação brasileira estabelece que as matérias-primas devem ser processadas em no máximo 24 horas após o abate. Se este tempo for extrapolado o produto entrará em processo de putrefação e ocorrerá a oxidação das gorduras, interferindo significativamente na qualidade final do produto. Preferencialmente, o processamento deve ser feito imediatamente após o abate (Bellaver, 2005a; Brasil, 2008; Bellaver, 2009).

b) Processo de produção

Nunes et al. (2005) afirmaram que as variações encontradas nos coeficientes de metabolizabilidade dos alimentos podem ser explicadas pelo fato de os alimentos sofrerem processamentos diferentes, resultando em farinhas de diferentes qualidades.

Moritz e Latshaw (2001) demonstraram que é possível padronizar a densidade das farinhas de penas hidrolisadas ao utilizar condições de processamento variando entre 2,07 bar por 106 minutos a 7,24 bar por 4,5 minutos, produzindo uma densidade média da farinha de 483 kg/m³.

Scapim (2003) com o objetivo de determinar o melhor processamento térmico para farinhas mistas de penas e sangue, testou diversos tratamentos com diferentes tempos de cocção e de secagem das penas a uma mesma pressão. Os tempos avaliados foram de 30, 40, 50 e 60 minutos, a pressão estabilizada em 4 kgf/cm² e tempo de secagem de 75, 90, 105 e 120 minutos a uma temperatura de 180°C. Os autores concluíram que o maior conteúdo energético e os maiores coeficientes de digestibilidade para os aminoácidos foram obtidos com o seguinte processamento: cozimento inicial das penas por 30 min a pressão de 4 kgf/cm², secagem por 75min a 180°C, adição de 20% de sangue pré-cozido e secagem por 75min a 180°C. Desta forma, esse foi considerado o tratamento mais indicado para processar a farinha de penas e de sangue.

Sinhorini (2013) avaliou o efeito da combinação de seis níveis de pressão e seis temperaturas distintas, durante o processamento de farinhas de penas, sobre o teor proteico e a digestibilidade in vitro. Os autores enfatizaram que o melhor resultado para o teor proteico (83,44%) foi encontrado utilizando o tempo de hidrólise de 40 minutos e pressão de 2 kgf/cm². Considerando a variável tempo, os resultados obtidos nas pressões de 2,0, 2,5 e 3,0 kgf/cm² não diferiram significativamente.

c) Inclusão na ração

Nascimento et al. (2000) determinaram os valores de energia metabolizável aparente corrigida e verdadeira corrigida de nove farinhas de vísceras e de seis farinhas de penas na dieta

de aves, utilizando quatro diferentes metodologias. Foram observadas grandes variações na composição das farinhas de vísceras e penas, o que interferiu diretamente no valor de energia metabolizável desses alimentos. No entanto, segundo os autores, parte das diferenças encontradas nos valores energéticos dos alimentos deve-se, também, às diferentes metodologias empregadas.

Segundo Holanda (2009), a farinha de penas hidrolisadas pode ser utilizada nas dietas de frangos de corte fêmeas em até 8%, sem causar prejuízo do ganho de peso. Conhecer os componentes nutricionais dos alimentos possibilita ao nutricionista formular dietas que atendam as exigências de manutenção e de produção associado ao menor custo (Laboissière, 2008). Faz-se necessário estabelecer a padronização dos resíduos de abatedouros de aves, sob o rigor científico para determinar os valores nutricionais desses alimentos. Embora o tempo e o valor financeiro dispendido nas análises inviabilizem a avaliação de toda partida do ingrediente, avaliações periódicas são indispensáveis para a qualidade das rações produzidas.

Tessari et al. (2008) realizaram uma análise microbiológica em 354 matérias-primas utilizadas na alimentação animal (farinha de pena, farinha de carne e farinha de vísceras). As amostras vieram de quatro empresas localizada no estado de São Paulo no período de janeiro de 2011 a julho de 2013. Foi detectado contaminação por *Clostridium perfringens* em 53% das amostras de farinha de carne, 62,5% das farinhas de pena e 37,21% das farinhas de vísceras.

A composição das vísceras de aves, sangue e resíduos de frigorífico e o processamento inadequado das matérias-primas favorecem o desenvolvimento dos microrganismos (Oyarzabal, 2007), além disso, a contaminação da planta de processamento ou do caminhão do transporte podem ser as vias de recontaminação do produto final.

2.4 Uso de farinhas de penas sobre o desempenho e rendimento de carcaça em frangos de corte

Mack e Pack (2000) afirmaram que a qualidade da carcaça ganha cada vez mais importância como critério de qualidade da carne, sendo o rendimento da carcaça, a deposição de gordura e a proporção de carne de peito, os parâmetros mais importantes para caracterização da qualidade. Segundo Mendes et al. (2001), o rendimento de carcaça e de partes é o fator que mais afeta a rentabilidade da produção avícola.

Da mesma forma, Cancherini et al. (2001) avaliaram a utilização de subprodutos de origem animal (farinha de vísceras de aves e farinha de sangue bovino) em rações para frangos de corte. Os melhores ganhos de peso e conversão alimentar foram obtidos quando os subprodutos animais não foram utilizados. As farinhas de vísceras e de sangue não exerceram

influência sobre rendimento de carcaça, peito e porcentagem de gordura abdominal.

Bellaver *et al.* (2005b) mostraram que a inclusão de 4% de farinha de carne e ossos e 3% de farinha de vísceras não influenciou no desempenho aos 21 dias de idade quando comparadas com as dietas à base de milho e soja. Porém, aos 35 e 42 dias de idade observou-se que as aves alimentadas com dietas que continham farinhas de origem animal obtiveram menores pesos médios. Os autores afirmaram que o resultado encontrado pode estar relacionado a uma supervalorização da energia das farinhas de origem animal utilizadas; ou, ao insuficiente aporte de triptofano digestível na dieta com farinhas de origem animal, na fase de crescimento, mesmo após a correção parcial deste aminoácido na formulação. Não foi observado diferença nos cortes da carcaça ocasionada pelas diferentes fontes protéicas das dietas avaliadas.

Santos *et al.* (2006) avaliaram o consumo de ração em codornas alimentadas com níveis crescentes de farinha de pena nas dietas (0, 3, 6, 9%) e observaram que com o aumento da inclusão de farinha de penas na dieta, houve redução do consumo de ração e no rendimento de coxa mais sobrecoxa, contudo, ocorreu aumento do rendimento de dorso mais asas.

Caires (2009) avaliou o desempenho e o rendimento de carcaça de frangos de corte alimentados com dietas à base de milho e farelo de soja que continham ou não diferentes farinhas de origem animal (farinha de carne e ossos, sangue, penas e vísceras). Aos 42 dias de idade foi observado pior conversão alimentar e ganho de peso em aves que receberam dieta com 5% de farinha de sangue e as aves que receberam a combinação das quatro farinhas. O autor considerou que comprometimento do desempenho com a inclusão das quatro farinhas na mesma dieta foi relacionado aos níveis mais altos de proteína bruta (23,32% na fase inicial e 22,32% na fase de crescimento) e de aminoácidos, especialmente treonina e arginina, quando comparados com os outros tratamentos. Os níveis mais altos levaram ao excesso de proteína que foi catabolizado e excretado pelas aves na forma de ácido úrico. Levando em consideração que o custo metabólico para incorporar um aminoácido na cadeia protéica é menor (4 mol de ATP) do que o custo para excretar um aminoácido (6 a 18 mol de ATP), o autor concluiu que a eliminação destes aminoácidos tem alto custo energético o que poderia ter prejudicado o desempenho dos animais pois a energia que estaria sendo utilizada para produção de carne foi desviada para a eliminação de nitrogênio. Contudo, o rendimento de carcaça não foi afetado pelos tratamentos. Desta forma, as aves que receberam ração com inclusão de 5% das farinhas de carne e ossos, penas e vísceras individualmente obtiveram resultados de desempenho e rendimento de carcaça semelhantes ao grupo controle (milho e farelo de soja).

Holanda (2009) ao comparar uma dieta vegetal com dietas com diferentes níveis de inclusão de farinha de penas (2, 4, 6, 8%), observou aumento no consumo de ração, piora na

conversão alimentar e diminuição nos pesos médios das carcaças de frangos de corte com o aumento dos níveis de inclusão da farinha de penas. O autor não verificou diferenças significativas para as variáveis dos cortes das carcaças (peito, coxa, sobrecoxa). Entretanto, houve aumento no percentual de deposição de gordura com o aumento dos níveis de inclusão da farinha de penas. Como ocorreu o aumento crescente do consumo de ração, sendo a farinha de pena rica em aminoácidos não essenciais, provavelmente ocorreu um desbalanço na relação dos aminoácidos essenciais e aminoácidos não essenciais (Suida, 2001). O organismo animal pode ter utilizado preferencialmente os aminoácidos não essenciais, devido à alta disponibilidade, catabolizando-os e desaminando-os, pondo à disposição do organismo cadeias de esqueletos de carbono utilizadas para síntese de ácidos graxos, levando a maior deposição de gordura abdominal nas fêmeas (Nelson e Cox, 1995). Além disso, pode ter ocorrido também um sinergismo entre esta ocorrência e o alto nível de energia da dieta (3250kcal de Energia Metabolizável).

Carvalho et al. (2012) avaliaram o efeito da inclusão de farinhas de origem animal (A: dieta à base de milho e farelo de soja; B: dieta A + inclusão de 5% de farinha de penas; C: dieta A+ inclusão de 5% de farinha de vísceras) sobre o desempenho de frangos de cortes. Foi observado pelos autores que os tratamentos não influenciaram o desempenho até 21 dias de idade. Porém, o peso vivo aos 35 dias foi significativamente maior no tratamento à base de milho e farelo de soja e no tratamento com 5% de farinha de vísceras quando comparado ao tratamento com 5% de farinha de penas na dieta.

2.5 Fisiologia da digestão de proteínas nas aves

Durante o processo digestivo, as proteínas oriundas do alimento sofrem hidrólise (quebra das ligações peptídicas) por intermédio das enzimas proteolíticas que atuam em pH ácido (1,0 a 4,0). A eficiência da digestão vai ser determinada pela área de superfície disponível para atuação das enzimas e o tempo de ação sobre o substrato (Macari et al., 1994).

Nas aves a digestão das proteínas inicia-se no proventrículo. Este órgão é controlado pelo nervo vago e secreta ácido clorídrico (HCl), pepsinogênio, gastrina e muco. O HCl transforma o pepsinogênio em sua forma ativa, pepsina. Um fator determinante para a atuação das enzimas é o pH ácido encontrado no proventrículo (2,8 a 4,0), com isso as proteínas no interior deste órgão são desnaturadas pela ação da pepsina. As proteínas parcialmente digeridas são direcionadas para o duodeno por meio da motilidade proventrículo-moela. A característica física da proteína ingerida e o tempo de permanência no proventrículo-moela determinam a

eficácia da digestão proteica, uma vez que a hidrólise péptica cessa quando o pH do quimo é aumentado no duodeno (Macari et al., 1994).

A entrada do quimo no duodeno estimula a produção de bile e suco pancreático (Argenzio, 1993). As principais enzimas proteolíticas do pâncreas são: tripsina, quimiotripsina, carboxipeptidases A e B e elastase, estas enzimas realizam a hidrólise da maior parte do quimo liberado no intestino delgado (Macari et al., 1994). A digestão dos peptídeos até aminoácidos são completadas pelas múltiplas peptidases produzidas pelas células intestinais principalmente nas porções iniciais do intestino delgado. (Peluzio e Batista, 2008).

Um fato interessante é que cerca de 70 a 85% da absorção proteica que sucede no jejuno das aves ocorre na forma de pequenos peptídeos, o que sugere que as proteínas não precisam ser completamente degradadas em aminoácidos livres para serem absorvidas. Por outro lado, o íleo é o local de maior absorção de aminoácidos livres (Leeson e Summers, 2001).

De forma geral, a capacidade digestiva das aves está intimamente relacionada com a idade e com o tempo de contato após eclosão do trato gastrointestinal com o alimento (Uni et al.;1998). Durante as primeiras semanas de vida, a atividade enzimática e o desenvolvimento fisiológico não estão totalmente consolidados. As aves já nascem com uma atividade enzimática mínima e elevam sua capacidade digestiva em decorrência da idade (Longo, 2003).

2.6 Utilização das enzimas

As enzimas podem ser incluídas nas dietas animais de duas formas. A primeira pode ser denominada de “on top” (por cima), esta opção tem como objetivo melhorar o desempenho e consiste em suplementar as enzimas com uma formulação padrão, sem alterar os níveis nutricionais. Entretanto, se esses níveis estiverem adequados e/ou com uma margem de segurança nas matrizes nutricionais, a inclusão da enzima disponibilizará nutrientes cujo o animal não demanda e que ele não será capaz de converter em peso. Neste cenário, a adição da enzima eleva o custo da dieta e produz um excesso de nutrientes que pode ser convertido em gordura ou ser excretado pelo animal (Lecznieski, 2006).

A segunda forma de inclusão das enzimas é realizada em conjunto com a redução dos nutrientes da dieta (utilizando a valorização recomendada da matriz nutricional da enzima) e a adição das enzimas exógenas tem o papel de restaurar o valor nutricional da dieta padrão visando obter o mesmo desempenho de uma dieta com os níveis nutricionais recomendados (Barbosa et al., 2008). O objetivo desta forma de inclusão de enzimas é a diminuição no custo das formulações.

No mercado podemos encontrar duas formas de apresentação das enzimas: complexos enzimáticos (associação de duas ou mais enzimas) ou isoladamente. Em razão das enzimas serem muito específicas, os produtos que contêm apenas uma enzima isolada não são considerados satisfatórios para produzir máximo benefício. Portanto, o emprego de complexos enzimáticos tem sido proposto no uso em dietas à base de milho e farelo de soja, no intuito de melhorar o desempenho de aves (Brum et al., 2006). Entretanto, o efeito das interações entre enzimas não é bem conhecido o que pode gerar resultados controversos no uso de complexos enzimáticos (Albino et al., 2007).

2.7 Proteases

As proteases são enzimas que possuem função catalítica para hidrolisar as ligações peptídicas das proteínas e pertencem à classe das hidrolases (Barrett et al., 2001). As proteases podem ser classificadas de acordo com o pH em que são ativadas (ácido, neutro ou alcalino), ou de acordo com sua capacidade para hidrolisar as proteínas específicas (queratinase, elastase, colagenase, etc.). Além disso, são subdivididas em dois grupos principais: exopeptidases e endopeptidases, dependendo do local de ação.

O processo de produção das proteases produzidas por vegetais e animais é complexo e de custo elevado pois dependem da disponibilidade de áreas de plantio e animais para abate.

Desta forma, os microrganismos se apresentam como excelente fonte de produção de enzimas, devido à sua ampla diversidade bioquímica, susceptibilidade para a manipulação genética, rápido crescimento, pequenas áreas exigidas para o seu cultivo e maior estabilidade quando comparada com as homólogas produzidas por plantas e animais (Rao, 1998). Atualmente, proteases microbianas são responsáveis por aproximadamente 40% do total das vendas de enzimas em todo o mundo.

2.7.1 Exopeptidases

As exopeptidases agem apenas nas extremidades de cadeias polipeptídicas, e com base em seu local de ação (terminal nitrogênio ou carbono), são classificadas como aminopeptidase ou carboxipeptidase, respectivamente.

As aminopeptidases atuam na extremidade nitrogênio (N) terminal livre da cadeia polipeptídica e possuem como resíduo: um único aminoácido ou dipeptídio ou tripeptídio. Enquanto, as carboxipeptidases atuam nos terminais carbono (C) da cadeia polipeptídica e liberam um único aminoácido ou um dipeptídio.

2.7.2 Endopeptidases

As endopeptidases são caracterizadas pela ação preferencial nas ligações peptídicas nas regiões internas da cadeia polipeptídica, longe dos terminais N e C. A presença do grupo amino ou carboxila livre tem uma influência negativa na atividade da enzima. As endopeptidases são divididas em quatro subgrupos com base no seu mecanismo catalítico: serina proteases, proteases aspárticas, cisteína proteases e metalo protease.

As serinas proteases possuem grupo serina no seu sítio ativo e podem ser subdivididas em 20 famílias e seis clãs de acordo com suas similaridades estruturais. Alguns exemplos são: carboxipeptidases, quimotripsinas e subtilisinas (Rao et al., 1998).

As proteases aspárticas atuam em condições ácidas e dependem de resíduos de ácido aspártico para sua atividade. São agrupadas em três famílias: pepsina, retropepsina e enzimas dos pararetrovírus (Rao et al., 1998).

Cisteína proteases são ativas apenas na presença de agentes redutores e são divididas em quatro grupos, sendo a papaína e a tripsina exemplos destas proteases (Rao et al., 1998).

As metaloproteases requerem metais divalentes para sua atividade. São divididas em 30 famílias, sendo a colagenase e elastase exemplos destas proteases (Rao et al., 1998).

2.7.3 Queratinases

Queratinases são proteases capazes de digerir as queratinas, sendo a maioria delas pertencentes a classe das serinas proteases. O pH e a temperatura, nos quais a enzima apresenta maior atividade, variam de 5,5 a 10,0 (Qin et al., 1992; Bernal et al., 2006) e 30 °C até 100 °C, respectivamente (Mukhopadhyay e Chandra, 1990; Nam et al., 2002).

As queratinas são menos susceptíveis à digestão por enzimas, tais como tripsina, pepsina e papaína, porque a rígida cadeia de proteína em α -hélice e estruturas β -folha estabiliza mecanicamente a queratina (Onifade et al., 1998; Parry e North, 1998; Fraser e Parry, 2008; Brandelli, 2008). No entanto, a queratina pode ser degradada por algumas espécies de fungos, actinomicetos e *Bacillus* (Riffel e Brandelli, 2006; Eliades et al., 2010; Bach et al., 2011).

As bactérias gram positivas da espécie *Bacillus*, destacam-se como importantes produtoras de queratinases e possuem alta capacidade de produção de proteases alcalinas com elevada atividade catalítica (Joo e Chang, 2006). Contudo, os microrganismos pertencentes ao mesmo gênero (*Bacillus*) podem produzir diferentes queratinases (Quadro 2).

Quadro 2. Condições para a produção de queratinases a partir de diferentes microorganismos da espécie *Bacillus*

Microorganismo	Substrato queratinoso	Condições de cultivo	Referência
<i>Bacillus</i> sp. P45	Farinha de penas	30 °C; pH 7,0; 125 rpm; 48 h	Daroit, 2011
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Penas	40 °C; pH 7,5; 150 rpm; 48 h	Cortezi et al., 2008
<i>Bacillus cereus</i> DCUW	Penas	30-37 °C; pH 7,5; 140 rpm; 96 h	Ghosh et al., 2008
<i>Bacillus halodurans</i> JB 99	Penas	55 °C; pH 10,0; 220 rpm; 48 h	Shrinivas e Naik, 2011
<i>Bacillus licheniformis</i> FK 14	Farinha de penas	37 °C; pH 7,0; 150 rpm (biorreator); 72 h	Suntornsuk et al., 2005
<i>Bacillus licheniformis</i> RPk	Penas	37 °C; 200 rpm; 48 h	Fakhfakh et al., 2009
<i>Bacillus pumilus</i> A1	Farinha de penas	30°C; pH6,0; 250rpm; 28h	Fakhfakh-Zouari et al., 2010

2.7.3.1. Produção de queratinases

A utilização das proteases queratinolíticas requer a produção destas enzimas em quantidades suficientes para fins comerciais. Como a produção das queratinases é normalmente induzida por queratina (Anbu et al., 2008; Cai e Zheng, 2009) deve ser adicionado ao meio de cultivo substratos específicos (penas de galinha, farinha de penas ou cabelo). Alguns dos materiais ricos em queratina são resíduos da agroindústria, e produzidos em grande quantidade. Por isso, a tecnologia microbiana de produção de queratinases consegue converter substratos de baixo custo em produtos de alto valor comercial, proporcionando assim, alternativa eficiente de gestão de resíduos (Brandelli e Riffel, 2005; Wang e Parsons, 1997; Daroit et al., 2008)

Contudo, a adição de substrato rico em queratina nem sempre é necessária para a produção de queratinase (Kim et al., 2006). Outros substratos, tais como farelo de soja, leite desnatado, casca de camarão em pó, gelatina, caseína e soro de queijo, também podem agir como indutores da produção de queratinase (Pillai, 2008; Suntornsuk et al., 2005; Thys e Brandelli, 2006; Casarin et al., 2008).

2.7.3.2. Mecanismo de ação das queratinases microbianas

O mecanismo de queratinólise parece não envolver apenas a clivagem de ligações peptídicas pelas queratinases, mas também a redução das ligações dissulfetos, uma vez que níveis elevados de queratinólise somente são atingidos quando ocorre a clivagem destas ligações (Brandelli et al., 2010).

A hidrólise de ligações dissulfeto ocorre pela ação de enzimas denominadas dissulfeto redutases, que são produzidas pelos microrganismos, ou por meio do potencial redutor das células microbianas (Ramnani e Gupta, 2007). Na ausência destes agentes, a degradação de queratinas fica em torno de apenas 10% (Gupta e Ramnani, 2006). Portanto, os agentes redutores associados com as queratinases são responsáveis pela modificação estrutural do substrato, permitindo a maior acessibilidade da enzima às moléculas de queratina (Brandelli et al., 2010). Contudo, Prakash et al. (2010) relataram a existência de serina proteases queratinolíticas, produzidas por *Bacillus halodurans* PPKS-2, capazes de reduzir pontes dissulfeto.

A proteólise da queratina é semelhante à hidrólise de outras proteínas, envolvendo a hidrólise das ligações peptídicas na proteína já parcialmente desestruturada pelo processo de sulfitólise (Brandelli, 2008).

Além disso, uma etapa denominada queratinólise mecânica se aplica a fungos e outros microrganismos produtores de micélio. Sendo que, a degradação da queratina ocorre, inicialmente, como resultado da pressão exercida pela massa micelial e/ou pela penetração do micélio no substrato queratinoso. Esta etapa provavelmente precede a hidrólise enzimática, uma vez que o micélio é o produtor das proteases extracelulares (Blyskal, 2009).

2.7.3.3. Aplicação das queratinases

As queratinases atuam na hidrólise enzimática de penas, cabelo, lã, colágeno e caseína e podem ser aplicadas no tratamento de águas residuais e em indústrias de rações, fertilizantes, detergentes, couros, têxtil, farmacêutica e cosmética (Brandelli et al., 2010). Sendo assim, o bioprocessamento de materiais ricos em queratina é a principal aplicação comercial para microrganismos queratinolíticos e queratinases microbianas.

A biotecnologia oferece a possibilidade de obtenção de produtos com alto valor agregado, por meio de matérias-primas de baixo custo e processos de baixo impacto ambiental.

Desta forma, a produção industrial de queratinase têm despertado o interesse das indústrias no intuito de viabilizar o uso da queratina como fonte rica de aminoácidos na

avicultura industrial. O emprego de farinha de penas na alimentação animal tem como objetivo elevar o lucro dos abatedouros avícolas e evitar a poluição ambiental, que poderia ser causada caso esses resíduos fossem descartados sem posterior reaproveitamento (Scapim et al., 2003). Este subproduto de abatedouro é utilizado como fonte alternativa de proteína para rações de aves, desta forma, reduz os custos da dieta (Scheuermann et al., 2007).

A conversão das penas em ração animal é considerada uma das maneiras mais eficientes para a reciclagem de nutrientes. As desvantagens dos processos térmicos na produção de rações aumentam o interesse na hidrólise enzimática das penas utilizando queratinases. Proteases queratinolíticas podem ser adicionadas diretamente à dieta de animais monogástricos com o intuito de aumentar a digestibilidade de componentes protéicos em rações (Odetallah et al., 2005).

A possível diminuição dos custos com nutrição por meio da utilização de queratinase seria muito vantajosa, uma vez que o custo da alimentação representa aproximadamente 70% dos custos totais de produção (Freitas, 2000).

Além disso, as queratinases são capazes de disponibilizar maior quantidade de nutrientes contido na ração, com o objetivo de melhorar ou pelo menos manter o desempenho dos animais (Sartoli et al., 2007). Portanto, a utilização da enzima queratinase exógena seria uma opção para melhorar a digestibilidade da farinha de pena.

2.7.3.4. Efeito da utilização de queratinases

Angel et al. (2011) avaliaram o efeito da utilização da enzima protease, produzida pelo *Bacillus licheniformis*, adicionadas em dietas de milho e soja, sobre o desempenho e metabolizabilidade dos nutrientes de frangos de corte, de sete a 22 dias de idade. Foi utilizado uma dieta controle (22,5% proteína bruta) e rações com baixa proteína (20,5%). As rações de baixa proteína continham 0, 100, 200, 400 e 800 mg/kg de protease (BP0, BP100, BP200, BP400 e BP800, respectivamente). Foi observado pelos pesquisadores que as aves que receberam a dieta controle, foram 7,5% mais pesadas que as aves que receberam a dieta BP0. As aves alimentadas com dietas de baixa proteína contendo protease, independente da concentração, obtiveram ganho de peso semelhante às aves do controle. A conversão alimentar foi pior nas aves alimentadas com BP0 ou BP100 em comparação ao grupo controle. No entanto, quando a protease foi adicionada nos níveis de 200 a 800 mg/kg, a conversão foi semelhante a das aves do controle. A metabolizabilidade da proteína foi maior em frangos de corte alimentados com as dietas com baixos níveis suplementadas com enzima, independente da concentração de inclusão.

Dois experimentos foram conduzidos por Freitas et al. (2011) para determinar o efeito da adição de protease exógena, produzida por *Bacillus licheniformis*, em dietas de frangos de corte à base de milho, farelo de soja e farinha de carne e ossos. Os tratamentos foram: controle, formulado com 3.050 e 3.150 kcal de energia metabolizável e 22,5% e 20% de proteína bruta nas fases inicial e de crescimento, respectivamente; e controle negativo, formulado com redução de 4,4% na energia metabolizável e proteína bruta em comparação com as dietas do controle. A enzima protease foi adicionada às dietas do controle negativo em: 0, 100, 200, 400, 800 e 1600mg/kg de ração. Foi observado que os frangos de corte alimentados com dieta controle obtiveram maior ganho de peso e melhor conversão alimentar do que aqueles alimentados com dieta controle negativo, independentemente da suplementação enzimática. No experimento II, foi utilizado DIC em arranjo fatorial 2x2x2, sendo dois níveis de proteína (diferença de 7% do grupo controle), dois níveis de energia (diferença de 3% na energia metabolizável), e duas inclusões de protease (0 e 200mg/kg). Foi observado que os frangos de corte alimentados com dietas de alta proteína e energia obtiveram melhor desempenho do que aqueles alimentados com dietas com baixos níveis proteicos e energéticos, portanto a utilização da enzima exógena não melhorou o desempenho. No entanto, a suplementação de protease melhorou a conversão alimentar bem como a metabolizabilidade da gordura e da proteína, independentemente do nível de proteína e energia da dieta.

Matias (2012) avaliou o efeito da enzima protease em frangos de corte. As aves foram alimentadas com dietas a base de milho e soja, com inclusão de farinha de penas nas fases inicial e crescimento. A autora observou que os melhores resultados para metabolizabilidade da proteína bruta e extrato etéreo foram obtidos utilizando-se dietas valorizadas sem enzima (controle negativo) e dietas não valorizadas com enzima (*on top*). O tratamento *on top* melhorou o ganho de peso e o fator de produção de frangos de corte de um a 38 dias de idade, sem efeito sobre o rendimento de cortes.

Zotesso (2015) avaliou o efeito de diferentes níveis proteicos e inclusões de protease, produzida pelo *Bacillus licheniformis*, sobre o desempenho de frangos de corte. As aves foram alimentadas com dietas a base de milho e soja, com inclusão de farinha de penas nas fases crescimento e final. Foram utilizados nove tratamentos em delineamento inteiramente casualizado. A avaliação, quanto à inclusão da protease, no período experimental total (um a 42 dias), não demonstrou efeito significativo sobre ganho de peso, consumo de ração, conversão alimentar e rendimento de cortes. O índice de rentabilidade avaliado sinalizou que pode haver benefício econômico na utilização da protease no período inicial de criação. Em contrapartida, os resultados zootécnicos a partir de 29 dias não mostraram benefício com o uso da enzima, a

sua utilização representou custo adicional aos tratamentos que receberam protease, favorecendo a obtenção de melhor índice de rentabilidade com o uso do tratamento controle negativo no período de um a 42 dias de idade.

2.8 Objetivos

2.8.1 Objetivos gerais

Estudar os efeitos em frangos de corte da adição ou não da farinha de penas e da protease (com e sem valorização da matriz nutricional) sobre o consumo de ração, peso corporal, conversão alimentar, viabilidade, metabolizabilidade dos nutrientes e produção enzimática endógena de um a 35 dias de idade.

2.8.2 Objetivos específicos

2.8.2.1 Avaliar a utilização de protease em dietas com e sem farinha de penas sobre o desempenho e rendimento de carcaça de frangos de corte de um a 38 dias de idade

2.8.2.2 Avaliar os efeitos da utilização de protease em dietas com e sem farinha de penas sobre a metabolizabilidade em dois períodos: nove a 12 dias de idade e 23 a 26 dias de idade

2.8.2.3 Avaliar o efeito da adição de protease em dietas com e sem farinha de penas sobre a atividade enzimática pancreática de tripsina e quimotripsina em frangos de corte no 14^o e aos 35^o dia de idade.

2.8.2.4 Avaliar o efeito da valorização da energia, proteína e aminoácidos atribuída à protease em dietas contendo farinha de penas com e sem inclusão de protease sobre o desempenho e rendimento de carcaça de frangos de corte de um a 38 dias de idade

2.9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABPA. Associação Brasileira Proteína Animal. Produção de carne de frango totaliza 13,146 milhões de toneladas em 2015. Disponível em: <http://abpa-br.com.br/noticia/producao-de-carne-de-frango-totaliza-13146-milhoes-de-toneladas-em-2015-1545>. Acesso em janeiro de 2016.

ABRA. Associação Brasileira de Reciclagem Animal. II Diagnóstico da indústria brasileira de reciclagem animal. Disponível em: http://abra.ind.br/views/download/II_diagnostico_da_industria_brasileira_de_reciclagem_animal.pdf. Acesso em janeiro de 2016.

ALAELEIN M. ABUDABOS. Effect of enzyme supplementation to normal and low density broiler diets based on corn-soybean meal. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, v.7, p. 139-148, 2012.

ALBINO, L. F.; ROSTAGNO, H. S.; SANT'ANNA, R.; FONSECA, J. B. Determinação dos valores de aminoácidos metabolizáveis e proteína digestível de alimentos para aves. *Rev. Soc. Bras. de Zootec.*, v.21, n.6, p.1059-1068, 1992

ALBINO, L.; BUZEN, S.; ROSTAGNO, H. S. Ingredientes promotores de desempenho para frangos de corte. In: Seminário de Aves e Suínos, 7., 2007, Belo Horizonte. *Anais...Belo Horizonte: AVESUI regiões*, 2007. p.73-90.

ALDRICH, G.; LYONS T.P; JACQUES K.A. USA Poultry Meal: quality issues and concerns in pet foods. *Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries*. 2007.

ANBU P., HILDA A., SUR H.W., HUR B.K., JAYANTHI S., Extracellular keratinase from *Trichophyton* sp. HA-2 isolated from feather dumping soil, *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, v. 62, p. 287-292, 2008.

ANGEL, C. R.; SAYLOR, W.; VIEIRA, S. L.; WARD, N. Effects of a monocomponent protease on performance and protein utilization in 7- to 22-day-old broiler chickens. *Poult. Sci.*, v. 90, p. 2281-2286, 2011.

ARGENZIO, R.A. Funções Secretórias do Trato Gastrointestinal. In: SWENSON, M.J.; REECE, W.O. Dukes: Fisiologia dos Animais Domésticos. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.319-329. 1993.

BACH, E.; CANNAVAN, F.S.; DUARTE, F.R.S.; TAFFAREL, J.A.S.; TSAI, S.M., BRANDELLI, A. Characterization of feather-degrading bacteria from Brazilian soils. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, v. 65, p. 102- 107, 2011.

BAKER, D. H. R. C.; BLUTHENTHAL, K. P.; BOEBEL, G. L.; CZARNECKI, L. L.; SOUTHERN G. M.; WILLIS. Protein-amino acid evaluation of steamed-processed feather meal. *Poult. Sci.*, v.60, p.1865-1872, 1981.

BARBOSA, N.A.A.; SAKOMURA, N.K.; FERNANDES, J.B.K.; DOURADO, L.R.B. Enzimas exógenas no desempenho e na digestibilidade ileal de nutrientes em frangos de corte. *Pesq. Agro. Bras.*, v. 43, n.6, p.755-762, 2008.

BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D.; O'BRIEN, E. A. The merops database as a peptidase information system. *Journal of Structural Biology*, 134: 95-102. 2001.

BARROS, F. D. Reciclagem de resíduos de origem animal: um estudo qualitativo entre processos contínuos e descontínuos e a geração de odores fugitivos. São Caetano do Sul: IMT-CEUN, 2007. 136 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia, 2007.

BELLAVER C. E ZANOTTO, D. L. 2004. Parâmetros de qualidade em gorduras e subprodutos protéicos de origem animal. In: CONFERENCIA APINCO, 2004, Santos. *Anais...Santos-SP*, 2004.

BELLAVER, C et al. Substituição Parcial do Farelo de Soja pela Farinha de Vísceras de Aves em Dietas Balanceadas com Base na Proteína e em Aminoácidos Totais ou Digestíveis para Frangos de Corte. *Rev. Bras. Cienc. Avic.*, v.3, n.3, p.233-240, 2001c.

BELLAVER, C. Falhas no processo de produção de farinhas de pena. *Rev. Graxaria*, n.35, p.48-49, 2013.

BELLAVER, C. Ingredientes de origem animal destinados à fabricação de rações. In: SIMPÓSIO SOBRE INGREDIENTES NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL. 2001, Campinas. *Anais...* Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 2001b. p.167-190

BELLAVER, C. Limitações e vantagens do uso de farinhas de origem animal na alimentação de suínos e de aves. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DA INDÚSTRIA DE ALIMENTAÇÃO ANIMAL, 2., 2005, Curitiba. *Anais...* Curitiba: Alltech Biotechnology, 2005a.

BELLAVER, C. Processamento e cuidados com produtos de origem animal: higiene e profilaxia. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE AVES E SUÍNOS E TECNOLOGIA DA PRODUÇÃO DE RAÇÕES, 2001. Campinas. *Anais...* Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 2001a. p. 357-376.

BELLAVER, C. Qualidade no processamento em fábricas de farinhas e gorduras animais. In: V ENCONTRO TÉCNICO UNIFRANGO, 2009, Maringá. *Anais...* Maringá-PR, 2009.

BELLAVER, C.; COSTA C. A.; AVILA V. S. et al. Substituição de farinhas de origem animal por ingredientes de origem vegetal em dietas para frangos de corte. *Ciênc. Rural*, v.35, n.3, p.671- 677, 2005b

BERNAL, C.; CAIRO, J.; COELLO, N. Purification and characterization of a novel exocellular keratinase from *Kocuria rósea*. *Enzyme and Microbial Technology*, New York, v.38, p. 49-4, 2006.

BLYSKAL, B. Fungi utilizing keratinous substrates. *International Biodeterioration & Biodegradation*, Oxford, v. 63, p. 631-653, 2009.

BRANDELLI, A. Bacterial keratinases: useful enzymes for bioprocessing agroindustrial wastes and beyond. *Food and Bioprocess Technology*, New York, v. 1, p. 105-116, 2008.

BRANDELLI, A.; DAROIT, D.J.; RIFFEL, A. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, New York, v. 85, p. 1735-1750, 2010.

BRANDELLI A., RIFFEL A., Production of an extracellular keratinase from *Chryseobacterium* sp. growing on raw feathers, *Electronic Journal of Biotechnology*, v.8, n.1, p. 35 – 42, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 34, de 28 de maio de 2008. *Diário Oficial*, Brasília, 29 maio 2008. Seção 1, p. 13.

BRUM, P. A. R. et al. Efeito da utilização de alfa-amilase em dietas a base de milho e farelo de soja na digestibilidade da energia das rações e no desempenho de frangos de corte. Concórdia: Embrapa – CNPSA, 2006. 3 p. (Comunicado técnico, 425).

BUTOLO, J.E. Qualidade de ingredientes na alimentação animal. Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal. 2002. 430 p

CAI C., ZHENG X., Medium optimization for keratinase production in hair substrate by a new *Bacillus subtilis* KD-N2 using response surface methodology, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, v. 36, p. 875- 883, 2009.

CAIRES, Carolina Magalhães. Dietas de frangos de corte com subprodutos de origem animal de suplementação de creatina. 2009. 48 f. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2009.

CAMPESTRINI, E.; SILVA, V. T. M.; APPELT, M .D. Utilização de enzimas na alimentação animal. *Rev. Eletron. Nutritime.*, v. 2, n. 6, p. 259-272, 2005.

CANCHERINI, L.C.; JUNQUEIRA, O.M.; ANDREOTTI, M.O.; BARBOSA, M.J.B. Utilização de subprodutos de origem animal em rações para frangos de corte, com base em proteína ideal, no período de 43 a 49 dias de idade. In.: Reunião anual da sociedade brasileira de zootecnia, 2001, Piracicaba, Anais...,Piracicaba: SBZ, 2001. p. 724-725.

CAPARELLA, T. Os produtos da indústria de graxaria continuam sendo ingredientes de qualidade de rações. *Revista Graxaria Brasileira – Reciclagem Animal*, v. 6, n. 33, p. 56-59, 2013.

CARVALHO, C. M. C., FERNANDES, E. A., CARVALHO, A P., CAIRES, R. M., FAGUNDES, N. S. Uso de farinhas de origem animal na alimentação de frangos de corte. *Revista portuguesa de ciências veterinárias*, v.107, p. 69-73, 2012.

CASARIN F., CLADERA-OLIVERA F., BRANDELLI A., Use of Poultry byproduct for Production of Keratinolytic Enzymes, *Food and Bioprocess Technology*, v.1, p.301–305, 2008.

COMPÊNDIO BRASILEIRO DE ALIMENTAÇÃO ANIMAL. Microingredientes: microingredientes na alimentação animal. São Paulo: Sindirações; Anfal, 2009. 45 p.

COMPÊNDIO BRASILEIRO DE NUTRIÇÃO ANIMAL. 3.ed. São Paulo: Sindicato Nacional da Indústria de Alimentação Animal, 2005. 204p.

CORTEZI, M.; CILLI, E.M.; CONTIERO, J. *Bacillus amyloliquefaciens*: a new keratinolytic feather-degrading bacteria. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, Guntur, v. 2, p. 170-177, 2008.

COUSINS, BART. Enzimas na nutrição de aves. In: I Simpósio Internacional ACAV Embrapa sobre Nutrição de Aves, 1999, Concórdia – SC. Anais...Concórdia: 1999. 15p.

DALEV P., An enzyme-alkaline hydrolysis of feather keratin for obtaining a protein concentrate for fodder, *Biotechnology Letters*, v. 12, p. 71-72, 1990.

DAROIT, DJ; CORRÊA, APF; BRANDELLI, A. Production of keratinolytic proteases through bioconversion of feather meal by the Amazonian bacterium *Bacillus* sp. P45 *International Biodeterioration & Biodegradation* v. 65, n. 1, p. 45-51, 2011.

DAROIT D.J., SIMONETTI A., HERTZ P.F., BRANDELLI A., Purification and characterization of an extracellular β -glucosidase from *Monascus purpureus*, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.18, p.933–941, 2008.

ELÍADES, L.; CABELLO, M.; VOGET, C.; GALARZA, B.; SAPARRAT, M. Screening for alkaline keratinolytic activity in fungi isolated from soils of the biosphere reserve, Parque

Costero del Sur, (Argentina). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, New York, v. 26, p. 2105-2111, 2010.

FAKHFAKH N, KANOUN S, MANNI L, NASRI M. Production and biochemical and molecular characterization of a keratinolytic serine protease from chicken feather-degrading *Bacillus licheniformis* RPk. *Can J Microbiol.* v. 55, p.427–436, 2009.

FAKHFAKH-ZOUARI, N., HADDAR, A., HMIDET, N., FRIKHA, F. AND NASRI, M. Application of statistical experimental design for optimization of keratinases production by *Bacillus pumilus* A1 grown on chicken feather and some biochemical properties. *Process. Biochem.*, v. 45, p. 617-626, 2010.

FERROLI, P. C. M.; FIOD NETO, M.; CASAROTTO, N.; CASTRO, J. E. Fábrica de subprodutos de origem animal: a importância do balanceamento das cargas dos digestores de vísceras. *Revista Produção*, v. 10, n. 2, p. 5-9, 2002.

FRASER, R.D.B.; PARRY, D.A.D. Molecular packing in the feather keratin filament. *Journal of Structural Biology*, San Diego, v. 162, p. 1-13, 2008.

FREITAS, D. M., S. L. VIEIRA, C. R. ANGEL, A. FAVERO, AND A. MAIORKA. Performance and nutrient utilization of broilers fed diets supplemented with a novel mono component protease. *J. Appl. Poult*, v. 20, p. 322-334, 2011.

FREITAS, E. R.; FUENTES, M.F.F.; ESPINDOLA, G. B. Efeito da suplementação enzimática em rações à base de milho e farelo de soja sobre o desempenho de poedeiras comerciais. *Rev. Bras. de Zootecnia*. Viçosa, v. 29, n.4, p. 1103-1109, 2000.

GARCIA, E.R.M.; MURAKAMI, A.E.; BRANCO, A.F.; FURLAN, A.C.; MOREIRA, I. Suplementação enzimática em dietas contendo farelo de soja e soja integral extrusada e efeitos na digestibilidade dos nutrientes, fluxo ileal da digesta e performance de frangos de corte. *Rev. Bras. Zootec.*, v.29, n.5, p.1414-1426, 1997.

GUENTER W. Practical experience with the use of enzymes. In: MARQUARDT R.R.; HAN Z. (Ed.). *Enzymes in Poultry and Swine Nutrition*. Ottawa: International Development Research

Centre, 1997. p. 53-62.

GHOSH A, CHAKRABARTI K, CHATTOPADHYAY D. Degradation of raw feather by a novel high molecular weight extracellular protease from newly isolated *Bacillus cereus* DCUW. *J Ind Microbiol Biotechnol.* v. 35, p. 825–834, 2008.

GREGORY, B.R. et al. Studies on the aminoacid and vitamin composition of feather meal. *Poult. Sci., Savoy*, v.35, p.234-235, 1956.

GUPTA, R.; RAMNANI, P. Microbial keratinases and their prospective applications: An overview. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Berlin, v.70, p. 21–33, 2006.

HOLANDA, M.A.C. *Avaliação nutricional da farinha de penas hidrolisada na alimentação de frangos de corte*. 2009. 93f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

JOO, H.S.; CHANG, S. Production of an oxidant and SDS-stable alkaline protease from an alkaliophilic *Bacillus clausii* I-52 by submerged fermentation: Feasibility as a laundry detergent additive. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 38, p.176-183. 2006.

KIM M.M., TA Q.V., MENDIS E., RAJAPAKSE N., JUNG W.K., BYAN H.G., JEON Y.J., KIM S.K., Phlorotannins in *Ecklonia cava* extract inhibit matrix metalloproteinase activity, *Life Sciences*,79, 1436- 1443, 2006.

LABOISSIÈRE, M. *Farinhas de resíduos de abatedouros avícolas em diferentes graus de processamento em rações pré-iniciais e iniciais de frangos de corte*. 2008. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) – Programa de Pós-Graduação em Produção Animal, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

LATSHAW J.D. Quality of feather meal as affected by feather processing conditions. *Poult. Sci., Savoy*, v.69, p.953-958, 1990.

LECZNIESKI, J.L. Considerações práticas do uso de enzimas. In: *Seminário Internacional de Aves e Suínos*, 5., 2006. Florianópolis. *Anais...* Florianópolis: AVESUI, 2006. p. 34-46.

LEHNINGER, A.L., NELSON, A. L., COX, M. M. Princípios de Bioquímica. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2000. 839 p.

LEESON, S.; SUMMERS, J.D. Nutrition of the chicken. 4.ed. Guelph: University Books, 413p. 2001.

LIMA, A.C.F. et al. Atividade enzimática pancreática de frangos de corte alimentados com dietas contendo enzima ou probiótico. Revista Brasileira de Ciência Avícola. Campinas, v.4, n.3, p.187-193, 2002.

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

MACARI, M.; FURLAN, R.; GONZALES, E. *Fisiologia aviária aplicada à frangos de corte*. Jaboticabal: FUNEP, 1994. 296 p.

MACK, S. E M. PACK. 2000. Desenvolvimento de carcaça de frango: influência dos aminoácidos da dieta. In: CONFERENCIA APINCO DE CIENCIA E TECNOLOGIA AVICOLAS, 2000, Campinas. *Anais...* Campinas: APINCO, 2001. p.145-160

MARTELLI S.M, LAURINDO J. B, MOORE GRP, GONDOLFO CAP; PAES S.S. LWT-Food, Sci Techno, v. 39, p. 292-301, 2006.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. Bioquímica Básica. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 360 p. 1999.

MATIAS, C. F. Q. *PROTEASE NA ALIMENTAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE*. 2012. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

MENDES, A.A. Rendimento e qualidade da carcaça de frangos de corte. In: CONFERENCIA APINCO DE CIENCIA E TECNOLOGIA AVICOLAS, 2001, Campinas. *Anais...*

Campinas:APINCO, 2001. p.79-99.

MOORE, G. R. P; MARTELLI S. M; GANDOLFO C.A; PIRES A. T.N; LAURINDO, J.B. Queratina de penas de frango: extração, caracterização e obtenção de filmes. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* [online]. v. 26, n. 2, p. 421-427. 2006.

MORITZ, J. S.; LATSHAW, J. D. Indicators of nutritional value of hydrolyzed feather meal. *Poult. Sci.*, v. 80, p. 79-86, 2001.

MUKHOPADHYAY, R.P.; CHANDRA, A.L. Keratinase of Streptomycete. *Indian Journal of Experimental Biology*, Calcutta, v. 28, p. 575-577, 1990.

NABER, E.C. et al. Effect of processing methods and aminoacid supplementation on dietary utilization of feather meal protein by chicks. *Poult. Sci.*, Savoy, v.40, p.1234-1245, 1961.

NAM, G.W. et al. Native feather degradation by *Fervidobacterium islandicum* AW-1 a newly isolating keratinase-producing thermophilic anaerobe. *Archives of Microbiology*, New York, v. 178, p. 538-547, 2002.

NASCIMENTO, A. H. *Determinação do valor nutritivo da farinha de vísceras e da farinha de penas para aves utilizando diferentes metodologias*. 2000, 106 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

NATIONAL RENDERERS. Description of a continuous rendering system, 2006. Disponível em: <http://nationalrenderers.org/assets/flow_charts.pdf>. Acesso em: 27/05/2015.

NELSON, D.L.; COX, M.M. Biossíntese de lipídeos. In: NELSON, D.L.; COX, M.M. *Princípios de bioquímica*. 2 ed. São Paulo: Sarvier, 1995. p.477-5121.

NIR, I. Mecanismos de digestão e absorção de nutrientes durante a primeira semana. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1998, Campinas. *Anais...* Campinas: FACTA, 1998. p. 81-91.

NUNES, R.V.; POZZA, P.C.; NUNES, C.G.V.; CAMPESTRINI, E. ; KÜHL, R.; ROCHA, L.D. DA; COSTA, F.G.P. Valores Energéticos de Subprodutos de Origem Animal para Aves. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.34, n.4, p.1217- 1224, 2005.

ODETALLAH, N. H., J. J. WANG, J. D. GARLICH, AND J. C. H. SHIH. Versazyme supplementation of broiler diets improves market growth performance. *Poult. Sci.* v. 84, p. 858–864, 2005.

OLIVO, R., SANTOS, M.N., FRANCO, F.O. Carne de frango e nutrição. In: OLIVO, R. O mundo do frango: cadeia produtiva da carne de frango. Criciúma: do Autor, 2006. cap.55, p.655-663.

ONIFADE, A. A.; AL-SANE, N. A.; AL-MUSALLAM, A. A.; AL-ZARBAN, S. A review: potentials for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources. *Bioresource Technology*, Oxford, v. 66, p. 1-11, 1998.

OYARZABAL, O. A. Medidas para controle de patógenos no abatedouro, In: VIII SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA, 2007, Chapecó. *Anais...* Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2007.

PAPADOPOULOS, M. C.; EL BOUSHY, A. R.; ROODBEEN, A. E.; KETELAARS, E. H. Effect of processing time and moisture content on amino acid composition and nitrogen characteristics of feather meal. *Anim. Feed Sci. Technol.*, v.14, p. 279-290, 1986.

PARRY, D.A.D.; NORTH, A.C.T. Hard α -keratin intermediate filament chains: substructure of the N- and C-terminal domains and the predicted structure and function of the C-terminal domains of type I and type II chains. *Journal of Structural Biology*, San Diego, v. 122, p. 67-75, 1998.

PEIXOTO, R.R.; MAIER, J.C. *Nutrição e alimentação animal*. 2. ed. Pelotas: EDUCAT, 1993. 169 p.

PELUZIO M.CG, BATISTA ES. Proteínas. In: Costa NMB, Peluzio MCG. Nutrição Básica e Metabolismo. Viçosa: Editora UFV; 2008. p. 120- 154
PENZ JR., A.M. Digestão e absorção de proteínas e aminoácidos. In: FISILOGIA DA DIGESTÃO E ABSORÇÃO DAS AVES, 1994, Campinas. *Anais...* Campinas: APINCO, 1994. p.59-69.

PILLAI P., ARCHANA G., Hide depilation and feather disintegration studies with keratinolytic serine protease from a novel *Bacillus subtilis* isolate, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 78, p. 643-650, 2008.

PLÁCIDO, R. G. Extração, Caracterização e Uso da Queratina de Penas de Frango para a Obtenção de Filmes Biodegradáveis. Florianópolis-SC, 2007. 128 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

POOLE, A.J.; CHURCH, J.S.; HUSON, M.G. Environmentally sustainable fibers from regenerated protein. *Biomacromolecules*, Washington, v. 10, p. 1-8, 2009.

PORTAL EDUCAÇÃO UOL. Disponível em: <<http://educacao.uol.com.br/planos-deaula/medio/biologia-aves.htm>> Acessado em: 28/05/2015

PRAKASH, P.; JAYALAKSHMI, S.K.; SREERAMULU, K. Production of keratinase by free and immobilized cells of *Bacillus halodurans* strain PPKS-2: partial characterization and its application in feather degradation and dehairing of the goat skin. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Totowa, v. 160, p. 1909-1920, 2010.

PROKOP, W. H. Food and agricultural industry. In: BUONICORE, A. J.; DAVIS, W. T. Air pollution engineering manual. New York: Van Nostrand Reinhold, 1992. p.554- 570.

QIN, L.M.; DEKIO, S.; JIDOI, J. Some biochemical characteristics of a partially purified extracellular keratinase from *Trichophyton schoenleinii*. *The Journal of Dermatology*, Tokio, v. 277, p. 236-244, 1992.

RAMNANI P., SINGH R., GUPTA R., Keratinolytic potential of *Bacillus licheniformis* RG1: structural and Biochemical mechanism of feather degradation. *Can. J. Microbiol.*, vol 51, pp 191-196, 2005.

RAMNANI, P.; GUPTA, R. Keratinases vis-à-vis conventional proteases and feather degradation. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, New York, v. 23, p. 1537-1540, 2007.

RAO, B. et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Washington, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.

RIFFEL, A.; BRANDELLI, A. Keratinolytic bacteria isolated from feather waste. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, v. 37, p. 395-399, 2006.

ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; DONZELE, J. L.; et al. *Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos: Composição de alimentos e exigências nutricionais*. Viçosa: UFV, 2005. 141 p.

ROTTER, B. A. The future of crude enzyme supplements in pig nutrition. *Pig News Information*. v. 11, n. 1, p. 15-17, 1990.

SANTOS, A. L. S.; GOMES, A. V. C.; PESSÔA, M. F.; MOSTAFÁ, S.; CURVELLO, F. A. Níveis de inclusão de farinha de penas na dieta sobre o desempenho e características de carcaça de codornas para corte. *Acta Scientiarum Animal Science*. Maringá, v.28, p.27-30, 2006.

SARTORI, J. R. et al. Enzimas e simbióticos para frangos de corte criados no sistema convencional e alternativo. *Cienc. Rural*, v. 37, n.1, p. 235-240, 2007.

SCAPIM, M. R. S; LOURES, E. G.; ROSTAGNO, H. S.; CECON, P. R.; SCAPIM, C. A. Avaliação nutricional da farinha de penas e de sangue para frangos de corte submetida a diferentes tratamentos térmicos. *Acta Sci. Anim. Sci.*, v.25, n.1, p. 91-98, 2003.

SCHEUERMANN, G. N.; ROSA, P. S.; BELLAVAR, C. Farinhas de origem animal: vantagens e limitações do seu uso na alimentação de monogástricos. In: SIMPÓSIO CATARINENSE DE NUTRIÇÃO ANIMAL, 2., 2007. Chapecó. *Anais...* Chapecó: UDESC, 2007. p. 17.

SCHROOYEN, P. M. M.; DIJKSTRA, P.J; OBERTHÜR, R.C; BANTJES, A; FEIJEN, J. Carboxymethylated feather keratins. 2. Thermal and mechanical properties of films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 49, p. 221-230, 2001.

SCHROOYEN, P. M. M.; DIJKSTRA, P. J.; OBERTHÜR, R.; BANTJES, A.; FEIJEN, J. Partially carboxymethylated feather keratins. 1. properties in aqueous systems. *Journal Agricultural Food Chemical*, v. 48, p. 4326-4334, 2000.

SHRINIVAS D., NAIK G.R. Characterization of alkaline thermostable keratinolytic protease from thermoalkaliphilic *Bacillus halodurans* JB 99 exhibiting dehairing activity. *Int. Biodeter. Biodegrad.* v. 65, p. 29–35, 2011.

SINHORINI, M. R; AGUIAR, W; PIASSON A.; VIVIAM, F.: DALMORA, J. V.; Manual de Boas Práticas de Fabricação de Farinhas e Óleos de Origem Animal. 1. ed. Enéas Marques, 253 p. 2009.

SINHORINI, M. R. Processo de produção de farinha de penas hidrolisadas: estudos de otimização do teor protéico e do valor de digestibilidade da proteína. 2013. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, Londrina.

STRADA, E.S.O.; ABREU, R.D.; OLIVEIRA, G.J.C.; COSTA, M.C.M.M. et al. Uso de enzimas na alimentação de frangos de corte. *Rev. Bras. Zootec.*, v. 34, n. 6, p. 2369-2375, 2005.

SUNTORNUSUK W., TONGJUN J., ONNIM P., OYAMA H., RATANAKANOKCHAI K., KUSAMRAN T., ODA K. Purification and characterisation of keratinase from a thermotolerant feather- degrading bacterium, *World J Microbiol Biotechnol*, n.21, p.1111-1117, 2005.

TAMILMANI P., UMAMAHESWARI A., VINAYAGAMI A., B. PRAKASH, Production of an Extra Cellular Feather Degrading Enzyme by *Bacillus licheniformis* Isolated from Poultry Farm Soil in Namakkal District (Tamilnadu). *Intern. Jour. Poult. Scie.* v.7, n.2, p.184-188, 2008.

TESSARI, ENC; CARDOSO, ALSP; KANASHIRO, AMI; STOPPA, GFZ; LUCIANO RL;

CASTRO AGM. Ocorrência de Salmonella spp. em carcaças de frangos industrialmente processadas, procedentes de explorações industriais do Estado de São Paulo, Brasil. *Ciência Rural*, v. 38, n. 9, p. 2557-8478, 2008.

THE BSE INQUIRY. Industry process and controls: manufacturing of rendering. The BSE Inquiry: The Report. Uk, 2001. Disponível em: <<http://www.dseinquiry.bov.uk>>. Acesso em 30 de maio de 2015.

THYS R.C.S., BRANDELLI A., Purification and properties of a keratinolytic metalloprotease from *Microbacterium* sp. *Jour. of Appl. Microb.*, n.101, p.1259 – 1268, 2006.

UNESP - Instituto de Biociências. Disponível em: <http://www2.ibb.unesp.br/Museu_Escola/Ensino_Fundamental/Animais_JD_Botanico/aves/aves_biologia_geral_penas.htma> Acessado em: 28/05/2015.

UNI, Z.; GANOT, S.; SKALAN, D. Posthatch development of mucosal function in the broiler small intestine. *Poult Sci.*, v.77, n.1, p. 75-82, 1998.

USEPA. Meat Rendering Plants. In Emission factor documentation for AP-42 section 9.5.3, EPA contract n 68-D2-0159, Midwest research Institute, Kansas City, MO, set. 1995. Disponível em:<<http://www.epa.gov>>. Acesso em 30 de maio de 2015.

WANG, X.; PARSONS, C. M. Effect of processing systems on protein quality of feather meals and hog hair meals. *Poult Sci.*, v. 76, n. 3. p. 491-496, 1997.

ZANELLA, I.; SAKAMURA N.K.; SILVERSIDES, F.G. Effect of enzyme supplementation of broiler diets based on corn and soybeans. *Poultry Science*, v.78, p.561-568, 1999.

ZOTESSO, F. Efeito de diferentes níveis proteicos e inclusões de protease sobre o desempenho de frangos de corte. 2015. Dissertação (Mestrado em Qualidade e Produtividade Animal) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos/USP.

CAPÍTULO III

EFEITO DO USO DE PROTEASE EM DIETAS COM FARINHA DE PENA PARA FRANGOS DE CORTE SOBRE O COEFICIENTE DE METABOLIZABILIDADE, DESEMPENHO, RENDIMENTO DE CARCAÇA E ANÁLISE ENZIMÁTICA

C. F. Q. Matias^{1*}; J. S. R. Rocha¹; P. C. Cardeal¹; D. P. Vaz¹; T.S.M. Carvalho¹; M. M. Saldanha¹; M. V. Triginelli¹; L. M. M. Amaral¹; N. C. Baião²; L. J. C. Lara²

¹Aluno de Pós-Graduação da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Brasil

²Professor da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Brasil

*e-mail: christianematias@gmail.com

RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito da adição de enzima protease (produzida pelo *Bacillus licheniformis* cepa PWD-1) e o efeito da valorização da matriz nutricional da enzima em dietas para frangos de corte contendo farinha de penas sobre a metabolizabilidade dos nutrientes, desempenho, rendimento de carcaça e cortes e produção enzimática. Foram utilizados quatro tratamentos com seis repetições cada. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x2 (com e sem adição da enzima protease X com e sem valorização da matriz nutricional da enzima) na fase inicial. Contudo, na fase de crescimento foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado em arranjo simples com três tratamentos. Avaliou-se o coeficiente de metabolizabilidade da matéria seca (CMMS), proteína bruta (CMPB) e extrato etéreo (CMEE) na fase inicial e crescimento. Observou-se, na fase inicial, maior CMMS e CMPB ($P \leq 0,05$) para as aves que, independente da adição ou não da enzima, consumiram ração com valorização da matriz nutricional da enzima. Foi observado também, que independente da valorização, as aves que consumiram ração sem protease apresentaram maior CMEE ($P \leq 0,05$). Na fase de crescimento, não houve diferença significativa ($P > 0,05$) para os tratamentos avaliados. O desempenho dos frangos de corte foi avaliado na fase inicial e na fase de crescimento e o rendimento de carcaça e cortes aos 38 dias de idade. O consumo de ração não foi influenciado ($P > 0,05$) pelos tratamentos em nenhuma das fases avaliadas. Na fase inicial, nenhuma das variáveis de desempenho foi influenciada pelos tratamentos. Na fase de crescimento, o melhor resultado para GP ($P \leq 0,05$) foi o tratamento *on top*. Os tratamentos não

influenciaram ($P>0,05$) o rendimento de carcaça e cortes. As análises enzimáticas foram realizadas aos 14 e aos 35 dias de idade. Aos 14 dias, os tratamentos com enzima obtiveram menores valores de concentração de proteínas totais, tripsina e quimotripsina. Aos 35 dias, a concentração de proteínas totais se apresentou maior no tratamento controle negativo. Os melhores resultados para metabolizabilidade da proteína bruta e extrato etéreo foram obtidos utilizando-se dietas valorizadas e com inclusão de enzima. A adição de enzima sem valorização melhora o ganho de peso de frangos de corte de um a 35 dias de idade, sem efeito sobre o rendimento de cortes. A valorização nutricional recomendada para a protease parece ser excessiva nas dietas comerciais para frangos de corte.

Palavras chave: desempenho, metabolizabilidade, protease, farinha de pena, frangos de corte

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o aumento do custo do farelo de soja, utilizado como fonte protéica, tem levado a uma busca por matérias-primas alternativas. Com isso, a inclusão de proteases exógenas promove vantagens econômicas, pois melhora o aproveitamento, por meio da hidrólise química, de alguns tipos de proteínas que resistem ao processo digestivo, tal como a queratina presente na farinha de penas (McCleary, 2001; Torres et al., 2003).

As proteases melhoram o desempenho e rendimento de carcaça de frangos, sendo seus efeitos mais pronunciados quando as dietas são formuladas com baixos níveis de aminoácidos essenciais ou de proteína total, de forma a minimizar as excreções de nitrogênio (Wang et al., 2006). Outra vantagem é que a suplementação com enzimas digestivas exógenas pode levar a uma redução na síntese de enzimas endógenas e, portanto, disponibilizar mais aminoácidos para síntese protéica. Observou-se redução da produção endógena das enzimas amilase, tripsina e quimotripsina em frangos de corte de duas semanas de idade suplementados com estas enzimas exógenas, este resultado indica que provavelmente a secreção de enzimas pancreáticas seja afetada pela concentração de enzimas no intestino delgado e/ou substratos ou produtos de hidrólise (Nir, 1998). No entanto, os efeitos da suplementação dependem de muitos fatores, tais como a idade da ave, tipo de dieta, e a dose de enzima (Bedford, 2000; Acamovic, 2001; Cowieson, 2005).

Objetivou-se com o presente estudo investigar a relação e os efeitos da utilização de enzima exógena (protease), bem como a valorização da matriz nutricional desta enzima, em

dietas para frangos de corte contendo farinha de penas sobre o coeficiente de metabolizabilidade, desempenho, rendimento de carcaça e atividade enzimática.

3.1 MATERIAL E MÉTODOS

3.1.1 Condições experimentais

Pintos Cobb500[®] machos, de um dia (n=768), foram obtidos de um incubatório local e distribuídos em boxes de um galpão convencional. Trinta e dois pintos foram alojados em cada um dos 24 boxes (14 frangos/m²). A cama utilizada foi de cepilho de madeira e cada box foi equipado com bebedouro pendular e comedouro tubular, fornecendo acesso *ad libitum* a água e alimento durante o experimento. O programa de luz foi de 24h de luz nos primeiros 14 dias de idade e iluminação natural após esse período.

As dietas foram a base de milho e farelo de soja e formuladas para o período inicial (um a 18 dias) e de crescimento (19 a 35 dias). Para a formulação das dietas, foram considerados os níveis nutricionais das matérias-primas de acordo com Rostagno et al. (2011). A composição das dietas iniciais e de crescimento estão apresentadas na Tabela 1 e 2, respectivamente. As mesmas aves foram utilizadas na fase inicial e na fase de crescimento.

A inclusão da protease foi de 250g/t, de acordo com as recomendações do fabricante. A matriz nutricional da enzima foi seguida conforme recomendação do fabricante e encontra-se descrita na Tabela 3. Todas as dietas continham farinha de penas, sendo que os níveis de inclusão de farinha de penas foram: 2% e 3% para a fase inicial e de crescimento, respectivamente.

A execução deste estudo foi aprovada pelo Comitê de Ética e Princípios de Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA/UFMG – nº. 437 / 2015).

Tabela 1. Composição das dietas na fase inicial (um a 18 dias de idade das aves)

Ingredientes (%)	INICIAL			
	CONTROLE	CONTROLE NEGATIVO	USO COMERCIAL	ON TOP
	Sem enzima	Sem enzima com valorização	Enzima com valorização	Enzima sem valorização
Milho	61,75	65,11	65,09	61,73
Farelo de soja (45% PB)	27,30	24,91	24,91	27,30
Farinha de carne/ossos (40% PB)	5,78	5,81	5,81	5,78
Farinha de penas	2,00	2,00	2,00	2,00
Óleo degomado de soja	1,57	0,57	0,57	1,57
Calcário	0,21	0,21	0,21	0,21
Sal	0,32	0,32	0,32	0,32
Suplemento mineral e vitamínico ¹	0,40	0,40	0,40	0,40
DL-Metionina (98%)	0,32	0,31	0,31	0,32
L-Lisina HCL (98%)	0,29	0,31	0,31	0,29
L-Treonina	0,06	0,06	0,06	0,06
Protease ²	-	-	0,025	0,025
Total	100	100	100	100
Níveis nutricionais				
EM, kcal/kg	3,000	2,972	3,000	3,028
Proteína bruta, %	22,00	21,19	22,00	22,81
Extrato etéreo, %	5,018	4,109	4,108	5,017
Cálcio, %	0,950	0,950	0,950	0,950
P disp, %	0,480	0,480	0,480	0,480
Sódio, %	0,150	0,190	0,190	0,190
Lisina dig. aves, %	1,180	1,142	1,180	1,218
Metionina dig. aves, %	0,591	0,573	0,583	0,602
Met+Cis dig. aves, %	0,880	0,880	0,880	0,908
Treonina dig. aves, %	0,770	0,735	0,770	0,805
Triptofano dig. aves, %	0,204	0,2027	0,203	0,215

¹Suplemento Vitamínico Mineral Cada 1,0 kg contém: Vit. A 3.500.000 UI, Vit. D3 625.000 UI, Vit. E 6.250 mg, Vit.K3 750 mg, Vit.B1 500 mg, Vit.B2 1.250 mg, Vit.B6 1.000 mg, Vit. B12 6.250 mcg, Biotina 25 mg, Niacina 8.750 mg, Ácido Fólico 250 mg, Ácido Pantotênico 3.000 mg, Selênio 45 mg, Iodo 175 mg, Ferro 12.525 mg, Cobre 2.500 mg, Manganês 19.500, Zinco 13.750 mg, Halquinol 7.500 mg, Salinomicina 16,5g.

²Cibenza DP100

Tabela 2. Composição das dietas na fase crescimento (19 a 38 dias de idade das aves)

Ingredientes (%)	Crescimento		
	CONTROLE NEGATIVO	USO COMERCIAL	ON TOP
	Sem enzima com valorização	Enzima com valorização	Enzima sem valorização
Milho	69,80	69,77	66,40
Farelo de soja (45% PB)	18,93	18,93	21,35
Farinha de carne/ossos (40% PB)	5,37	5,37	5,33
Farinha de pena	3,00	3,00	3,00
Óleo degomado de soja	1,79	1,79	2,79
Sal	0,32	0,32	0,32
Suplemento mineral e vitamínico ¹	0,40	0,40	0,40
DL-Metionina (98%)	0,16	0,16	0,17
L-Lisina HCL (98%)	0,18	0,18	0,16
Cloreto de colina (60%)	0,05	0,05	0,05
Protease ²	-	0,025	0,025
Total	100	100	100
Níveis nutricionais			
EM, kcal/kg	3,122	3,150	3,178
Proteína bruta, %	19,19	20,00	20,81
Extrato etéreo, %	5,429	5,428	6,336
Cálcio, %	0,800	0,800	0,800
P disp, %	0,447	0,447	0,447
Sódio, %	0,190	0,190	0,190
Lisina dig. aves, %	0,912	0,950	0,988
Metionina dig. aves, %	0,406	0,417	0,435
Met + Cis dig. aves, %	0,712	0,740	0,767
Treonina dig. aves, %	0,632	0,666	0,696
Triptofano dig. aves, %	0,167	0,178	0,190

¹Suplemento Vitamínico Mineral Cada 1,0 kg contém: Vit. A 3.500.000 UI, Vit. D3 625.000 UI, Vit. E 6.250 mg, Vit.K3 750 mg, Vit.B1 500 mg, Vit.B2 1.250 mg, Vit.B6 1.000 mg, Vit. B12 6.250 mcg, Biotina 25 mg, Niacina 8.750 mg, Ácido Fólico 250 mg, Ácido Pantotênico 3.000 mg, Selênio 45 mg, Iodo 175 mg, Ferro 12.525 mg, Cobre 2.500 mg, Manganês 19.500, Zinco 13.750 mg, Halquinol 7.500 mg, Salinomicina 16,5g.

²Cibenza DP100

Tabela 3. Matriz nutricional da enzima protease, utilizada para a valorização na formulação das rações na fase inicial e de crescimento

	Matriz 250g/t	Contribuição Nutricional
Proteína	3265%	0,816%
EM (kcal/kg)	115.700	28,92
Lisina dig.	153%	0,038%
Metionina dig.	43%	0,011%
Met + Cis dig.	111%	0,028%
Treonina dig.	140%	0,035%
Arginina dig.	222%	0,055%
Valina dig.	130%	0,033%
Triptofano dig.	44%	0,011%
Isoleucina dig.	121%	0,030%
Leucina dig.	261%	0,065%

3.1.2 Tratamentos

Os tratamentos foram definidos pela inclusão da enzima protease (com e sem) e valorização ou não da matriz nutricional da enzima:

FASE INICIAL:

- Controle: dieta sem protease, sem valorização;
- Controle negativo: dieta sem protease com valorização de energia e proteína bruta;
- Uso comercial: dieta com protease, com valorização nutricional de energia e proteína bruta;
- *On top*: dieta com protease, sem valorização.

FASE DE CRESCIMENTO*:

- Controle negativo: dieta sem protease, com valorização de energia e proteína bruta;
- Uso comercial: dieta com protease, com valorização nutricional de energia e proteína bruta;
- *On top*: dieta com protease, sem valorização.

*O tratamento controle foi retirado da fase de crescimento em função de uma falha na fabricação da ração e seu efeito no consumo das aves.

3.1.3 Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente ao acaso, em arranjo fatorial 2 x 2 (com e sem inclusão da enzima x com e sem valorização da matriz nutricional) na fase inicial, sendo composto por quatro tratamentos: controle, controle negativo, uso comercial e *on top*. Na fase de crescimento utilizou-se o delineamento inteiramente ao acaso em arranjo simples sendo composto por três tratamentos: controle negativo, uso comercial e *on top*. Para avaliar o desempenho foram utilizadas seis repetições, sendo cada repetição composta de 32 aves. Para avaliar a metabolizabilidade dos nutrientes utilizou-se seis repetições sendo cada repetição composta de 12 aves. Para a avaliação da atividade enzimática e rendimento de carcaça foram utilizadas seis repetições sendo cada repetição composta por duas aves.

3.1.4 Metabolizabilidade dos nutrientes

O ensaio de metabolismo para a determinação da metabolizabilidade dos nutrientes foi realizado pelo método tradicional de coleta total de excretas no Laboratório de Metabolismo Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Um total de 288 frangos de corte, machos, Cobb 500®, de um dia de idade, foram distribuídos em quatro tratamentos, com seis repetições e 12 aves por repetição. As aves foram alojadas em gaiolas metabólicas de 1 m². O programa de luz foi de 24 horas de luz até os 14 dias e luz natural até o período final de criação.

As análises de metabolizabilidade da matéria seca e proteína bruta foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal da UFMG e as análises para determinação de extrato etéreo no Laboratório CBO, Campinas.

As coletas de excretas foram realizadas em dois momentos. Na primeira fase dos nove aos 12 dias e a segunda fase dos 23 aos 26 dias de idade das aves. A ração oferecida foi pesada no início e no final do período de coleta para obtenção do consumo de ração no período. As excretas foram coletadas duas vezes ao dia, pesadas e colocadas em sacos plásticos devidamente identificados e armazenados em câmara de congelamento (-15°C).

Posteriormente, as excretas coletadas durante os quatro dias foram descongeladas a temperatura ambiente, homogeneizadas, amostradas, pesadas e colocadas em estufa com circulação de ar forçada a 55°C por 72 horas para pré-secagem. Após a pré-secagem, o material foi exposto à temperatura ambiente por uma hora e novamente pesado para obtenção da matéria pré-seca. Em seguida, o material foi moído em moinho tipo faca com peneira de um milímetro.

Foram feitas análises laboratoriais para determinação da matéria seca, proteína bruta e

extrato etéreo de acordo com a metodologia AOAC (2012). A determinação do teor do extrato etéreo nas excretas foi feita por meio da extração com solvente éter etílico, sendo que, previamente, foi realizada hidrólise ácida. Para tal procedimento, foi pesado cerca de 2,5g de amostra e transferiu-se para dentro de um Erlenmeyer de 500ml. Adicionou-se 125ml de HCL 3N e levou-se à ebulição por 30 minutos. Em seguida, o material foi filtrado em bomba de vácuo com papel filtro qualitativo, lavado com água destilada, seco por 30 minutos em estufa de circulação a 55°C, novamente embalado em papel de filtro qualitativo e só então, o material foi colocado no extrator de lipídeos do tipo *Soxhlet* (Compêndio brasileiro de alimentação animal, 2009).

As rações também foram analisadas para determinação de matéria seca, proteína bruta e extrato etéreo.

A partir dos dados de consumo de ração, produção de excretas e dos resultados das análises de laboratório, foram calculados os coeficientes de metabolizabilidade aparente da matéria seca (CMMS), da proteína bruta (CMPB) e do extrato etéreo (CMEE), conforme a fórmula:

$$\text{Metabolizabilidade dos nutrientes (\%)} = \frac{\text{nutriente ingerido (g)} - \text{nutriente das excretas (g)}}{\text{nutriente ingerido (g)}} \times 100$$

3.1.5 Desempenho

Os frangos, a ração oferecida e as sobras das rações foram pesadas, semanalmente e ao final de cada fase, durante todo o período experimental, para avaliar o desempenho (consumo de ração, peso corporal e conversão alimentar). Esses dados foram utilizados para calcular os valores acumulados de um a 18 dias de idade e de 19 a 35 dias de idade. A mortalidade foi registrada diariamente e usada para ajustar a conversão alimentar, obtida pelo consumo de ração: ganho de peso. O índice de eficiência produtiva (IEP) foi calculado conforme a fórmula:

$$\text{IEP (\%)} = \frac{\text{ganho de peso diário (kg)} - \text{viabilidade (\%)}}{\text{conversão alimentar (g)}} \times 100$$

3.1.6 Rendimento de carcaça e cortes

O rendimento de carcaça foi avaliado aos 38 dias de idade, quando foram abatidas 48 aves do total das 768 aves alojadas. Esta amostra foi proveniente de animais apanhados

aleatoriamente em cada box, sendo abatidas 12 aves por tratamento. Os frangos foram submetidos a jejum de ração de oito horas e após a identificação individual foram pesados. O abate foi realizado no abatedouro da empresa Granja Brasília Agroindustrial Avícola, localizado no município de Ibitité. Os procedimentos de abate foram os mesmos adotados em um abatedouro industrial, de acordo com as normas do SIF.

Para avaliação do rendimento de carcaça, foi considerado o peso da carcaça limpa eviscerada (sem pés, cabeça e pescoço) em relação ao peso vivo em jejum obtido antes do abate. Para avaliação dos cortes (coxa + sobrecoxa, peito, dorso, asa) os rendimentos foram obtidos considerando-se a relação ao peso da carcaça eviscerada.

3.1.7 Análise enzimática para determinação da atividade de tripsina, quimotripsina, e concentração de proteínas das amostras de pâncreas

As análises para determinação da concentração de proteínas totais, tripsina e quimotripsina pancreáticas, foram realizadas no Departamento de Tecnologia - Laboratório de Enzimologia da UNESP, Campus de Jaboticabal.

a) Obtenção do extrato bruto

Aos 14 e 35 dias de idade, dois animais por repetição foram separados aleatoriamente e mantidos em jejum de ração. Após o jejum, as aves foram abatidas por deslocamento cervical. Logo após o sacrifício, a cavidade abdominal foi aberta, o pâncreas retirado inteiro, identificado e imediatamente congelado em nitrogênio líquido. Depois, foi transferido para ultra-freezer e mantido a -80°C até a análise das amostras. Os pâncreas de cada repetição foram homogeneizados separadamente em homogeneizador tipo Turrax, marca OMNI, modelo GLH-2511, em tampão Tris-HCl pH 8,0 contendo CaCl_2 50mM a proporção de 1grama de tecido para 10ml de tampão. Depois as amostras foram centrifugadas a 10000 g, por 10 minutos a 4°C . Em seguida o sobrenadante foi dividido em três alíquotas de 200 μm em cada para cada tipo de análise, congelados em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C (Souza, 2008). Posteriormente as alíquotas foram utilizadas para determinação das atividades da tripsina e quimotripsina e dosagem de proteínas presentes no extrato.

b) Determinação da atividade de tripsina pancreática

A atividade da tripsina foi determinada pelo método descrito por Kakade et al. (1974). Primeiramente, foi efetuada a ativação do zimogênio em tampão Tris-HCl 0,5M pH 8,2 contendo CaCl₂ (50mM). Cada dosagem de 0,4 ml do extrato pancreático foi incubada com 0,08 unidades de enteroquinase (SIGMA®) a 37°C por 10 minutos. A reação sempre foi iniciada pela adição de 1ml do substrato N-benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (BAPNA, SIGMA®) ao meio de reação contendo o extrato ativado. Depois de 10 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 0,2 ml de ácido acético 30% (v/v). Após centrifugação em microcentrífuga SPIN I durante 2 minutos a 4°C, a absorbância foi determinada a 410nm.

Em cada determinação foram incluídos controles sem adição de enzimas. Uma unidade de atividade enzimática (U/mg) foi definida e expressa como a quantidade de enzima que libera 1 nmol de p-nitroanilida por minuto por miligrama de proteína nas condições padrões do teste.

c) Determinação da atividade da quimotripsina pancreática

A atividade de quimotripsina foi determinada segundo Lima et al. (2003), a 37°C. A ativação do quimotripsinogênio foi efetuada como descrito para o tripsinogênio, em tampão Tris-HCl 0,2M contendo CaCl₂ 0.05M, pH 7,6.

A reação foi iniciada pela adição de 0,3 ml do substrato glutaril-L-fenilalanina-4-nitroanilida (GAPNA), ao meio de reação. Após 10 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 0,2 ml de ácido acético 30% (v/v).

Após centrifugação em microcentrífuga SPIN I durante 2 minutos a 4°C, a absorbância foi determinada a 410nm. Em cada determinação foram incluídos controles sem adição de enzimas. Uma unidade de atividade enzimática (U/mg) foi definida e expressa como a quantidade de enzima que libera 1 nmol de p-nitroanilida por minuto por miligrama de proteína nas condições padrões do teste.

d) Dosagem da concentração de proteínas nas amostras

As concentrações de proteínas do extrato bruto de pâncreas foram determinadas de acordo com o método descrito por Hartree (1972), utilizando-se soroalbumina bovina (BSA) fração V como padrão proteico.

3.1.8 Análises estatísticas

Os dados foram submetidos a ANOVA, foi utilizado DIC em arranjo fatorial na fase inicial e DIC em arranjo simples na fase de crescimento. Todas as possíveis interações dentro e entre os principais efeitos foram avaliados usando o programa SAS (SAS Institute, 2012), quando significativas, as médias dos dados normais foram comparadas pelo teste de Tukey. Os dados não normais e que não foram possíveis de serem analisados transformados foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis, utilizando o mesmo programa. Os parâmetros de significância utilizados foram baseados em $p \leq 0,05$.

3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.2.1 Metabolizabilidade - Fase inicial (coleta: nove a 12 dias de idade)

Os resultados para coeficiente de metabolizabilidade de matéria seca (CMMS), coeficiente de metabolizabilidade de proteína bruta (CMPB) e coeficiente de metabolizabilidade de extrato etéreo (CMEE), na fase inicial, estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Efeito da protease e da valorização nas dietas para frangos de corte na fase inicial sobre coeficiente de metabolizabilidade da matéria seca (CMMS), coeficiente de metabolizabilidade da proteína bruta (CMPB) e coeficiente de metabolizabilidade do extrato etéreo (CMEE)

Tratamentos	Inicial		
	CMMS	CMPB	CMEE
Enzima			
Sem	78,35	61,18	83,15 ^a
Com	77,35	60,45	77,16B
Valorização			
Sem	76,78B	59,19B	79,31
Com	78,92 ^a	62,43 ^a	81,00
ANOVA			
Enzima	NS	NS	0,000
Valorização	0,001	0,014	NS
Enzima x Valorização	NS	NS	NS
CV (%)	1,7	4,7	3,2

NS: Não significativo

Médias seguidas por letras distintas, diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Na fase inicial, não houve interação entre enzima e valorização da matriz nutricional da enzima para as variáveis CMMS, CMPB e CMEE (Tabela 4). Não ocorreu efeito da enzima sobre o CMMS e CMPB ($P > 0,05$), assim aves alimentadas com adição de enzima na ração apresentaram resultados de metabolizabilidade semelhantes quando comparadas com aves alimentadas sem adição de enzima na ração (Tabela 4). Portanto, as alterações nutricionais provocadas pelos tratamentos não foram suficientes para alterar o CMMS e CMPB na fase inicial.

De acordo com Glitso et al. (2012), o benefício mais evidente com relação a inclusão de protease nas dietas de frangos de corte é o aumento na digestibilidade da proteína de diversos ingredientes. A melhoria no aproveitamento da proteína da dieta, obtida pela adição da enzima, oferece a possibilidade de redução na inclusão de matérias-primas, como o farelo de soja, que representa custo significativo na formulação das dietas. Contudo, neste estudo não foi verificado efeito de enzima sobre o CMPB.

Foi observado efeito negativo da utilização da enzima protease sobre o CMEE. As aves que receberam os tratamentos sem adição de enzima apresentaram melhor resultado de CMEE ($P \leq 0,05$), quando comparadas com as aves que receberam suplementação enzimática (Tabela 4). Tal fato, demonstra que a suplementação enzimática não foi suficiente para proporcionar melhoria da utilização dos nutrientes. Contudo, apesar do efeito negativo da inclusão de enzima sobre o CMEE o desempenho das aves na fase inicial não foi afetado (Tabela 6).

Independente da adição de enzima, os frangos de corte que consumiram ração com valorização da matriz nutricional apresentaram maior ($P \leq 0,05$) CMMS e CMPB (Tabela 5). Aves alimentadas com dietas com valorização apresentaram melhores resultados de CMMS e CMPB ($P \leq 0,05$), quando comparadas com as aves que receberam dietas sem valorização. Segundo Bonnet et al. (1997), na termoneutralidade, qualquer tipo de restrição alimentar tende a melhorar a metabolizabilidade da proteína, gordura e amido, independentemente da dieta utilizada. Essa tendência também foi relatada a um nível inferior da restrição alimentar por Lessire et al. (1990). Esse fato foi observado no presente estudo, uma vez que o CMMS e CMPB melhoraram ($P \leq 0,05$) nas dietas com redução nos níveis nutricionais, independente da adição de enzima (Tabela 4). De forma semelhante, Matias (2012) observou melhoria no CMPB em dietas valorizadas, nas quais foram consideradas as valorizações nutricionais da enzima, independente da suplementação enzimática.

O CMEE não foi alterado pela valorização da matriz nutricional da enzima. Independente da adição de enzima aves alimentadas com dietas valorizadas apresentaram resultados semelhantes de CMEE quando comparadas com aves alimentadas com dietas sem valorização.

Portanto, as mudanças nutricionais incitadas pelos tratamentos não foram suficientes para alterar o CMEE na fase inicial.

3.2.2 Metabolizabilidade dos nutrientes - Fase crescimento (coleta: 23 a 26 dias de idade)

Os resultados para coeficiente de metabolizabilidade de matéria seca (CMMS), coeficiente de metabolizabilidade de proteína bruta (CMPB) e coeficiente de metabolizabilidade de extrato etéreo (CMEE), na fase de crescimento, estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Efeito da protease e da valorização nas dietas para frangos de corte, na fase crescimento, sobre coeficiente de metabolizabilidade da matéria seca (CMMS), coeficiente de metabolizabilidade da proteína bruta (CMPB), coeficiente de metabolizabilidade do extrato etéreo (CMEE)

Tratamento	CMMS	CMPB*	CMEE
Controle negativo	77,58	56,44	68,68
Uso comercial	77,03	56,60	68,54
<i>On top</i>	76,51	56,73	67,11
CV(%)	1,4	1,3	7,4
P value	0,302 ^{ns}	*** ns	***ns

*Dados analisados transformados log(coeficiente de proteína bruta)

^{ns}: Não significativo

*** P>0,9

Médias não seguidas por letras são semelhantes entre si pelo teste F (P>0,05).

O CMMS, CMPB e CMEE não foram influenciados ($p>0,05$) pelos tratamentos (Tabela 5). Os tratamentos não foram suficientes para alterar os coeficientes de metabolizabilidade dos nutrientes das rações. Resultados contrários foram encontrados por Angel et al., (2011) que relataram uma melhoria da metabolizabilidade da proteína bruta em dietas suplementadas com níveis crescentes de inclusão de protease para frangos de corte.

3.2.3 Desempenho – Fase inicial (um a 18 dias)

O peso médio inicial das aves foi de 45,5g. Os resultados para consumo de ração (CR), ganho de peso (GP) e taxa de conversão alimentar (CA), na fase inicial, estão apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6. Efeito da protease e da valorização sobre o consumo de ração (CR), ganho de peso (GP) e conversão alimentar (CA) em frangos de corte de um aos 18 dias de idade

Tratamento	CR (kg)	GP (kg)	CA (kg/kg)
Enzima			
Sem	0,877	0,703	1,247
Com	0,862	0,697	1,237
Valorização			
Sem	0,872	0,707	1,233
Com	0,867	0,693	1,250
ANOVA			
Enzima	NS	NS	NS
Valorização	NS	NS	NS
Enzima x Valorização	NS	NS	NS
CV (%)	2,7	2,5	2,7

NS: Não significativo

Não houve interação entre enzima e valorização da matriz nutricional ($P>0,05$) sobre as variáveis de desempenho. Também não ocorreu efeito da enzima sobre CR, GP e CA ($P>0,05$), aves alimentadas com adição de enzima na ração apresentaram resultados de desempenho semelhantes quando comparadas com aves alimentadas sem adição de enzima na ração (Tabela 6).

Independente da adição de enzima aves alimentadas com dietas valorizadas apresentaram resultados semelhantes de CR, GP e CA quando comparadas com aves alimentadas com dietas sem valorização.

Apesar de ter ocorrido melhora no CMMS e CMPB de aves alimentadas com dietas valorizadas, e no CMEE de aves alimentadas com dietas sem inclusão de enzima (Tabela 4), esse benefício não se manifestou no desempenho zootécnico (Tabela 6).

Essas observações corroboram com os resultados encontrados por Freitas et al. (2011) que observaram que a suplementação enzimática com protease em dietas a base de milho, farelo de soja e farinha de carne e ossos, não exerceu influência sobre CR e GP. Os resultados

encontrados de consumo de ração são condizentes com os encontrados por Angel et al. (2011), que não verificaram efeito da adição de diferentes doses de protease sobre o consumo de ração em frangos de corte de sete a 22 dias de idade. De forma semelhante, Zotesso (2015) não observou influência da utilização de protease sobre as variáveis de desempenho de frangos de corte em dietas a base de milho e farelo de soja com inclusão de farinha de penas.

3.2.4 Desempenho – Período total (um a 35 dias)

Os resultados para consumo de ração (CR), ganho de peso (GP) e taxa de conversão alimentar (CA) e índice de eficiência produtiva (IEP) na fase de crescimento, estão apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7. Efeito da protease e da valorização sobre o consumo de ração (CR), ganho de peso (GP), conversão alimentar (CA) e índice de eficiência produtiva (IEP) em frangos de corte de um aos 35 dias de idade

Tratamento	CR (kg)	GP (kg)	CA (kg/kg)	IEP
Controle negativo	3,340	2,182B	1,530B	399,47B
Uso comercial	3,264	2,180B	1,498AB	407,98AB
<i>On top</i>	3,300	2,289 ^a	1,443A	439,58 ^a
CV(%)	2,6	3,0	3,3	5,7
P value	0,331 ^{ns}	0,018	0,028	0,025

^{ns}: Não significativo

Médias seguidas por letras distintas, diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Não houve efeito dos tratamentos sobre o CR ($P > 0,05$). Portanto, as alterações nas rações não foram suficientes para alterar o CR das aves. Igualmente, Garcia et al. (2000), Camiruaga et al. (2001), Fischer et al. (2002) e Strada et al. (2005) também não encontraram efeito da suplementação enzimática sobre o consumo de ração. Entretanto, Abudabos et al. (2012), relataram aumento de consumo ($P \leq 0,05$) nas aves que consumiram dieta com valorização e inclusão de enzima.

Observou-se maior ganho de peso ($P \leq 0,05$) nas aves alimentadas com dieta sem valorização com inclusão de enzima (*on top*) em relação aos demais tratamentos. Indicando um efeito positivo da utilização da enzima sobre o ganho de peso. Nesta fase, ocorreu aumento na

quantidade do substrato (farinha de pena) para atuação da queratinase. Dessa forma, era esperado um benefício mais acentuado do uso da enzima sobre o substrato queratina devido a maior inclusão de farinha de penas nas dietas somado ao efeito positivo da enzima.

Este resultados estão de acordo com os achados de Odetallah et al. (2003) e Matias (2012) que encontraram maior ganho de peso nas aves do tratamento *on top*. Abudabos et al. (2012) também observaram melhoria no ganho de peso com a utilização de enzima em dietas com níveis normais de energia e proteína com inclusão de enzima protease.

A CA nas aves do tratamento *on top* foi significativamente superior ao apresentado pelas aves do tratamento controle negativo, já o controle positivo apresentou resultados intermediários (Tabela 7). Indicando efeito positivo da utilização da enzima, mas indicando também que a valorização utilizada na matriz nutricional indicada pelo fornecedor pode estar excessiva. Esse resultado corrobora com Garcia et al. (2000) e Odetallah et al. (2003) que observaram efeitos positivos da utilização de enzima sobre a CA. Freitas et al. (2011) observaram que as aves dos tratamentos sem valorização da matriz nutricional da enzima apresentaram melhor CA do que as aves do grupo controle negativo. Angel et al. (2011) observaram que aves alimentadas com dietas valorizadas sem enzima ou com inclusão de 100mg/kg de protease apresentaram pior CA quando comparadas com as aves do grupo sem valorização, demonstrando assim um efeito positivo da utilização de protease sobre a CA em inclusões acima de 200mg/kg de ração.

O IEP nas aves do tratamento *on top* foi significativamente superior ($P \leq 0,05$) ao apresentado pelas aves do tratamento controle negativo, e o controle positivo apresentou resultados intermediários (Tabela 7). Indicando efeito positivo da utilização da enzima, mas indicando também que a valorização pode estar excessiva.

3.2.5 Rendimento de carcaça

Os resultados para rendimento de carcaça e cortes (coxa, dorso, peito e asa) em frangos de corte aos 38 dias de idade estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Efeito da protease e da valorização sobre o rendimento de carcaça de frangos de corte aos 38 dias de idade

Tratamento	Carcaça (%)	Coxa + sobrecoxa (%)	Dorso (%)	Peito (%)	Asa (%)
Controle negativo	72,46	26,94	18,22	43,21	11,41
Uso comercial	71,90	29,27	18,73	40,74	11,17
<i>On top</i>	72,33	28,76	19,43	40,42	11,57
CV(%)	1,7	7,0	6,6	6,0	7,6
P value	*** ns	0,157 ^{ns}	0,227 ^{ns}	0,138 ^{ns}	*** ns

^{ns} Não significativo

*** $P > 0,9$

Médias não seguidas por letras são semelhantes entre si pelo teste F ($P > 0,05$).

Não houve influência dos tratamentos sobre o rendimento de carcaça e cortes (Tabela 8). Portanto, as alterações nutricionais nas rações não foram suficientes para alterar as variáveis analisadas. Da mesma forma, Oliveira et al. (2014) ao avaliarem duas formas físicas da ração x duas valorizações x duas inclusões de protease, não observaram influência de nenhuma das variáveis analisadas sobre o rendimento de carcaça.

3.2.6 Análise enzimática

Os resultados para concentração de proteínas totais e atividade enzimática de tripsina e quimotripsina pancreática, aos 14 dias de idade das aves, estão apresentadas na Tabela 9.

Tabela 9. Concentração de proteínas totais (mg/ml) e atividade enzimática de tripsina e quimotripsina pancreática (U/mg de proteína) em frangos de corte aos 14 dias de idade.

Tratamentos	14 DIAS		
	Proteínas totais	Tripsina	Quimotripsina
Enzima			
Sem	3,44A	75,08A	56,11A
Com	2,51B	42,50B	41,03B
Valorização			
Sem	3,16	57,15	47,86
Com	2,79	60,43	49,86
ANOVA			
Enzima	0,001	0,004	0,036
Valorização	NS	NS	NS
Enzima x Valorização	NS	NS	NS
CV (%)	13,31	30,81	26,34

NS: Não significativo

Médias seguidas por letras distintas, diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Não houve interação entre enzima e valorização da matriz nutricional ($P > 0,05$) sobre a concentração de proteínas totais, tripsina e quimotripsina aos 14 dias de idade. A inclusão de enzima teve efeito sobre os tratamentos, os menores valores ($P \leq 0,05$) de concentração de proteínas totais e atividade enzimática de tripsina e quimotripsina foram obtidos a partir de aves alimentadas com dietas contendo protease. Esse resultado sugere a ocorrência de uma resposta fisiológica do animal frente a menor necessidade de secreção endógena de proteases, em decorrência da disponibilidade de enzimas exógenas que suprem parcialmente o processo de digestão de proteínas e peptídeos.

Os resultados encontrados para atividade enzimática estão de acordo com Malagna et al. (1995), que relataram que a suplementação de enzimas exógenas (amilase e protease) até os 14 dias de idade em frangos de corte, reduz a atividade da quimotripsina no pâncreas e a atividade da amilase, tripsina e quimotripsina no intestino delgado.

As variáveis analisadas não foram influenciadas ($P > 0,05$) pela valorização da matriz nutricional da enzima, aves alimentadas com dietas valorizadas apresentaram resultados de concentração de proteínas totais, tripsina e quimotripsina semelhantes quando comparadas com aves alimentadas com dietas sem valorização da matriz nutricional da enzima (Tabela 9).

Os resultados para concentração de proteínas totais e atividade enzimática de tripsina e quimotripsina pancreática, aos 35 dias de idade das aves, estão apresentadas na Tabela 10.

Tabela 10. Concentração de proteínas totais (mg/ml) e atividade enzimática de tripsina e quimotripsina pancreática (U/mg de proteína) em frangos de corte aos 35 dias de idade

Tratamento	Proteínas totais	Tripsina	Quimotripsina
Controle negativo	5,30A	65,55	62,00
Uso comercial	3,81B	54,12	51,80
<i>On top</i>	4,39B	49,83	46,40
CV(%)	8,34	18,29	16,27
P value	0,001	0,139 ^{ns}	0,083 ^{ns}

^{ns} Não significativo

Médias seguidas por letras distintas, diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

A concentração de proteínas totais foi afetada ($P \leq 0,05$) pelos tratamentos. As aves do tratamento controle negativo apresentaram maiores concentrações de proteínas totais, quando comparadas as aves do controle positivo e do tratamento *on top* (Tabela 10). Entretanto, o aumento na concentração de proteínas totais não apresentou relação com a produção de tripsina e quimotripsina, uma vez que não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre os tratamentos para essas variáveis. Portanto, pode-se inferir que a adição de enzima protease e a valorização ou não da matriz nutricional da enzima não afeta a produção de tripsina e quimotripsina em frangos de corte aos 35 dias de idade.

3.3 CONCLUSÕES

Nas condições em que foi realizado o experimento pode-se concluir que: Níveis reduzidos e dietas sem enzima protease melhoram os coeficientes de metabolizabilidade dos nutrientes na fase inicial de frangos de corte. A utilização da enzima sem valorização melhora o ganho de peso de frangos de corte de um a 35 dias de idade, sem efeito sobre o rendimento de cortes. A valorização nutricional recomendada para a protease parece ser excessiva nas dietas comerciais para frangos de corte. Dietas com protease diminuem a concentração de proteínas totais e a atividade enzimática de frangos de corte aos 14 dias de idade.

3. 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUDABOS, A. M.. Effect of enzyme supplementation to normal and low density broiler diets based on corn-soybean meal. Asian journal of animal and veterinary advances, v.7, p.139-148, 2012.

ACAMOVIC, T. Commercial application of enzyme technology for poultry production. Word's. Poult. Sci. J., v. 57: p. 225-243, 2001.

ANGEL, C. R.; SAYLOR, W.; VIEIRA, S. L.; WARD, N. Effects of a monocomponent protease on performance and protein utilization in 7- to 22-day-old broiler chickens. Poult. Sci., v. 90, p. 2281-2286, 2011.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). Official Methods of analysis of AOAC international. 19th ed. Gaithersburg: AOAC, 2012.

BEDFORD, M.R. Exogenous enzymes in monogastric nutrition-their current value and future benefits. Anim. Feed Sci. Technol., v. 86: p. 1-13, 2000.

BONNET, S. GERAERT, P. A., LESSIRE M., CARRE B., GUILLAUMIN S. Effect of high ambient temperature on Feed digestibility in broilers. Poultry science, champaign, v.76, n.6, p.857-863, 1997.

CAMIRUAGA, M.; GARCIA, F.; ELERA, R.; SIMONETTI, C. Respuesta productiva de pollos broilers a la adición de enzimas exógenas a dietas basadas en maíz o titicale. Cien. Inv. Agr., v. 28, n. 1, p. 23–26, 2001.

COMPÊNDIO BRASILEIRO DE ALIMENTAÇÃO ANIMAL, Método N°14 - Determinação de Extrato Etéreo – Método Soxhlet, p. 62 a 64. São Paulo: Sindirações, 2009

COWIESON AJ. Factors that affect the nutritional value of maize for broilers. Anim. Feed. Sci. Tech. v. 119, p. 293–305, 2005.

COWIESON, A.J., ACAMOVIC, T., BEDFORD, M.R. Phytic acid and Phytase: Implications for Protein Utilization by Poultry. *Poult. Sci* v. 85, p. 878-885, 2006.

FISCHER, G., MAIER, J.C., RUTZ, F., BERMUDEZ, V.L. Desempenho de frangos de corte alimentados com dietas à base de milho e farelo de soja, com ou sem adição de enzimas. *Rev. Bras. Zootec.*, v. 31, n. 1, p. 402-410, 2002.

FREITAS, D. M., S. L. VIEIRA, C. R. ANGEL, A. FAVERO, AND A. MAIORKA. Performance and nutrient utilization of broilers fed diets supplemented with a novel mono component protease. *J. Appl. Poult*, v. 20, p. 322-334, 2011.

GARCIA, E. R. M.; MURAKAMI, A. E.; BRANCO, A. F. Suplementação enzimática em dietas contendo farelo de soja e soja integral extrusada e efeitos na digestibilidade dos nutrientes, fluxo ileal da digesta e performance de frangos de corte. *Rev. Bras. Zootec.*, v. 29, n. 5, p. 1414–1426, 2000.

GLITSO, L. V. et al. Catalyzing innovation, development of a feed protease. *Industrial Biotechnology*, v.8, n.4, p.172-175, 2012.

HARTREE, E. E. Determination of protein; A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry*, v. 48, p. 422-427, 1972.

LESSIRE, M. Effect of feeding technique, ad libitum, dry or wet force feeding on the metabolisable energy values of raw materials for poultry. *Br. Poult. Sci.*, v. 31, p. 785–793, 1990.

LIMA A. C. F.; PIZAURO J. M.; MACARI M.; MALHEIROS E. B. Efeito do Uso de Probiótico sobre o Desempenho e Atividade de Enzimas Digestivas de Frangos de Corte. *R. Bras. Zootec.*, v.32, n.1, p.200-207, 2003.

KAKADE, M. L; RACKIS, J. J; McGHEE, J. G; PUSKI, G. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: A collaborative analysis of an improved procedure. *Cereal Chemistry*. v.51, p.376 - 382. 1974.

MALAGNA, M.; NIR, I.; LARBIER, M.; NITSAN, Z. Effect of age and exogenous amylase

and protease on development of the chicks. *Reproduction Nutrition Development*, v.35, n.2, p.201-202, 1995.

MATIAS, C. F. Q. PROTEASE NA ALIMENTAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE. 2012. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

MCCLEARY, B.V. Analysis of feed enzymes. *Enzymes in farm animal nutrition*. County Wicklow, Irish Republic: CAB International, 2001. 406p.

NIR, I. Mecanismos de digestão e absorção de nutrientes durante a primeira semana. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1998, Campinas. Anais... Campinas: FACTA, 1998. p. 81-91.

ODETALLAH, N.H.; WANG, J.J.; GARLICH, J.D.; SHIH, J.C.H. Keratinase in starter diets improves growth of broiler chicks. *Poult. Sci.* v. 82, p. 664–670, 2003.

OLIVEIRA, R. F. ; ARAUJO, C. S. S. ; MURAKAMI, A. A. ; VILELA, J. S. ; GRANGHELLI, C. A. ; KOIYAMA, N. T. G. ; MOTA, P. H. Protease exógena em dietas para frangos de corte. *Novos desafios da pesquisa em nutrição e produção animal*. 1. ed. Pirassununga: 5D, 2014, p. 76-96.

ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; DONZELE, J. L.; et al. Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos. Composição de alimentos e exigências nutricionais. Viçosa: UFV, 2011. 252 p.

SAS. STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. User's guide: statistics. Version 9.3. 4th ed. North Carolina: SAS Inst. INC., 2012

STRADA, E.S.O.; ABREU, R.D.; OLIVEIRA, G.J.C.; COSTA, M.C.M.M. et al. Uso de enzimas na alimentação de frangos de corte. *Rev. Bras. Zootec.*, v. 34, n. 6, p. 2369-2375, 2005.

SOUZA, L.F.A. Exposição crônica e cíclica ao calor em frangos de corte: desempenho, metabolização dos nutrientes e atividade de enzimas pancreáticas. Dissertação de mestrado. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista. 2008.51p.

TORRES, D.M.; TEIXEIRA, A.S.; RODRIGUES, P.B. et al. Eficiência das enzimas amilase, protease e xilanase sobre o desempenho de frangos de corte. *C. Agrot.*, v.27, p.1404-1408, 2003.

WANG, C. T., JI, B. P., LI, B., NOUT, R., LI, P.L., JI, H., & CHEN, L.F. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme of bacillus subtilis dc33, isolated from chinese traditional douchi. *J. Ind. Microb. Biot.*, v.33, p.750-758, 2006.

ZOTESSO, F. Efeito de diferentes níveis proteicos e inclusões de protease sobre o desempenho de frangos de corte. 2015. Dissertação (Mestrado em Qualidade e Produtividade Animal) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos/USP.

CAPITULO IV

EFEITO DO USO DE PROTEASE EM DIETAS A BASE DE MILHO E FARELO DE SOJA PARA FRANGOS DE CORTE SOBRE O COEFICIENTE DE METABOLIZABILIDADE, DESEMPENHO, RENDIMENTO DE CARCAÇA E ANÁLISE ENZIMÁTICA

C. F. Q. Matias^{1*}; J. S. R. Rocha¹; P. C. Cardeal¹; D. P. Vaz¹; T.S.M. Carvalho¹; M. M. Saldanha¹; M. V. Triginelli¹; L. M. M. Amaral¹; L. J. C. Lara²; N. C. Baião²

¹Aluno de Pós-Graduação da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Brasil

²Professor da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Brasil

*e-mail: christianematias@gmail.com

RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito da adição de enzima protease (produzida pelo *Bacillus licheniformis* cepa PWD-1) e o efeito da valorização da matriz nutricional da enzima em dietas para frangos de corte sobre a metabolizabilidade dos nutrientes, desempenho, rendimento de carcaça e cortes e produção enzimática. Foram utilizados quatro tratamentos com seis repetições cada. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x2 (com e sem adição da enzima protease X com e sem valorização da matriz nutricional da enzima) na fase inicial e na fase de crescimento. Avaliou-se o coeficiente de metabolizabilidade da matéria seca (CMMS), proteína bruta (CMPB) e extrato etéreo (CMEE) na fase inicial e crescimento. Na fase inicial, não foi observada diferença significativa ($P>0,05$) para os tratamentos avaliados. Na fase de crescimento, ocorreu interação entre os tratamentos para a variável CMPB. Os frangos alimentados com dieta sem valorização com adição de enzima (*on top*) apresentaram piores resultados ($P\leq 0,05$) para CMPB. Além disso, observou-se que a adição de enzima melhorou o CMEE ($P\leq 0,05$), independente da valorização. O desempenho

dos frangos de corte foi avaliado na fase inicial (um a 18 dias) e na fase total (um a 35 dias) e o rendimento de carcaça e cortes aos 38 dias de idade. O consumo de ração não foi influenciado ($P>0,05$) pelos tratamentos em nenhuma das fases. Na fase inicial, o GP e CA foram melhores ($P\leq 0,05$) para as aves que receberam dietas sem valorização da matriz nutricional, independente da adição de enzima. Na fase de um a 35 dias, o maior GP ($P\leq 0,05$) foi obtido com dietas sem valorização, independente da adição de enzima. Os tratamentos não influenciaram ($P>0,05$) o rendimento de carcaça e cortes. A análise enzimática foi realizada aos 14 e aos 35 dias de idade. Aos 14 dias, os tratamentos com enzima obtiveram menores valores de concentração de proteínas totais e quimotripsina. Aos 35 dias, os tratamentos com enzima obtiveram menores valores de concentração de proteínas totais e tripsina. A adição de enzima melhorou o CMEE, sem efeito sobre o desempenho e rendimento de carcaça. O ganho de peso, conversão alimentar e o fator de produção de frangos de corte de um a 35 dias de idade são melhorados com o uso de dietas não valorizadas, sem efeito sobre o rendimento de carcaça. A valorização nutricional recomendada para a protease parece ser excessiva nas dietas comerciais para frangos de corte.

Palavras chave: desempenho, metabolizabilidade, análise enzimática

INTRODUÇÃO

A inclusão de proteases exógenas na dieta para frangos de corte tem como objetivo principal promover hidrólise de proteínas resistentes ao processo digestivo e complementar a ação das proteases endógenas produzidas pelas aves. Em geral, a adição de protease suplementa a produção de serina proteases endógenas, reduzindo a exigência de aminoácidos e energia (Mascarell e Ryan 1997; Cowieson 2005). A inclusão de protease exógena aumenta o valor nutricional da soja por meio de hidrólise das proteínas de armazenamento (conglucina e beta-conglucina), e também por atuar sobre os fatores antinutricionais da soja, tais como inibidores de tripsina, lectinas e proteínas antigênicas, elevando a eficiência da utilização de aminoácidos nas aves (Soto-Salnova et al., 1996; Dosković et al., 2013).

Segundo Classen (1996), o aproveitamento insuficiente das proteínas, durante a digestão, apresenta como consequência maior excreção de nitrogênio, resultando em desperdício deste nutriente e poluição ambiental. Desta forma, a inclusão de protease nas dietas de frangos de corte permite a redução no nível de proteína bruta, minimizando a excreção de nitrogênio pelas excretas (Cauwenbergue e Burnham, 2001).

Portanto, objetivou-se com o presente estudo avaliar o efeito da inclusão de protease

exógena, bem como a valorização da matriz nutricional desta enzima, em dietas para frangos de corte a base de milho e farelo de soja sobre o coeficiente de metabolizabilidade, desempenho, rendimento de carcaça e atividade enzimática.

4.1 MATERIAL E MÉTODOS

4.1.1 Condições experimentais

Pintos Cobb500[®] machos, de um dia (n=768), foram obtidos de um incubatório local e distribuídos em boxes de um galpão convencional. Trinta e dois pintos foram alojados em cada um dos 24 boxes (14 frangos/m²). A cama utilizada foi de cepilho de madeira e cada box foi equipado com bebedouro pendular e comedouro tubular, fornecendo acesso *ad libitum* a água e alimento durante o experimento. O programa de luz foi de 24h de luz nos primeiros 14 dias de idade e iluminação natural após esse período.

As dietas foram a base de milho e farelo de soja e formuladas para o período inicial (um a 18 dias) e de crescimento (19 a 35 dias). Para a formulação das dietas, foram considerados os níveis nutricionais das matérias-primas de acordo com Rostagno et al. (2011). A composição das dietas iniciais e de crescimento estão apresentadas na Tabela 1 e 2, respectivamente. As mesmas aves foram utilizadas na fase inicial e na fase de crescimento.

A inclusão da protease foi de 250g/t, de acordo com as recomendações do fabricante. A matriz nutricional da enzima foi seguida conforme recomendação do fabricante e encontra-se descrita na Tabela 3.

A execução deste estudo foi aprovada pelo Comitê de Ética e Princípios de Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA/UFMG – nº. 437 / 2015).

Tabela 1. Composição das dietas na fase inicial (um a 18 dias de idade das aves)

Ingredientes (%)	INICIAL			
	CONTROLE	CONTROLE NEGATIVO	USO COMERCIAL	ON TOP
	Sem enzima	Sem enzima com valorização	Enzima com valorização	Enzima sem valorização
Milho	59,04	62,39	62,37	59,01
Farelo de Soja (45% PB)	31,53	29,14	29,14	31,53
Farinha de carne/ossos (40% PB)	5,78	5,81	5,81	5,78
Farinha de penas	-	-	-	-
Óleo degomado de soja	2,15	1,15	1,15	2,15
Calcário	0,20	0,21	0,21	0,20
Sal	0,33	0,33	0,33	0,32
Suplemento mineral e vitamínico ¹	0,40	0,40	0,40	0,40
DL-Metionina (98%)	0,32	0,31	0,31	0,32
L-Lisina HCL (98%)	0,19	0,22	0,22	0,20
L-Treonina	0,06	0,05	0,05	0,06
Protease ²	-	-	0,025	0,025
Total	100	100	100	100
Níveis nutricionais				
EM, kcal/kg	3,000	2,972	3,000	3,028
Proteína bruta, %	22,00	21,19	22,00	22,81
Extrato etéreo, %	5,454	4,545	4,544	5,453
Cálcio, %	0,950	0,950	0,950	0,950
P disp, %	0,480	0,480	0,480	0,480
Sódio, %	0,190	0,190	0,190	0,190
Lisina dig. aves, %	1,180	1,142	1,180	1,218
Metionina dig. aves, %	0,601	0,583	0,593	0,612
Met + Cis dig. aves, %	0,880	0,852	0,880	0,908
Treonina dig. aves %	0,770	0,735	0,770	0,805
Triptofano dig. aves %	0,221	0,209	0,220	0,232

¹Suplemento Vitamínico Mineral Cada 1,0 kg contém: Vit. A 3.500.000 UI, Vit. D3 625.000 UI, Vit. E 6.250 mg, Vit.K3 750 mg, Vit.B1 500 mg, Vit.B2 1.250 mg, Vit.B6 1.000 mg, Vit. B12 6.250 mcg, Biotina 25 mg, Niacina 8.750 mg, Ácido Fólico 250 mg, Ácido Pantotênico 3.000 mg, Selênio 45 mg, Iodo 175 mg, Ferro 12.525 mg, Cobre 2.500 mg, Manganês 19.500, Zinco 13.750 mg, Halquinol 7.500 mg, Salinomicina 16,5g.

²Cibenza DP100

Tabela 2. Composição das dietas na fase crescimento (19 a 38 dias de idade das aves)

Ingredientes (%)	Crescimento			
	CONTROLE	CONTROLE NEGATIVO	USO COMERCIAL	ON TOP
	Sem enzima	Sem enzima com valorização	Enzima com valorização	Enzima sem valorização
Milho	62,38	65,75	65,73	62,36
Farelo de Soja (45% PB)	27,62	25,20	25,20	27,62
Farinha de carne/ossos (40% PB)	5,30	5,33	5,33	5,30
Farinha de pena	-	-	-	-
Óleo degomado de soja	3,67	2,67	2,67	3,67
Sal	0,34	0,34	0,34	0,34
Suplemento mineral e vitamínico ¹	0,40	0,40	0,40	0,40
DL-Metionina (98%)	0,21	0,20	0,20	0,21
L-Lisina HCL (98%)	0,03	0,05	0,05	0,03
Cloreto de Colina (60%)	0,05	0,05	0,05	0,05
Protease ²	-	-	0,025	0,025
Total	100	100	100	100
Níveis nutricionais				
EM, kcal/kg	3,150	3,122	3,150	3,178
Proteína bruta, %	20,00	19,19	20,00	20,81
Extrato etéreo, %	6,959	6,053	6,052	6,959
Cálcio, %	0,800	0,800	0,800	0,800
P disp, %	0,444	0,444	0,445	0,444
Sódio, %	0,190	0,190	0,190	0,190
Lisina dig. aves, %	0,950	0,912	0,950	0,988
Metionina dig. aves, %	0,480	0,462	0,473	0,491
Met + Cis dig. aves, %	0,740	0,712	0,740	0,767
Treonina dig. aves, %	0,659	0,630	0,665	0,695
Triptofano dig. aves, %	0,199	0,187	0,198	0,210

¹Suplemento Vitamínico Mineral Cada 1,0 kg contém: Vit. A 3.500.000 UI, Vit. D3 625.000 UI, Vit. E 6.250 mg, Vit.K3 750 mg, Vit.B1 500 mg, Vit.B2 1.250 mg, Vit.B6 1.000 mg, Vit. B12 6.250 mcg, Biotina 25 mg, Niacina 8.750 mg, Ácido Fólico 250 mg, Ácido Pantotênico 3.000 mg, Selênio 45 mg, Iodo 175 mg, Ferro 12.525 mg, Cobre 2.500 mg, Manganês 19.500, Zinco 13.750 mg, Halquinol 7.500 mg, Salinomicina 16,5g.

²Cibenza DP100

Tabela 3. Matriz nutricional da enzima protease, utilizada para a valorização na formulação das rações na fase inicial e de crescimento

	Matriz 250g/t	Contribuição Nutricional
Proteína	3265%	0,816%
EM (kcal/kg)	115.700	28,92
Lisina dig.	153%	0,038%
Metionina dig.	43%	0,011%
Met + Cis dig.	111%	0,028%
Treonina dig.	140%	0,035%
Arginina dig.	222%	0,055%
Valina dig.	130%	0,033%
Triptofano dig.	44%	0,011%
Isoleucina dig.	121%	0,030%
Leucina dig.	261%	0,065%

4.1.2 Tratamentos

Os tratamentos foram definidos pela inclusão da enzima protease (com ou sem) e valorização da matriz nutricional da enzima (com e sem):

- Controle: dieta sem protease e sem valorização nutricional;
- Controle negativo: dieta sem protease e com valorização de energia e proteína bruta;
- Uso comercial: dieta com protease e com valorização nutricional de energia e proteína bruta;
- *On top*: dieta com protease e sem valorização nutricional.

4.1.3 Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente ao acaso, em arranjo fatorial 2 x 2 (com e sem inclusão da enzima x com e sem valorização da matriz nutricional) na fase inicial e na fase de crescimento, sendo composto por quatro tratamentos: controle, controle negativo, uso comercial e *on top*. Para avaliar o desempenho foram utilizadas seis repetições, sendo cada repetição composta por 32 aves. Para avaliar a metabolizabilidade dos nutrientes utilizou-se seis repetições sendo cada repetição composta por 12 aves. Para a avaliação da

atividade enzimática e rendimento de carcaça foram utilizadas seis repetições sendo cada repetição composta por duas aves.

4.1.4 Metabolizabilidade dos nutrientes

O ensaio de metabolismo para a determinação da metabolizabilidade dos nutrientes foi realizado pelo método tradicional de coleta total de excretas no Laboratório de Metabolismo Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Um total de 288 frangos de corte, machos, Cobb 500®, de um dia de idade, foram distribuídos em quatro tratamentos, com seis repetições e 12 aves por repetição. As aves foram alojadas em gaiolas metabólicas de 1 m². O programa de luz foi de 24 horas de luz até os 14 dias e luz natural até o período final de criação.

As análises de metabolizabilidade da matéria seca e proteína bruta foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal da UFMG e as análises para determinação de extrato etéreo no Laboratório CBO, Campinas.

As coletas de excretas foram realizadas em dois momentos. Na primeira fase dos nove aos 12 dias e a segunda fase dos 23 aos 26 dias de idade das aves. A ração oferecida foi pesada no início e no final do período de coleta para obtenção do consumo de ração no período. As excretas foram coletadas duas vezes ao dia, pesadas e colocadas em sacos plásticos devidamente identificados e armazenados em câmara de congelamento (-15°C).

Posteriormente, as excretas coletadas durante os quatro dias foram descongeladas a temperatura ambiente, homogeneizadas, amostradas, pesadas e colocadas em estufa com circulação de ar forçada a 55°C por 72 horas para pré-secagem. Após a pré-secagem, o material foi exposto à temperatura ambiente por uma hora e novamente pesado para obtenção da matéria pré-seca. Em seguida, o material foi moído em moinho tipo faca com peneira de um milímetro.

Foram feitas análises laboratoriais para determinação da matéria seca, proteína bruta e extrato etéreo de acordo com a metodologia AOAC (2012). A determinação do teor do extrato etéreo nas excretas foi feita por meio da extração com solvente éter etílico, sendo que, previamente, foi realizada hidrólise ácida. Para tal procedimento, foi pesado cerca de 2,5g de amostra e transferiu-se para dentro de um erlenmeyer de 500ml. Adicionou-se 125ml de HCL 3N e levou-se à ebulição por 30 minutos. Em seguida, o material foi filtrado em bomba de vácuo com papel filtro qualitativo, lavado com água destilada, seco por 30 minutos em estufa de circulação a 55°C, novamente embalado em papel de filtro qualitativo e só então, o material foi colocado no extrator do tipo *Soxhlet* (Compêndio brasileiro de alimentação animal, 2009).

As rações também foram analisadas para determinação de matéria seca, proteína bruta

e extrato etéreo.

A partir dos dados de consumo de ração, produção de excretas e dos resultados das análises de laboratório, foram calculados os coeficientes de metabolizabilidade aparente da matéria seca (CMMS), da proteína bruta (CMPB) e do extrato etéreo (CMEE), conforme a fórmula:

$$\text{Metabolizabilidade dos nutrientes (\%)} = \frac{\text{nutriente ingerido (g)} - \text{nutriente das excretas (g)}}{\text{nutriente ingerido (g)}} \times 100$$

4.1.5 Desempenho

Os frangos, a ração oferecida e as sobras das rações foram pesados, semanalmente e ao final de cada fase, durante todo o período experimental, para avaliar o desempenho (consumo de ração, peso corporal e conversão alimentar). Esses dados foram utilizados para calcular os valores acumulados de um a 18 dias de idade e de um a 35 dias de idade. A mortalidade foi registrada diariamente e usada para ajustar a conversão alimentar, obtida pelo consumo de ração: ganho de peso. O índice de eficiência produtiva (IEP) foi calculado conforme a fórmula:

$$\text{IEP (\%)} = \frac{\text{ganho de peso diário (kg)} - \text{viabilidade (\%)}}{\text{conversão alimentar (g)}} \times 100$$

4.1.6 Rendimento de carcaça e cortes

O rendimento de carcaça foi avaliado aos 38 dias de idade, quando foram abatidas 48 aves do total das 768 aves alojadas. Esta amostra foi proveniente de animais apanhados aleatoriamente em cada box, sendo abatidas 12 aves por tratamento. Os frangos foram submetidos a jejum de ração de oito horas e após a identificação individual foram pesados. O abate foi realizado no abatedouro da empresa Granja Brasília Agroindustrial Avícola, localizado no município de Ibitité. Os procedimentos de abate foram os mesmos adotados em um abatedouro industrial, de acordo com as normas do SIF.

Para avaliação do rendimento de carcaça, foi considerado o peso da carcaça limpa eviscerada (sem pés, cabeça e pescoço) em relação ao peso vivo em jejum obtido antes do abate. Para avaliação dos cortes (coxa + sobrecoxa, peito, dorso, asa) os rendimentos foram obtidos considerando-se a relação ao peso da carcaça eviscerada.

4.1.7 Análise enzimática para determinação da atividade de tripsina, quimotripsina, e concentração de proteínas das amostras de pâncreas

As análises para determinação da concentração de proteínas totais, tripsina e quimotripsina pancreáticas, foram realizadas no Departamento de Tecnologia - Laboratório de Enzimologia da UNESP, Campus de Jaboticabal.

a) Obtenção do extrato bruto

Aos 14 e 35 dias de idade, dois animais por repetição foram separados aleatoriamente e mantidos em jejum de ração. Após o jejum, as aves foram abatidas por deslocamento cervical. Logo após o sacrifício, a cavidade abdominal foi aberta, o pâncreas retirado inteiro, identificado e imediatamente congelado em nitrogênio líquido. Depois, foi transferido para ultra-freezer e mantido a -80°C até a análise das amostras. Os pâncreas de cada repetição foram homogeneizados separadamente em homogeneizador tipo Turrax, marca OMNI, modelo GLH-2511, em tampão Tris-HCl pH 8,0 contendo CaCl_2 50mM a proporção de 1grama de tecido para 10ml de tampão. Depois as amostras foram centrifugadas a 10000 g, por 10 minutos a 4°C . Em seguida o sobrenadante foi dividido em três alíquotas de 200 μm em cada para cada tipo de análise, congelados em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C (Souza, 2008). Posteriormente as alíquotas foram utilizadas para determinação das atividades da tripsina e quimotripsina e dosagem de proteínas presentes no extrato.

b) Determinação da atividade de tripsina pancreática

A atividade da tripsina foi determinada pelo método descrito por Kakade et al. (1974). Primeiramente, foi efetuada a ativação do zimogênio em tampão Tris-HCl 0,5M pH 8,2 contendo CaCl_2 (50mM). Cada dosagem de 0,4 ml do extrato pancreático foi incubada com 0,08 unidades de enteroquinase (SIGMA[®]) a 37°C por 10 minutos. A reação sempre foi iniciada pela adição de 1ml do substrato N-benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (BAPNA, SIGMA[®]) ao meio de reação contendo o extrato ativado. Depois de 10 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 0,2 ml de ácido acético 30% (v/v). Após centrifugação em microcentrífuga SPIN I durante 2 minutos a 4°C , a absorbância foi determinada a 410nm.

Em cada determinação foram incluídos controles sem adição de enzimas. Uma unidade de atividade enzimática (U/mg) foi definida e expressa como a quantidade de enzima que libera 1 μ mol de p-nitroanilida por minuto por miligrama de proteína nas condições padrões do teste.

c) Determinação da atividade da quimotripsina pancreática

A atividade de quimotripsina foi determinada segundo Lima et al. (2003), a 37°C. A ativação do quimotripsinogênio foi efetuada como descrito para o tripsinogênio, em tampão Tris.HCl 0,2M contendo CaCl₂ 0.05M, pH 7,6.

A reação foi iniciada pela adição de 0,3 ml do substrato glutaril-L-fenilalanina-4-nitroanilida (GAPNA), ao meio de reação. Após 10 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 0,2 ml de ácido acético 30% (v/v).

Após centrifugação em microcentrífuga SPIN I durante 2 minutos a 4°C, a absorbância foi determinada a 410nm. Em cada determinação foram incluídos controles sem adição de enzimas. Uma unidade de atividade enzimática (U/mg) foi definida e expressa como a quantidade de enzima que libera 1 μ mol de p-nitroanilida por minuto por miligrama de proteína nas condições padrões do teste.

d) Dosagem da concentração de proteínas nas amostras

As concentrações de proteínas do extrato bruto de pâncreas foram determinadas de acordo com o método descrito por Hartree (1972), utilizando-se soroalbumina bovina (BSA) fração V como padrão proteico.

4.1.8 Análises estatísticas

Os dados foram submetidos a ANOVA, foi utilizado DIC em arranjo fatorial na fase inicial e na fase de crescimento. Todas as possíveis interações dentro e entre os principais efeitos foram avaliados usando o programa SAS (SAS Institute, 2012), quando significativas, as médias dos dados normais foram comparadas pelo teste de Tukey. Os dados não normais e que não foram possíveis de serem analisados transformados foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis, utilizando o mesmo programa. Os parâmetros de significância utilizados foram baseados em $p \leq 0,05$.

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.2.1 Metabolizabilidade

Os resultados para coeficiente de metabolizabilidade de matéria seca (CMMS), coeficiente de metabolizabilidade de proteína bruta (CMPB) e coeficiente de metabolizabilidade de extrato etéreo (CMEE), na fase inicial e de crescimento, estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Efeito da protease e da valorização nas dietas para frangos de corte, na fase inicial e crescimento, sobre coeficiente de metabolizabilidade da matéria seca (CMMS), coeficiente de metabolizabilidade da proteína bruta (CMPB), coeficiente de metabolizabilidade do extrato etéreo (CMEE).

Tratamentos	Inicial			Crescimento		
	CMMS	CMPB	CMEE	CMMS	CMPB	CMEE
Enzima						
Sem	75,55	57,88	81,23	75,61	55,66	60,40B
Com	76,57	59,41	80,40	74,93	55,08	76,70A
Valorização						
Sem	75,57	58,54	80,61	74,79	55,49	67,00
Com	76,54	58,75	81,02	75,75	55,25	70,10
ANOVA						
Enzima	0,128 ^{ns}	0,251 ^{ns}	*** ^{ns}	*** ^{ns}	*** ^{ns}	0,000
Valorização	0,145 ^{ns}	*** ^{ns}	*** ^{ns}	0,230 ^{ns}	*** ^{ns}	0,149 ^{ns}
Enzima x Valorização	*** ^{ns}	0,231 ^{ns}	0,053 ^{ns}	*** ^{ns}	0,019	*** ^{ns}
CV (%)	2,1	5,4	3,2	2,5	6,2	7,4

^{ns} Não significativo

Médias seguidas por letras distintas, diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Não houve interação entre enzima e valorização da matriz nutricional ($P > 0,05$) sobre o CMMS, CMPB e CMEE, na fase inicial (Tabela 4). Não houve efeito de enzima nem de valorização sobre as variáveis CMMS, CMPB e CMEE. Assim, os efeitos dos tratamentos não foram capazes de alterar o CMMS, CMPB e CMEE, na fase inicial.

Não houve interação entre enzima e valorização da matriz nutricional ($P > 0,05$) sobre o

CMMS, na fase de crescimento (Tabela 4). Não ocorreu efeito da enzima sobre o CMMS ($P>0,05$), aves alimentadas com adição de enzima na ração apresentaram resultados de metabolizabilidade semelhantes quando comparadas com aves alimentadas sem adição de enzima na ração.

Houve interação entre os tratamentos para a CMPB na fase de crescimento (Tabela 5). Dentre os frangos alimentados com dietas sem valorização os que obtiveram melhores resultados de CMPB ($P\leq 0,05$) foram os frangos que receberam ração sem enzima (grupo controle). Nos tratamentos com valorização, a inclusão de enzima não afetou ($P>0,05$) os resultados. Nos tratamentos com e sem enzima a valorização da matriz nutricional não influenciou ($P>0,05$) o CMPB nessa fase (Tabela 5). Portanto, o pior resultado foi obtido na dieta sem valorização com inclusão de enzima (*on top*), indicando que possivelmente o excesso de nutrientes pode piorar o aproveitamento.

Tabela 5. Desdobramento da interação no coeficiente de metabolizabilidade da proteína bruta (CMPB), em percentual, das rações, de acordo com os tratamentos, na fase de crescimento

Protease	Valorização	
	Sem	Com
Sem	57,56Aa	53,76Aa
Com	53,43Ba	56,73Aa

Médias seguidas por letras distintas, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, diferem entre si pelo teste de Tukey ($P\leq 0,05$). CV=6,2%

Não houve interação entre enzima e valorização da matriz nutricional ($P>0,05$) sobre o CMEE, na fase de crescimento (Tabela 4). Independente da valorização, o CMEE, na fase de crescimento, foi melhor ($P\leq 0,05$) nos frangos que receberam as dietas com inclusão de enzima do que os frangos alimentados com dietas sem enzima (Tabela 4). O substrato da dieta parece influenciar esse parâmetro, uma vez que Matias (2016) observou que em dietas com farinha de penas, o uso de protease não foi capaz de fazer essa alteração positiva sobre o CMEE, alteração esta que podemos observar neste estudo que não possui a inclusão de farinha de penas nas dietas. Contudo, apesar do efeito positivo da inclusão de enzima sobre o CMEE, o desempenho das aves na fase de crescimento não foi afetado (Tabela 6).

Freitas et al. (2011) também observaram melhora na metabolizabilidade da gordura ao adicionar protease em dietas a base de milho, farelo de soja e farinha de carne e ossos bovina.

Fru-Nji et al. (2011), de forma semelhante, observaram melhora na metabolizabilidade do extrato etéreo com o uso de protease em dietas para frangos de corte. Os autores consideraram que a melhora foi efeito secundário à maior eficiência na degradação das proteínas, que por sua vez, permitiria maior superfície de contato com as moléculas de lipídio para a formação de micelas.

Não houve efeito de valorização sobre o CMMS, CMPB e CMEE ($P>0,05$). Desta forma, aves alimentadas com ração valorizada na matriz nutricional da enzima apresentaram resultados de metabolizabilidade semelhantes quando comparadas com aves alimentadas com ração sem valorização. Portanto, o CMMS, CMPB e CMEE não foram influenciados ($P>0,05$) pelos tratamentos.

4.2.2 Desempenho

Os resultados para consumo de ração (CR), ganho de peso (GP) e taxa de conversão alimentar (CA) e índice de eficiência produtiva (IEP), estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Efeito da protease e da valorização sobre o consumo de ração (CR), ganho de peso (GP), conversão alimentar (CA) e índice de eficiência produtiva (IEP) em frangos de corte de um aos 18 dias e de um aos 35 dias de idade

Tratamentos	1 – 18 dias			1 – 35 dias			
	CR (kg)	GP (kg)	CA (kg/kg)	CR (kg)	GP (kg)	CA (kg/kg)	IEP
Enzima							
Sem	0,903	0,722	1,250	3,380	2,303	1,467	433,93
Com	0,901	0,711	1,266	3,424	2,302	1,488	440,94
Valorização							
Sem	0,906	0,729A	1,234A	3,443	2,334A	1,469	447,26A
Com	0,897	0,704B	1,274B	3,362	2,261B	1,486	427,61B
ANOVA							
Enzima	*** ns	0,145 ^{ns}	0,261 ^{ns}	*** ns	*** ns	0,086 ^{ns}	*** ns
Valorização	*** ns	0,003	0,038	0,109 ^{ns}	0,008	0,133 ^{ns}	0,024
Enzima x Valorização	***ns	0,259 ^{ns}	***ns	*** ns	*** ns	*** ns	0,248 ^{ns}
CV (%)	3,2	2,5	2,8	3,5	2,9	1,9	4,5

^{ns} Não significativo

Médias seguidas por letras distintas, diferem entre si pelo teste de Tukey ($P\leq 0,05$).

Não houve interação entre enzima e valorização para as variáveis CR, GP e CA na fase inicial (Tabela 6).

Na fase inicial e no período de um a 35 dias, o CR, GP e CA não foram afetados ($P>0,05$) pela inclusão de enzima (Tabela 6). As modificações ocasionadas pelos tratamentos não foram

suficientes para alterar estes parâmetros nas aves avaliadas, uma vez que aves alimentadas com dietas contendo enzima apresentaram resultados semelhantes de CR, GP e CA aos das aves alimentadas com ração sem enzima. Nas condições de manejo, com uso de matérias primas desta avaliação podemos concluir que a utilização de enzima protease não influencia nos parâmetros produtivos de frangos de corte.

Os resultados encontrados são condizentes com Angel et al. (2011), que não verificaram efeito da adição de diferentes doses de protease sobre o consumo de ração em frangos de corte de sete a 22 dias de idade. De forma semelhante, Zotesso (2015) não observou diferenças significativas no CR e GP em tratamentos com e sem suplementação de enzima protease. Olukosi et al. (2007) também não observaram melhora no GP com a utilização do complexo enzimático. Assim como Maiorka et al. (2009) que também não verificaram diferenças significativas no peso corporal e conversão alimentar entre aves que receberam protease nas dietas e frangos de corte alimentados e aves que não receberam protease na dieta (200 g/ton de ração) no período de um a 42 dias de idade.

Não houve efeito de valorização da matriz nutricional da enzima sobre o CR ($P>0,05$). Aves alimentadas com dietas com valorização apresentaram resultados semelhantes de CR aos das aves alimentadas com ração sem valorização da matriz nutricional da enzima. Assim, as variações nutricionais promovidas pelos tratamentos não foram eficientes para alterar o CR das aves.

Independente da utilização de enzima, o GP e a CA foram melhores ($P\leq 0,05$) nos frangos que receberam as dietas sem valorização da matriz nutricional da enzima na fase inicial e o no período de um a 35 dias de idade o GP também se apresentou melhor ($P\leq 0,05$) nestes tratamentos (Tabela 6). Portanto, os melhores resultados encontrados foram os tratamentos controle e *on top*. A valorização da matriz nutricional da enzima afetou negativamente o ganho de peso e a conversão alimentar na fase inicial indicando que a valorização da matriz nutricional parece estar excessiva. Esses resultados são semelhantes aos encontrados por Freitas et al (2011) que observaram efeito negativo da valorização sobre o GP e CA, independente da inclusão de enzima protease. Angel et al. (2011) também observaram que aves alimentadas com dieta valorizadas sem adição de protease (controle negativo), apresentaram menor ganho de peso quando comparadas com as aves do grupo sem valorização (controle).

Não houve interação entre enzima e valorização para as variáveis CR, GP e CA no período de um a 35 dias (Tabela 6). Não houve efeito ($P>0,05$) da enzima sobre o CR, GP, CA e IEP em aves alimentadas com e sem valorização da matriz nutricional. Aves alimentadas com

dietas contendo enzima protease apresentaram resultados semelhantes de CR, GP, CA e IEP aos das aves alimentadas com ração sem enzima.

Independente da utilização de enzima, aves alimentadas com dietas com valorização apresentaram resultados semelhantes de CR e CA aos das aves alimentadas com ração sem valorização da matriz nutricional da enzima. Desta forma, as mudanças determinadas pelos tratamentos não foram capazes de alterar o CR e a CA das aves.

Independente da utilização de enzima, o GP e o IEP foram melhores ($P \leq 0,05$) nos frangos que receberam as dietas sem valorização da matriz nutricional da enzima (Tabela 6). Portanto, os melhores resultados encontrados foram os tratamentos controle e on top. A valorização da matriz nutricional da enzima afetou negativamente o ganho de peso e consequentemente o fator de produção em aves de um a 35 dias de idade.

De forma geral, podemos concluir que a valorização proposta parece ser excessiva e a utilização da enzima com ou sem a valorização não é suficiente para provocar melhorias no desempenho das aves em nenhuma das fases avaliadas.

4.2.3 Rendimento de carcaça

Os resultados para rendimento de carcaça e cortes (coxa, dorso, peito e asa) de frangos de corte aos 38 dias, estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Rendimento de carcaça aos 38 dias

Tratamentos	Carcaça (%)	Coxa + sobrecoxa (%)	Dorso (%)	Peito (%)	Asa (%)
Enzima					
Sem	72,09	28,97	19,01	40,76	11,24
Com	72,93	29,06	18,51	40,63	11,47
Valorização					
Sem	72,08	28,75	19,16	40,81	11,48
Com	72,94	29,28	18,36	40,58	11,22
ANOVA					
Enzima	0,088 ^{ns}	*** ns	*** ns	*** ns	*** ns
Valorização	0,082 ^{ns}	0,284 ^{ns}	0,277 ^{ns}	*** ns	*** ns
Enzima x Valorização	0,283 ^{ns}	*** ns	0,136 ^{ns}	0,187 ^{ns}	0,055 ^{ns}

^{ns} Não significativo

Médias não seguidas por letras são semelhantes entre si pelo teste F ($P > 0,05$).

Não houve interação entre enzima e valorização para as variáveis, rendimento de carcaça aos 38 dias de idade ($P>0,05$). Não houve efeito ($P>0,05$) de enzima e de valorização sobre as variáveis rendimento de carcaça, coxa e sobrecoxa, dorso, peito e asa. Resultados semelhantes foram encontrados por Freitas et al. (2011), os autores verificaram que a adição de protease em distintos níveis (sem inclusão de enzima, 100, 200, 400, 800, e 1,600 mg/Kg de ração) não exerceram efeito sobre os rendimentos de carcaça, peito, coxa e sobrecoxa.

4.2.4 Análises enzimáticas

Os resultados para concentração de proteínas totais e atividade enzimática de tripsina e quimotripsina pancreática, aos 14 dias e 35 dias, estão apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8. Concentração de proteínas totais (mg/ml) e atividade enzimática de tripsina e quimotripsina pancreática (U/mg de proteína) em frangos de corte aos 14 e aos 35 dias de idade das aves.

Tratamentos	14 DIAS			35 DIAS		
	Proteínas totais	Tripsina	Quimotripsina	Proteínas totais	Tripsina	Quimotripsina
Enzima						
Sem	4,66A	73,43	42,88A	4,83A	67,61A	65,89
Com	3,08B	39,00	28,89B	4,15B	46,22B	55,43
Valorização						
Sem	3,61	44,82	40,35	4,47	53,18	60,68
Com	4,13	67,60	31,43	4,50	60,66	60,65
ANOVA						
Enzima	0,073	0,086 ^{ns}	0,032	0,027	0,005	0,079 ^{ns}
Valorização	0,314 ^{ns}	0,240 ^{ns}	0,149 ^{ns}	*** ^{ns}	0,250 ^{ns}	*** ^{ns}
Enzima x Valorização	0,830 ^{ns}	0,468 ^{ns}	0,422 ^{ns}	0,231 ^{ns}	0,333 ^{ns}	0,135 ^{ns}
CV (%)	25,38	65,58	32,21	12,12	21,75	17,96

^{ns} Não significativo

Médias seguidas por letras distintas, diferem entre si pelo teste de Tukey ($P\leq 0,05$).

Não houve interação entre enzima e valorização para as variáveis de concentração de proteínas totais, tripsina e quimotripsina. Aos 14 dias, independente da valorização, os frangos de corte que consumiram ração com enzima apresentaram menores valores ($P\leq 0,05$) de concentração de proteínas totais e quimotripsina (Tabela 8). Portanto, o uso de enzima exógena protease promoveu redução da concentração de proteínas totais e atividade enzimática de

quimotripsina aos 14 dias de idade das aves.

Não ocorreu efeito ($P>0,05$) de enzima sobre a atividade enzimática de tripsina aos 14 dias. Aves alimentadas com dietas contendo enzima apresentaram resultados semelhantes de atividade enzimática de tripsina aos das aves alimentadas com ração sem enzima. Contudo, podemos constatar que o coeficiente de variação desta variável se apresentou muito alto (65,58%), o que torna esse resultado questionável.

Não ocorreu efeito de valorização sobre as variáveis concentração de proteínas totais, atividade de tripsina e atividade de quimotripsina ($P>0,05$) aos 14 dias. Aves alimentadas com dietas valorizadas apresentaram resultados semelhantes quando comparadas com aves alimentadas com dietas sem valorização.

Aos 35 dias, independente da valorização, os frangos de corte que consumiram ração com enzima apresentaram menores valores ($P\leq 0,05$) de concentração de proteínas totais e tripsina. Portanto, o uso de enzima exógena protease promoveu redução da concentração de proteínas totais e atividade enzimática de tripsina aos 35 dias de idade das aves.

De acordo com Garcia et al. (2003), cerca de 25% das necessidades diárias de nitrogênio são utilizadas para a síntese de enzimas endógenas. Zanella et al. (1999) verificaram reduções na síntese endógenas de tripsina pancreática (35,80%) e amilase (23,39%), quando enzimas exógenas foram suplementadas nas dietas dos frangos de corte. Os autores afirmaram que o uso de enzimas exógenas promove efeito poupador de energia e aminoácidos para o organismo, que pode levar a uma melhora no desempenho (Lima et al., 2007). Contudo, esse efeito não foi observado no presente trabalho, uma vez que a redução promovida na produção de quimotripsina (14 dias de idade) e tripsina (35 dias de idade) não apresentou efeito sobre o desempenho das aves (Tabela 6).

Não ocorreu efeito ($P>0,05$) de enzima sobre a atividade enzimática de quimotripsina aos 35 dias. Aves alimentadas com dietas contendo enzima apresentaram resultados semelhantes de atividade enzimática de quimotripsina aos das aves alimentadas com ração sem enzima aos 35 dias de idade das aves.

Não ocorreu efeito de valorização sobre as variáveis concentração de proteínas totais, atividade de tripsina e atividade de quimotripsina ($P>0,05$) aos 35 dias. Aves alimentadas com dietas valorizadas apresentaram resultados semelhantes quando comparadas com aves alimentadas com dietas sem valorização aos 35 dias de idade das aves.

4.3 CONCLUSÕES

Nas condições em que foi realizado o experimento pode-se concluir que: o uso de enzima protease melhora o coeficiente de metabolizabilidade do extrato etéreo na fase adulta de frangos de corte. A valorização da dieta piora o ganho de peso e o fator de produção de frangos de corte de um a 35 dias de idade, sem efeito sobre o rendimento de cortes. Dietas com enzima protease diminuem a concentração de proteínas totais e a atividade enzimática de quimotripsina aos 14 dias de idade e a concentração de proteínas totais e a atividade enzimática de tripsina aos 35 dias de idade.

4.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGEL, C. R.; SAYLOR, W.; VIEIRA, S. L.; WARD, N. Effects of a monocomponent protease on performance and protein utilization in 7- to 22-day-old broiler chickens. *Poult. Sci.*, v. 90, p. 2281-2286, 2011.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). Official Methods of analysis of AOAC international. 19th ed. Gaithersburg: AOAC, 2012.

CAUWENBERGUE, S.; BURNHAM, D. New developments in amino acid and protein nutrition of poultry, as related to optimal performance and reduced nitrogen excretion. In: EUROPEAN SYMPOSIUM POULTRY NUTRITION, 13., 2001, Blankenberge. *Anais...* Blankenberge: [s.n.], 2001.

CLASSEN, H.L. Cereal grain starch and exogenous enzymes in poultry diets. *Anim. Feed Sci. Technol.*, v. 62, p. 21-27, 1996.

COMPÊNDIO BRASILEIRO DE ALIMENTAÇÃO ANIMAL, Método No14 - Determinação de Extrato Etéreo – Método Soxhlet, p. 62 a 64. São Paulo: Sindirações, 2009

COWIESON AJ. Factors that affect the nutritional value of maize for broilers. *Anim. Feed. Sci. Tech.* v. 119, p. 293–305, 2005.

DOSKOVIĆ, V.; BOGOSAVLJEVIĆ-BOSKOVIĆ, S.; PAVLOVSKI, Z.; MILOŠEVIĆ, B. ŠKRBIĆ, Z.; RAKONJAC, S.; PETRIČEVIĆ, V. Enzymes in broiler diets with special reference to protease. *World's Poultry Science Journal*, v. 69, n.2, p.343-360, 2013.

FREITAS, D. M., S. L. VIEIRA, C. R. ANGEL, A. FAVERO, AND A. MAIORKA. Performance and nutrient utilization of broilers fed diets supplemented with a novel mono component protease. *J. Appl. Poult*, v. 20, p. 322-334, 2011.

FRU-NJI, F. et al. A feed serine protease improves broiler performance and increases protein and energy digestibilidade. *Journal of Poultry Science*, v.48, p.239-246, 2011.

GARCIA, M.I., ARANÍBAR, M.J., LÁZARO, R., MEDEL, P., MATEOS, G.G. Amilase supplementation of broiler diets based on corn. *Poultry Science*, v. 82, p. 436-442, 2003.

HARTREE, E. E. Determination of protein; A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry*, v. 48, p. 422-427, 1972.

LESSIRE, M. Effect of feeding technique, ad libitum, dry or wet force feeding on the metabolisable energy values of raw materials for poultry. *Br. Poult. Sci.*, v. 31, p. 785-793, 1990.

LIMA A. C. F.; PIZAURO J. M.; MACARI M.; MALHEIROS E. B. Efeito do Uso de Probiótico sobre o Desempenho e Atividade de Enzimas Digestivas de Frangos de Corte. *R. Bras. Zootec.*, v.32, n.1, p.200-207, 2003.

LIMA, M. R.; SILVA, J. H. V.; ARAUJO, J. A.; LIMA, C. B.; OLIVEIRA, E. R. A. Enzimas exógenas na alimentação de aves. *Acta Veterinaria Brasilica*, v.1, n.4, p.99-110, 2007.

KAKADE, M. L; RACKIS, J. J; McGHEE, J. G; PUSKI, G. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: A collaborative analysis of an improved procedure. *Cereal Chemistry*. v.51, p.376 - 382. 1974.

MAIORKA, A.; FAVERO, A.; MEURER, R.F.P.; MORAES, M.T.T.; SORBARA, J.O.B.

Broiler chicken performance and ileal digestibility is improved by a protease used in corn/soybean meal/ meat bone meal diet. INTERNATIONAL POULTRY SCIENTIFIC FORUM, 2009, Atlanta. *Anais...* Atlanta: [s.n.], 2009, p. 33.

MASCARELL, J.; RYAN, M. Technical aspects of enzyme utilization: Dry vs liquid enzymes. Feed manufacturing in Southern Europe: New challenges. Zaragoza: CIHEAM-IAMZ, 1997, p.161-174

MATIAS, C. F. Q. PROTEASE NA ALIMENTAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE. 2012. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

NIR, I. Mecanismos de digestão e absorção de nutrientes durante a primeira semana. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1998, Campinas. *Anais...* Campinas: FACTA, 1998. p. 81-91.

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

ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; DONZELE, J. L.; et al. Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos. Composição de alimentos e exigências nutricionais. Viçosa: UFV, 2011. 252 p.

SAS. STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. User's guide: statistics. Version 9.3. 4th ed. North Caroline: SAS Inst. INC., 2012

SOTO-SALONOVA, M.F.; GARCIA, O.; GRAHAM, H.; PACK, M. Uso de enzimas em dietas de milho e soja para frangos de corte. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLA, 1996, Campinas. *Anais...* Campinas: FACTA, 1996, p.71-76.

SOUZA, L.F.A. Exposição crônica e cíclica ao calor em frangos de corte: desempenho, metabolização dos nutrientes e atividade de enzimas pancreáticas. Dissertação de mestrado. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista. 2008.51p.

ZANELLA, I.; SAKAMURA N.K.; SILVERSIDES, F.G. Effect of enzyme supplementation of broiler diets based on corn and soybeans. *Poultry Science*, v.78, p.561-568, 1999.

ZOTESSO, F. Efeito de diferentes níveis proteicos e inclusões de protease sobre o desempenho de frangos de corte. 2015. Dissertação (Mestrado em Qualidade e Produtividade Animal) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos/USP.

CAPÍTULO V

EFEITO DA VALORIZAÇÃO DA MATRIZ NUTRICIONAL DA ENZIMA PROTEASE EM DIETAS COM E SEM FARINHA DE PENNA PARA FRANGOS DE CORTE SOBRE O COEFICIENTE DE METABOLIZABILIDADE, DESEMPENHO, RENDIMENTO DE CARÇAÇA E ANÁLISE ENZIMÁTICA

C. F. Q. Matias^{1*}; J. S. R. Rocha¹; P. C. Cardeal¹; D. P. Vaz¹; T.S.M. Carvalho¹; M. M. Saldanha¹; M. V. Triginelli¹; L. M. M. Amaral¹; N. C. Baião²; L. J. C. Lara²

¹Aluno de Pós-Graduação da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Brasil

²Professor da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Brasil

*e-mail: christianematias@gmail.com

RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito da valorização da matriz nutricional da enzima protease em dietas contendo ou não farinha de penas sobre a metabolizabilidade dos nutrientes, desempenho, rendimento de carcaça e produção enzimática. Foi testada a hipótese de que o substrato (farinha de penas) pode interferir na resposta dos tratamentos. Avaliou-se o coeficiente de metabolizabilidade da matéria seca (CMMS), proteína bruta (CMPB) e extrato etéreo (CMEE) na fase inicial e crescimento. Avaliou-se também o desempenho dos frangos de corte - consumo de ração (CR), ganho de peso (GP) e conversão alimentar (CA) na fase inicial (1 a 18 dias) e no período total (um a 35 dias). O rendimento de carcaça e cortes foi realizado aos 38 dias de idade e as análises enzimáticas foram realizada aos 14 e aos 35 dias de idade. Foram feitos quatro tratamentos com seis repetições cada. Todas as dietas continham enzima protease (produzida pelo *Bacillus licheniformis* cepa PWD-1). Foi usado o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x2 (com e sem adição de farinha de pena e X com e sem valorização da matriz nutricional da enzima). Observou-se, na fase inicial, maior CMMS e

CMPB ($P \leq 0,05$) para as aves que, independente da adição ou não da farinha de penas, consumiram ração com valorização da matriz nutricional da enzima. Além disso, as aves que consumiram as dietas sem farinha de pena, apresentaram maior CMEE ($P \leq 0,05$). Ainda na fase inicial, o GP foi maior ($P \leq 0,05$) em aves que receberam dietas sem valorização da matriz nutricional. Os melhores resultados obtidos para CA ($P \leq 0,05$) foram com a inclusão de farinha de penas, independente da valorização. Aos 14 dias, os tratamentos com farinha de penas obtiveram maiores valores de quimotripsina. Na fase de crescimento, não houve diferença significativa para o CMMS e CMPB, contudo, o melhor CMEE ($P \leq 0,05$) foi obtido sem a utilização de farinha de pena, independente da valorização. O consumo de ração foi aumentado, tanto na fase inicial quanto no período total, nas aves que consumiram dietas sem inclusão de farinha de penas, independente da valorização ($P \leq 0,05$). No período de um a 35 dias, independente da utilização de farinha de penas, o GP, a CA e o IEP foram melhores ($P \leq 0,05$) nos frangos que receberam as dietas sem valorização. Os tratamentos não influenciaram ($P > 0,05$) o rendimento de carcaça e cortes. Aos 35 dias, as variáveis enzimáticas não foram influenciadas pelos tratamentos. Concluiu-se que os melhores resultados para metabolizabilidade da matéria seca, proteína bruta e extrato etéreo foram obtidos utilizando-se dietas valorizadas e com inclusão de farinha de penas. A adição de farinha de pena sem valorização melhora o ganho de peso e a conversão alimentar de frangos de corte de um a 35 dias de idade, sem efeito sobre o rendimento de cortes. A valorização nutricional recomendada para a protease parece ser excessiva nas dietas comerciais para frangos de corte.

Palavras chave: desempenho, metabolizabilidade, protease, farinha de pena, frangos de corte

INTRODUÇÃO

A utilização de enzimas exógenas tem sido considerada uma alternativa viável capaz de disponibilizar maior quantidade de nutriente contido na ração, com o objetivo de melhorar ou manter o desempenho dos animais com menor custo (Sartori et al., 2007).

De acordo com Rotter (1990), as enzimas adicionadas ao alimento são ativadas pela associação de fatores como o pH dos fluidos digestivos, temperatura do organismo e presença de substrato. Entretanto, a presença de substrato no organismo do animal é fator limitante para que as enzimas possam atuar.

Segundo Zanella et al. (1999), além da liberação de nutrientes, outro benefício da utilização das enzimas exógenas seria a redução da síntese de enzimas endógenas. Permitindo assim, que o organismo disponibilize mais aminoácidos para síntese protéica.

Portanto, objetivou-se avaliar o efeito da valorização da matriz nutricional da enzima protease em dietas contendo ou não farinha de penas sobre a metabolizabilidade dos nutrientes, desempenho, rendimento de carcaça e produção enzimática

5.1 MATERIAL E MÉTODOS

5.1.1 Condições experimentais

Pintos Cobb500[®] machos, de um dia (n=768), foram obtidos de um incubatório local e distribuídos em boxes dentro de um galpão de cortinas laterais. Trinta e dois pintos foram alojados em cada um dos 24 boxes (14 frangos/m²). A cama utilizada foi de cepilho de madeira e cada box foi equipado com bebedouro pendular e comedouro tubular, fornecendo acesso *ad libitum* a água e alimento durante o experimento. O programa de luz foi de 24h de luz nos primeiros 14 dias de idade e iluminação natural após esse período.

As dietas foram a base de milho e farelo de soja e formuladas para o período inicial (um a 18 dias) e de crescimento (19 a 38 dias) com inclusão de enzima protease (produzida pelo *Bacillus licheniformis* cepa PWD-1) em todas as dietas em todas as fases. Para a formulação das dietas, foram considerados os níveis nutricionais das matérias-primas de acordo com Rostagno et al. (2011). A composição das dietas iniciais e de crescimento estão na Tabela 1 e 2.

A inclusão da protease foi de 250g/t, de acordo com as recomendações do fabricante. A matriz nutricional da enzima foi seguida conforme recomendação do fabricante e encontra-se descrita na Tabela 3.

A execução deste estudo foi aprovada pelo Comitê de Ética e Princípios de Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA/UFMG – nº. 437/2015).

Tabela 1. Composição das dietas na fase inicial (um a 18 dias de idade das aves)

Ingredientes (%)	INICIAL			
	Uso comercial com FP	On top com FP	Uso comercial sem FP	On top sem FP
	Com enzima com valorização	Com enzima sem valorização	Com enzima com valorização	Com enzima sem valorização
Milho	65,09	61,73	62,37	59,01
Farelo de Soja (45% PB)	24,91	27,30	29,14	31,53
Farinha de carne/ossos (40% PB)	5,81	5,78	5,81	5,78
Farinha de penas	2,00	2,00	-	-
Óleo degomado de soja	0,57	1,57	1,15	2,15
Calcário	0,21	0,21	0,21	0,20
Sal	0,32	0,32	0,33	0,32
Suplemento mineral e vitamínico ¹	0,40	0,40	0,40	0,40
DL-Metionina (98%)	0,31	0,32	0,31	0,32
L-Lisina HCL (98%)	0,31	0,29	0,22	0,20
L-Treonina	0,06	0,06	0,05	0,06
Protease ²	0,025	0,025	0,025	0,025
Total	100	100	100	100
Níveis nutricionais				
EM, kcal/kg	3,000	3,028	3,000	3,028
Proteína Bruta, %	22,00	22,81	22,00	22,81
Extrato Etéreo, %	4,108	5,017	4,544	5,453
Cálcio, %	0,950	0,950	0,950	0,950
P disp, %	0,480	0,480	0,480	0,480
Sódio, %	0,190	0,190	0,190	0,190
Lisina dig. aves, %	1,180	1,218	1,180	1,218
Metionina dig. aves, %	0,583	0,602	0,593	0,612
Met + Cis dig. aves, %	0,880	0,908	0,880	0,908
Treonina dig. aves %	0,770	0,805	0,770	0,805
Triptofano dig. aves %	0,203	0,215	0,220	0,232

¹Suplemento Vitamínico Mineral Cada 1,0 kg contém: Vit. A 3.500.000 UI, Vit. D3 625.000 UI, Vit. E 6.250 mg, Vit.K3 750 mg, Vit.B1 500 mg, Vit.B2 1.250 mg, Vit.B6 1.000 mg, Vit. B12 6.250 mcg, Biotina 25 mg, Niacina 8.750 mg, Ácido Fólico 250 mg, Ácido Pantotênico 3.000 mg, Selênio 45 mg, Iodo 175 mg, Ferro 12.525 mg, Cobre 2.500 mg, Manganês 19.500, Zinco 13.750 mg, Halquinol 7.500 mg, Salinomicina 16,5g.

²Cibenza DP100

Tabela 2. Composição das dietas na fase crescimento (19 a 35 dias de idade das aves)

Ingredientes (%)	Crescimento			
	Uso comercial com FP	On top com FP	Uso comercial sem FP	On top sem FP
	Com enzima com valorização	Com enzima sem valorização	Com enzima com valorização	Com enzima sem valorização
Milho	69,77	66,40	65,73	62,36
Farelo de Soja (45% PB)	18,93	21,35	25,20	27,62
Farinha de carne/ossos (40% PB)	5,37	5,33	5,33	5,30
Farinha de pena	3,00	3,00	-	-
Óleo degomado de soja	1,79	2,79	2,67	3,67
Sal	0,32	0,32	0,34	0,34
Suplemento mineral e vitamínico ¹	0,40	0,40	0,40	0,40
DL-Metionina (98%)	0,16	0,17	0,20	0,21
L-Lisina HCL (98%)	0,18	0,16	0,05	0,03
Cloreto de Colina (60%)	0,05	0,05	0,05	0,05
Protease ²	0,025	0,025	0,025	0,025
Total	100	100	100	100
Níveis nutricionais				
EM, kcal/kg	3,150	3,178	3,150	3,178
Proteína Bruta, %	20,00	20,81	20,00	20,81
Extrato Etéreo, %	5,428	6,336	6,052	6,959
Cálcio, %	0,800	0,800	0,800	0,800
P disp, %	0,447	0,447	0,445	0,444
Sódio, %	0,190	0,190	0,190	0,190
Lisina dig. aves, %	0,950	0,988	0,950	0,988
Metionina dig. aves, %	0,417	0,435	0,473	0,491
Met + Cis dig. aves, %	0,740	0,767	0,740	0,767
Treonina dig. aves, %	0,666	0,696	0,665	0,695
Triptofano dig. aves, %	0,178	0,190	0,198	0,210

¹Suplemento Vitamínico Mineral Cada 1,0 kg contém: Vit. A 3.500.000 UI, Vit. D3 625.000 UI, Vit. E 6.250 mg, Vit.K3 750 mg, Vit.B1 500 mg, Vit.B2 1.250 mg, Vit.B6 1.000 mg, Vit. B12 6.250 mcg, Biotina 25 mg, Niacina 8.750 mg, Ácido Fólico 250 mg, Ácido Pantotênico 3.000 mg, Selênio 45 mg, Iodo 175 mg, Ferro 12.525 mg, Cobre 2.500 mg, Manganês 19.500, Zinco 13.750 mg, Halquinol 7.500 mg, Salinomicina 16,5g.

²Cibenza DP100

Tabela 3. Matriz nutricional da enzima protease, utilizada para a valorização na formulação das rações na fase inicial e de crescimento

	Matriz 250g/t	Contribuição Nutricional
Proteína	3265%	0,816%
EM (kcal/kg)	115.700	28,92
Lisina dig.	153%	0,038%
Metionina dig.	43%	0,011%
Met + Cis dig.	111%	0,028%
Treonina dig.	140%	0,035%
Arginina dig.	222%	0,055%
Valina dig.	130%	0,033%
Triptofano dig.	44%	0,011%
Isoleucina dig.	121%	0,030%
Leucina dig.	261%	0,065%

5.1.2 Tratamentos

Todos os tratamentos continham enzima protease. Os tratamentos foram definidos pela inclusão da farinha de pena (com ou sem) e valorização da matriz nutricional da enzima (com e sem):

- Uso comercial com farinha de penas: dieta com farinha de penas, com protease e com valorização nutricional de energia e proteína bruta;
- *On top* com farinha de penas: dieta com farinha de penas, com protease e sem valorização;
- Uso comercial sem farinha de penas: dieta sem farinha de penas, com protease e com valorização nutricional de energia e proteína bruta;
- *On top* sem penas: dieta sem farinha de penas, com protease e sem valorização.

5.1.3 Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente ao acaso, em arranjo fatorial 2 x 2 (duas formas de inclusão da farinha de pena x duas valorizações da matriz nutricional) na fase inicial e de crescimento. Para avaliar o desempenho foram utilizadas seis repetições, sendo cada repetição composta de 32 aves. Para avaliar a metabolizabilidade dos nutrientes utilizou-se seis repetições sendo cada repetição composta de 12 aves. Para a avaliação da atividade

enzimática e rendimento de carcaça foram utilizadas seis repetições sendo cada repetição composta por duas aves.

5.1.4 Metabolizabilidade dos nutrientes

O ensaio de metabolismo para a determinação da metabolizabilidade dos nutrientes foi realizado pelo método tradicional de coleta total de excretas no Laboratório de Metabolismo Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Um total de 288 frangos de corte, machos, Cobb 500®, de um dia de idade, foram distribuídos em quatro tratamentos, com seis repetições e 12 aves por repetição. As aves foram alojadas em gaiolas metabólicas de 1 m². O programa de luz foi de 24 horas de luz até os 14 dias e luz natural até o período final de criação. Todas as aves foram alimentadas com dietas a base de milho e farelo de soja no período total (1 a 38 dias), todas as dietas continham inclusão de enzima protease.

As análises de metabolizabilidade da matéria seca e proteína bruta foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal da UFMG e as análises para determinação de extrato etéreo no Laboratório CBO, Campinas.

As coletas de excretas foram realizadas em dois momentos. Na primeira fase dos nove aos 12 dias e a segunda fase dos 23 aos 26 dias de idade das aves. A ração oferecida foi pesada no início e no final do período de coleta para obtenção do consumo de ração no período. As excretas foram coletadas duas vezes ao dia, pesadas e colocadas em sacos plásticos devidamente identificados e armazenados em câmara de congelamento (-15°C).

Posteriormente, as excretas coletadas durante os quatro dias foram descongeladas a temperatura ambiente, homogeneizadas, amostradas, pesadas e colocadas em estufa com circulação de ar forçada a 55°C por 72 horas para pré-secagem. Após a pré-secagem, o material foi exposto à temperatura ambiente por uma hora e novamente pesado para obtenção da matéria pré-seca. Em seguida, o material foi moído em moinho tipo faca com peneira de um milímetro.

Foram feitas análises laboratoriais para determinação da matéria seca, proteína bruta e extrato etéreo de acordo com a metodologia AOAC (2012). A determinação do teor do extrato etéreo nas excretas foi feita por meio da extração com solvente éter etílico, sendo que, previamente, foi realizada hidrólise ácida. Para tal procedimento, foi pesado cerca de 2,5g de amostra e transferiu-se para dentro de um erlenmeyer de 500ml. Adicionou-se 125ml de HCL 3N e levou-se à ebulição por 30 minutos. Em seguida, o material foi filtrado em bomba de vácuo com papel filtro qualitativo, lavado com água destilada, seco por 30 minutos em estufa de circulação a 55°C, novamente embalado em papel de filtro qualitativo e só então, o material

foi colocado no extrator do tipo *Soxhlet*. Este procedimento é recomendado para liberar a fração de ácidos graxos que formam sabões insolúveis com o cálcio e o magnésio, bem como outros componentes lipídicos difíceis de serem solubilizados por meio do método de extração convencional. Evitando assim, que o valor de extrato etéreo seja subestimado.

As rações também foram analisadas para determinação de matéria seca, proteína bruta e extrato etéreo.

A partir dos dados de consumo de ração, produção de excretas e dos resultados das análises de laboratório, foram calculados os coeficientes de metabolizabilidade aparente da matéria seca (CMMS), da proteína bruta (CMPB) e do extrato etéreo (CMEE), conforme a fórmula:

$$\text{Metabolizabilidade dos nutrientes (\%)} = \frac{\text{nutriente ingerido (g)} - \text{nutriente das excretas (g)}}{\text{nutriente ingerido (g)}} \times 100$$

5.1.5 Desempenho

Os frangos, a ração oferecida e as sobras das rações foram pesados, semanalmente e ao final de cada fase, durante todo o período experimental, para avaliar o desempenho (consumo de ração, peso corporal e conversão alimentar). Esses dados foram utilizados para calcular os valores acumulados de um a 18 dias de idade e de um a 35 dias de idade. A mortalidade foi registrada diariamente e usada para ajustar a conversão alimentar, obtida pelo consumo de ração: ganho de peso. O índice de eficiência produtiva (IEP) foi calculado conforme a fórmula:

$$\text{IEP (\%)} = \frac{\text{ganho de peso diário (kg)} - \text{viabilidade (\%)}}{\text{conversão alimentar (g)}} \times 100$$

5.1.6 Rendimento de carcaça e cortes

O rendimento de carcaça foi avaliado aos 38 dias de idade, quando foram abatidas 48 aves do total das 768 aves alojadas. Esta amostra foi proveniente de animais apanhados aleatoriamente em cada box, sendo abatidas 12 aves por tratamento. Os frangos foram submetidos a jejum de ração de oito horas e após a identificação individual foram pesados. O abate foi realizado no abatedouro da empresa Granja Brasília Agroindustrial Avícola, localizado no município de Ibitité. Os procedimentos de abate foram os mesmos adotados em um abatedouro industrial, de acordo com as normas do SIF.

Para avaliação do rendimento de carcaça, foi considerado o peso da carcaça limpa eviscerada (sem pés, cabeça e pescoço) em relação ao peso vivo em jejum obtido antes do abate. Para avaliação dos cortes (coxa+sobrecoxa, peito, dorso, asa) os rendimentos foram obtidos considerando-se a relação ao peso da carcaça eviscerada.

5.1.7 Análise enzimática

As análises para determinação da concentração de proteínas totais, tripsina e quimotripsina pancreáticas, foram realizadas no Departamento de Tecnologia - Laboratório de Enzimologia da UNESP, Campus de Jaboticabal.

a) Obtenção do extrato bruto

Aos 14 e 35 dias de idade, dois animais por repetição foram separados aleatoriamente e mantidos em jejum de ração. Após o jejum, as aves foram abatidas por deslocamento cervical. Logo após o sacrifício, a cavidade abdominal foi aberta, o pâncreas retirado inteiro, identificado e imediatamente congelado em nitrogênio líquido. Depois, foi transferido para ultra-freezer e mantido a -80°C até a análise das amostras. Os pâncreas de cada repetição foram homogeneizados separadamente em homogeneizador tipo Turrax, marca OMNI, modelo GLH-2511, em tampão Tris-HCl pH 8,0 contendo CaCl_2 50mM a proporção de 1grama de tecido para 10ml de tampão. Depois as amostras foram centrifugadas a 10000 g, por 10 minutos a 4°C . Em seguida o sobrenadante foi dividido em três alíquotas de 200 μm em cada para cada tipo de análise, congelados em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C (Souza, 2008). Posteriormente as alíquotas foram utilizadas para determinação das atividades da tripsina e quimotripsina e dosagem de proteínas presentes no extrato.

b) Determinação da atividade de tripsina pancreática

A atividade da tripsina foi determinada pelo método descrito por Kakade et al. (1974). Primeiramente, foi efetuada a ativação do zimogênio em tampão Tris-HCl 0,5M pH 8,2 contendo CaCl_2 (50mM). Cada dosagem de 0,4 ml do extrato pancreático foi incubada com 0,08 unidades de enteroquinase (SIGMA[®]) a 37°C por 10 minutos. A reação sempre foi iniciada pela adição de 1ml do substrato N-benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (BAPNA, SIGMA[®]) ao meio de reação contendo o extrato ativado. Depois de 10 minutos, a reação foi interrompida

pela adição de 0,2 ml de ácido acético 30% (v/v). Após centrifugação em microcentrífuga SPIN I durante 2 minutos a 4°C, a absorbância foi determinada a 410nm.

Em cada determinação foram incluídos controles sem adição de enzimas. Uma unidade de atividade enzimática (U/mg) foi definida e expressa como a quantidade de enzima que libera 1 nmol de p-nitroanilida por minuto por miligrama de proteína nas condições padrões do teste.

c) Determinação da atividade da quimotripsina pancreática

A atividade de quimotripsina foi determinada segundo Lima et al. (2003), a 37°C. A ativação do quimotripsinogênio foi efetuada como descrito para o tripsinogênio, em tampão Tris.HCl 0,2M contendo CaCl₂ 0.05M, pH 7,6.

A reação foi iniciada pela adição de 0,3 ml do substrato glutaril-L-fenilalanina-4-nitroanilida (GAPNA), ao meio de reação. Após 10 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 0,2 ml de ácido acético 30% (v/v).

Após centrifugação em microcentrífuga SPIN I durante 2 minutos a 4°C, a absorbância foi determinada a 410nm. Em cada determinação foram incluídos controles sem adição de enzimas. Uma unidade de atividade enzimática (U/mg) foi definida e expressa como a quantidade de enzima que libera 1 nmol de p-nitroanilida por minuto por miligrama de proteína nas condições padrões do teste.

d) Dosagem da concentração de proteínas nas amostras

As concentrações de proteínas do extrato bruto de pâncreas foram determinadas de acordo com o método descrito por Hartree (1972), utilizando-se soroalbumina bovina (BSA) fração V como padrão proteico.

5.1.8 Análises estatísticas

Os dados foram submetidos a ANOVA, foi utilizado DIC em arranjo fatorial na fase inicial e na fase de crescimento. Todas as possíveis interações dentro e entre os principais efeitos foram avaliados usando o programa SAS (SAS Institute, 2012), quando significativas, as médias dos dados normais foram comparadas pelo teste de Tukey. Os dados não normais e que não foram possíveis de serem analisados transformados foram comparados pelo teste de

Kruskal-Wallis, utilizando o mesmo programa. Os parâmetros de significância utilizados foram baseados em $p \leq 0,05$.

5. 2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.2.1 Metabolizabilidade

Os resultados para coeficiente de metabolizabilidade de matéria seca (CMMS), coeficiente de metabolizabilidade de proteína bruta (CMPB) e coeficiente de metabolizabilidade de extrato etéreo (CMEE) estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Efeito do uso de farinha de pena e da valorização nas dietas para frangos de corte na fase inicial e crescimento sobre coeficiente de metabolizabilidade da matéria seca (CMMS), coeficiente de metabolizabilidade da proteína bruta (CMPB), coeficiente de metabolizabilidade do extrato etéreo (CMEE)

Tratamentos	Inicial			Crescimento		
	CMMS	CMPB	CMEE	CMMS	CMPB	CMEE
Farinha pena						
Sem	77,38	59,41	80,39A	74,93	55,08	76,70A
Com	77,57	60,26	77,33B	75,09	56,66	65,28B
Valorização						
Sem	75,95B	58,46B	78,82	73,67	54,93	68,87
Com	77,99A	61,21 ^a	78,90	76,35	56,66	73,11
ANOVA						
Farinha pena	0,143 ^{ns}	0,524 ^{ns}	0,020	*** ^{ns}	0,276 ^{ns}	0,000
Valorização	0,001	0,048	*** ^{ns}	0,158 ^{ns}	0,277 ^{ns}	0,161 ^{ns}
Farinha pena x Valorização	0,299 ^{ns}	0,476 ^{ns}	0,142 ^{ns}	0,518 ^{ns}	0,239 ^{ns}	0,440 ^{ns}
CV (%)	1,69	5,35	3,75	5,97	6,04	10,04

^{ns} Não significativo

Médias seguidas por letras distintas, diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Não houve interação entre farinha de pena e valorização para as variáveis CMMS, CMPB e CMEE em nenhuma das fases avaliadas.

Na fase inicial, não houve efeito da inclusão de farinha de pena sobre o CMMS e CMPB ($P>0,05$), aves alimentadas com ração com farinha de pena apresentaram resultados de metabolizabilidade semelhantes quando comparadas com aves alimentadas com ração sem farinha de pena (Tabela 4). Esses resultados demonstram que a inclusão de farinha de penas não afeta o CMMS e CMPB.

Entretanto, houve efeito da inclusão de farinha de penas sobre o CMEE ($P\leq 0,05$). Independente da valorização os frangos de corte que consumiram ração sem farinha de pena apresentaram maior ($P\leq 0,05$) CMEE (Tabela 4). Sinalizando uma supervalorização da matriz nutricional da farinha de penas durante a formulação. Esse também pode ser um efeito da inclusão da farinha de pena sobre a composição final da ração que leva a uma redução da inclusão de óleo e, portanto, menor quantidade de extrato etéreo nas fórmulas com farinha de pena.

Houve efeito de valorização, tanto no CMMS quanto no CMPB ($P\leq 0,05$), na fase inicial, as aves alimentadas com dietas com valorização da matriz nutricional apresentaram maiores coeficientes quando comparadas com aves que receberam dietas sem valorização, independente da inclusão de farinha de pena. Indicando melhor aproveitamento por parte das aves que receberam menor aporte de nutrientes.

Não houve efeito de valorização sobre o CMEE ($P>0,05$), as aves alimentadas com dietas valorizadas apresentaram resultados de metabolizabilidade semelhantes quando comparadas com aves alimentadas com dietas sem valorização da matriz nutricional da enzima (Tabela 4). Portanto, as alterações nas rações não foram suficientes para alterar o CMEE na fase inicial.

Na fase de crescimento, não houve efeito da inclusão de farinha de pena sobre o CMMS e CMPB ($P>0,05$), aves alimentadas com ração com farinha de pena apresentaram resultados de metabolizabilidade semelhantes quando comparadas com aves alimentadas com ração sem farinha de pena (Tabela 4). Esses resultados demonstram que a inclusão de farinha de penas não afeta o CMMS e CMPB.

De forma semelhante aos resultados obtidos na fase inicial, houve efeito da inclusão de farinha de penas sobre o CMEE ($P\leq 0,05$). Independente da valorização os frangos que consumiram ração sem farinha de pena apresentaram maior ($P\leq 0,05$) CMEE (Tabela 4). Esse resultado indica uma supervalorização da matriz nutricional da farinha de penas durante a formulação. A melhoria ocorrida no CMEE foi suficiente para ocasionar melhora no GP dos frangos alimentados com dietas sem inclusão de farinha de penas, independente da valorização,

na fase de crescimento (Tabela 5). Assim como na fase inicial, nesta fase também se observa uma menor inclusão de óleo nas rações com farinha de pena e portanto uma menor quantidade de extrato etéreo na formulação, tal situação pode justificar a piora no CMEE nas dietas com farinha de pena.

Não houve efeito de valorização sobre as variáveis CMMS, CMPB e CMEE na fase de crescimento. Aves alimentadas com ração com valorização apresentaram resultados de metabolizabilidade semelhantes quando comparadas com aves alimentadas com ração sem valorização (Tabela 4). Portanto, as alterações nas rações não foram suficientes para alterar o CMMS, CMPB e CMEE, na fase de crescimento.

5.2.2 Desempenho

Os resultados para consumo de ração (CR), ganho de peso (GP) e taxa de conversão alimentar (CA) e índice de eficiência produtiva (IEP), estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Efeito do uso da farinha de pena e da valorização sobre o consumo de ração (CR), ganho de peso (GP), conversão alimentar (CA) e índice de eficiência produtiva (IEP) em frangos de corte de um a 18 e de um a 35 dias de idade

Tratamentos	1 – 18 d			1 – 35 d			
	CR (kg)	GP (kg)	CA (kg/kg)	CR (kg)	GP (kg)	CA (kg/kg)	IEP
Far Pena							
Sem	0,901A	0,711	1,267B	3,425A	2,302A	1,488	440,94
Com	0,862B	0,697	1,238A	3,282B	2,235B	1,471	423,79
Valorização							
Sem	0,890	0,715A	1,244	3,381	2,319A	1,459A	447,57A
Com	0,873	0,693B	1,260	3,326	2,218B	1,499B	417,15B
ANOVA							
Far Pena	0,003	0,064 ^{ns}	0,037	0,007	0,050	0,381 ^{ns}	0,091 ^{ns}
Valorização	0,152 ^{ns}	0,006	0,234 ^{ns}	0,264 ^{ns}	0,005	0,046	0,050
Far Pena x Valorização	*** ^{ns}	0,165 ^{ns}	0,126 ^{ns}	0,701 ^{ns}	0,814 ^{ns}	0,510 ^{ns}	*** ^{ns}
CV (%)	3,17	2,57	2,55	3,46	3,52	3,19	5,47

^{ns} Não significativo

Médias seguidas por letras distintas, diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Não houve interação entre farinha de pena e valorização para as variáveis CR, GP, CA e IEP em nenhuma das fases avaliadas.

Na fase inicial, o CR foi aumentado ($P \leq 0,05$) nos grupos que receberam dietas sem farinhas de penas, independente da valorização (Tabela 5). Contudo, não houve efeito ($P > 0,05$) sobre o GP. Aves alimentadas com ração com farinha de penas apresentaram resultados de GP semelhantes quando comparadas com aves alimentadas com ração sem farinha de penas (Tabela 5).

Independente da valorização, a CA alimentar foi melhor ($P \leq 0,05$), na fase inicial, nos grupos alimentados com farinha de penas, esse resultado pode ser justificado pelo fato de ter ocorrido aumento no CR em frangos que receberam dietas sem farinha de penas, porém sem efeito sobre o GP, elevando assim a CA das aves que não receberam farinha de penas (Tabela 5). Esses resultados diferem de Carvalho et al. (2012) que não observaram diferenças significativas entre o grupo alimentado sem farinha de pena e o grupo tratado com farinha de pena para nenhuma das variáveis de desempenho. Contudo, vão de encontro com os resultados obtidos por Ajayi e Iyayi (2014), que observaram melhora na CA em frangos que consumiram dietas com farinha de penas em relação as aves do grupo controle sem farinha de pena.

Não houve efeito de valorização sobre o CR ($P > 0,05$), as aves alimentadas com dietas valorizadas apresentaram resultados de CR semelhantes quando comparadas com aves alimentadas com dietas sem valorização da matriz nutricional da enzima (Tabela 5).

Independente da inclusão de farinha de penas, os frangos de corte que consumiram ração sem valorização da matriz nutricional apresentaram maior GP ($P \leq 0,05$) na fase inicial. Portanto, os melhores resultados encontrados para GP foram os tratamentos on top com e sem farinha de pena. Demonstrando que a valorização da matriz nutricional da enzima afetou negativamente o ganho de peso na fase inicial.

No período de um a 35 dias, independente da valorização, a CR e o GP aumentaram ($P \leq 0,05$) nos grupos que receberam dietas sem farinhas de penas. Resultados semelhantes foram obtidos por Ajayi e Iyayi (2014) que observaram maior CR e GP em aves alimentadas com dietas sem inclusão de farinha de penas quando comparadas as aves que receberam dietas com farinha de penas. Os autores alegam que a piora no desempenho de frangos de corte ocasionada pela inclusão de farinha de penas pode ser reflexo da deficiência de alguns aminoácidos, tais como lisina e metionina, que são limitantes para frangos.

Não houve efeito de inclusão de farinha de penas sobre a CA e IEP ($P > 0,05$). As aves alimentadas com dietas sem farinha de penas apresentaram resultados de CA e IEP semelhantes

quando comparadas com aves alimentadas com dietas sem farinha de penas (Tabela 5).

Não houve efeito de valorização sobre o CR ($P>0,05$). As aves alimentadas com dietas valorizadas apresentaram resultados de CR semelhantes quando comparadas com aves alimentadas com dietas sem valorização da matriz nutricional da enzima (Tabela 5).

Independente da inclusão de farinha de penas, os frangos de corte que consumiram ração sem valorização da matriz nutricional apresentaram melhora nas variáveis GP, CA e IEP ($P\leq 0,05$). A melhora ocorrida na CA que ocorreu nos grupos sem valorização, pode ser explicada pelo fato de ter ocorrido aumento no GP sem aumento no CR.

5.2.3 Rendimento de carcaça

Os resultados para rendimento de carcaça estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Rendimento de carcaça aos 38 dias

Tratamentos	Carcaça (%)	Coxa + sobrecoxa (%)	Dorso (%)	Peito (%)	Asa (%)
Farinha Pena					
Sem	72,74	29,07	18,67	40,58	11,46
Com	72,16	28,96	19,15	40,55	11,41
Valorização					
Sem	72,29	28,85	19,44	40,26	11,71
Com	72,59	29,19	18,36	40,89	11,13
ANOVA					
Farinha Pena	0,220 ^{ns}	*** ^{ns}	0,575 ^{ns}	*** ^{ns}	*** ^{ns}
Valorização	0,626 ^{ns}	0,582 ^{ns}	0,069 ^{ns}	0,437 ^{ns}	0,552 ^{ns}
Far Pena x Valorização	0,163 ^{ns}	0,740 ^{ns}	0,542 ^{ns}	0,685 ^{ns}	0,428 ^{ns}
CV (%)	1,64	5,28	7,63	5,43	7,26

^{ns} Não significativo

Médias seguidas por letras distintas, diferem entre si pelo teste de Tukey ($P\leq 0,05$).

Não houve interação entre farinha de penas e valorização para as variáveis, rendimento de carcaça ($P>0,05$).

As variáveis rendimento de carcaça, coxa e sobrecoxa, dorso, peito e asa, não foram afetados significativamente ($P>0,05$) pela inclusão de farinha de penas (Tabela 6). Aves alimentadas

com dietas sem farinha de penas apresentaram resultados de rendimento de carcaça semelhantes quando comparadas com aves alimentadas com dietas sem farinha de penas. De forma semelhante, Caires (2009) avaliaram o efeito da inclusão de farinhas de origem animal sobre o desempenho e rendimento de carcaça de frango de corte. Segundo a autora, os frangos alimentados com farinha de pena, farinha de carne e ossos bovina e farinha de vísceras, não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle.

As variáveis rendimento de carcaça, coxa e sobrecoxa, dorso, peito e asa, não foram afetados significativamente ($P>0,05$) pela valorização da matriz nutricional da enzima (Tabela 6). Aves alimentadas com dietas sem valorização apresentaram resultados de rendimento de carcaça e seus cortes semelhantes quando comparadas com aves alimentadas com valorização da matriz nutricional da enzima. Resultados semelhantes foram encontrados por Zotesso et al. (2011), que avaliaram não observaram efeito da valorização da matriz nutricional da enzima protease sobre os rendimentos de carcaça, peito, coxa e sobrecoxa.

5.2.4 Análises enzimáticas

Os resultados para concentração de proteínas totais e atividade enzimática de tripsina e quimotripsina pancreática, aos 14 e 35 dias, estão apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7. Concentração de proteínas totais (mg/ml) e atividade enzimática de tripsina e quimotripsina pancreática (U/mg de proteína) em frangos de corte aos 14 e 35 dias de idade

Tratamentos	14 DIAS			35 DIAS		
	Proteínas totais	Tripsina	Quimotripsina	Proteínas totais	Tripsina	Quimotripsina
Far Pena						
Sem	3,08	39,00	28,89B	4,15	46,22	55,43
Com	2,51	42,50	41,03A	4,10	51,97	49,10
Valorização						
Sem	2,76	39,00	36,30	4,35	44,59	53,11
Com	2,82	43,87	33,62	3,90	53,60	51,43
ANOVA						
Far Pena	0,234 ^{ns}	0,626 ^{ns}	0,026	0,829 ^{ns}	0,378 ^{ns}	0,199 ^{ns}
Valorização	0,896 ^{ns}	0,390 ^{ns}	0,585 ^{ns}	0,059 ^{ns}	0,176 ^{ns}	0,725 ^{ns}
Far.Pena x Valorização	0,241 ^{ns}	0,704 ^{ns}	0,768 ^{ns}	0,539 ^{ns}	0,466 ^{ns}	0,155 ^{ns}
CV (%)	32,71	34,37	27,28	10,42	25,55	17,87

^{ns} Não significativo

*** $P>0,9$

Médias seguidas por letras distintas, diferem entre si pelo teste de Tukey ($P\leq 0,05$).

Não houve interação entre farinha de penas e valorização para as variáveis, concentração de proteínas totais, tripsina e quimotripsina ($P>0,05$), em nenhuma das idades avaliadas (Tabela 7).

Aos 14 dias de idade, a inclusão de farinha de pena não apresentou influência ($P>0,05$) sobre as variáveis proteínas totais e tripsina. No entanto, aves alimentadas com dietas sem farinha de penas diminuíram ($P\leq 0,05$) a excreção de quimotripsina. A redução da atividade enzimática da quimotripsina em dietas sem farinha de penas pode ter sido resultante da menor necessidade fisiológica de secreção de enzimas endógenas devido à menor presença de proteína na dieta, em comparação com as dietas com farinha de penas.

Não houve efeito de valorização sobre as variáveis analisadas ($P>0,05$). As aves alimentadas com dietas valorizadas apresentaram resultados da análise enzimática semelhantes quando comparadas com aves alimentadas com dietas sem valorização da matriz nutricional da enzima (Tabela 7).

Aos 35 dias de idade, não ocorreu efeito da inclusão de farinha de penas sobre a concentração de proteínas totais, tripsina e quimotripsina ($P>0,05$). As aves alimentadas com inclusão de farinha de penas na ração apresentaram resultados da análise enzimática semelhantes quando comparadas com aves alimentadas sem inclusão de farinha de penas na ração (Tabela 7). Não houve efeito de valorização sobre a concentração de proteínas totais, tripsina e quimotripsina ($P>0,05$). Aves alimentadas com ração valorizada na matriz nutricional da enzima apresentaram resultados da análise enzimática semelhantes quando comparadas com aves alimentadas com ração sem valorização (Tabela 7). Esse resultado parece indicar uma adaptação fisiológica dos animais.

5.3 CONCLUSÕES

Nas condições em que foi realizado o experimento pode-se concluir que: valorização e dietas sem farinha de penas melhoram o coeficiente de metabolizabilidade dos nutrientes em frangos de corte. A valorização e dietas com farinhas de penas pioram o ganho de peso e o fator de produção de frangos de corte de um a 35 dias de idade, sem efeito sobre o rendimento de cortes. Dietas com farinha de penas aumentam a atividade enzimática de quimotripsina aos 14 dias de idade.

5.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AJAYI, H. I.; IYAYI, E. A. Ileal nutrient digestibility and performance in broiler chickens fed graded levels of feather meal. *Ibadan Journal of Agricultural Research*, v. 10, n.1, p.78-87, 2014.

ANGEL, C. R.; SAYLOR, W.; VIEIRA, S. L.; WARD, N. Effects of a monocomponent protease on performance and protein utilization in 7- to 22-day-old broiler chickens. *Poult. Sci.*, v. 90, p. 2281-2286, 2011.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). *Official Methods of analysis of AOAC international*. 19th ed. Gaithersburg: AOAC, 2012.

CAIRES, Carolina Magalhães. Dietas de frangos de corte com subprodutos de origem animal de suplementação de creatina. 2009. 48 f. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2009.

CARVALHO, C. M. C., FERNANDES, E. A., CARVALHO, A P., CAIRES, R. M., FAGUNDES, N. S. Uso de farinhas de origem animal na alimentação de frangos de corte. *Revista portuguesa de ciências veterinárias*. v.107, p. 69-73, 2012.

HARTREE, E. E. Determination of protein; A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry*, v. 48, p. 422-427, 1972.

LIMA A. C. F.; PIZAURO J. M.; MACARI M.; MALHEIROS E. B. Efeito do Uso de Probiótico sobre o Desempenho e Atividade de Enzimas Digestivas de Frangos de Corte. *R. Bras. Zootec.*, v.32, n.1, p.200-207, 2003.

KAKADE, M. L; RACKIS, J. J; McGHEE, J. G; PUSKI, G. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: A collaborative analysis of an improved procedure. *Cereal Chemistry*. v.51, p.376 - 382. 1974.

ROTTER, B. A. The future of crude enzyme supplements in pig nutrition. *Pig News Inf.*, v.11, n.1, p.15-17, 1990.

ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; DONZELE, J. L.; et al. Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos. Composição de alimentos e exigências nutricionais. Viçosa: UFV, 2011. 252 p.

SARTORI, J.R. et al. Enzimas e simbióticos para frangos de corte criados no sistema convencional e alternativo. *Ciência Rural*. Santa Maria, v.37, n.1, 2007.

SAS. STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. User's guide: statistics. Version 9.3. 4th ed. North Caroline: SAS Inst. INC., 2012

SOUZA, L.F.A. Exposição crônica e cíclica ao calor em frangos de corte: desempenho, metabolização dos nutrientes e atividade de enzimas pancreáticas. Dissertação de mestrado. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista. 2008.51p.

ZANELLA, I.; SAKAMURA N.K.; SILVERSIDES, F.G. Effect of enzyme supplementation of broiler diets based on corn and soybeans. *Poultry Science*, v.78, p.561-568, 1999.

ZOTESSO, F. Efeito de diferentes níveis proteicos e inclusões de protease sobre o desempenho de frangos de corte. 2015. Dissertação (Mestrado em Qualidade e Produtividade Animal) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos/USP.

CAPÍTULO VI

EFEITO DA VALORIZAÇÃO DA PROTEASE EM DIETAS COM FARINHA DE PENA PARA FRANGOS DE CORTE SOBRE O DESEMPENHO E RENDIMENTO DE CARÇAÇA

C. F. Q. Matias^{1*}; J. S. R. Rocha¹; P. C. Cardeal¹; D. P. Vaz¹; T.S.M. Carvalho¹; M. M. Saldanha¹; M. V. Triginelli¹; L. M. M. Amaral¹; N. C. Baião²; L. J. C. Lara²

¹Aluno de Pós-Graduação da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Brasil

²Professor da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Brasil

*e-mail: christianematias@gmail.com

RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito da adição de enzima protease (produzida pelo *Bacillus licheniformis* cepa PWD-1) e o efeito da valorização da matriz nutricional da enzima em dietas contendo farinha de penas sobre o desempenho e o rendimento de carcaça. Foram utilizados quatro tratamentos com seis repetições cada. O delineamento foi em esquema fatorial 2x2 (com e sem adição da enzima protease X valorização de energia e proteína e somente valorização de proteína). Avaliou-se o desempenho dos frangos de corte no período de um a 35 dias de idade e o rendimento de carcaça e cortes aos 38 dias de idade. Não foi observado efeito dos tratamentos sobre o desempenho e o rendimento de carcaça ($P>0,05$). Portanto, nas condições deste estudo a valorização sem o uso de protease não compromete o desempenho das aves, indicando que os níveis da dieta parecem estar superestimados.

Palavras chave: desempenho, metabolizabilidade, protease, farinha de pena, frangos de corte

INTRODUÇÃO

Um aspecto interessante no uso de enzimas exógenas é a possibilidade de estabelecer estratégias nutricionais. Dentre essas, podemos destacar como principal a redução do nível nutricional em dietas contendo enzimas. O objetivo de valorizar a matriz nutricional com uso das enzimas é obter resposta similar ou até melhor quando comparada a uma dieta com níveis nutricionais considerados adequados. Essa resposta é proporcionada pelo incremento do valor nutricional dos ingredientes, devido à atuação da enzima na melhora da disponibilidade de nutrientes.

As enzimas são altamente específicas para os substratos, a presença de substrato no organismo do animal é fator limitante para que as enzimas possam atuar. Assim, o sucesso da utilização das enzimas exógenas depende da associação correta entre a dieta utilizada e a enzima escolhida, uma vez que cada enzima para desempenhar sua função necessita da presença de substrato específico (Lima et al., 2002).

Alguns estudos têm associado a utilização da protease com a redução das exigências de proteína, aminoácidos e energia, apesar da enzima protease ser específica para atuar somente sobre os ingredientes protéicos da dieta. Portanto, objetivou-se avaliar o efeito de enzima protease e da valorização em dietas a base de milho, farelo de soja e farinha de penas sobre o desempenho e rendimento de carcaça de frangos de corte.

6.1 MATERIAL E MÉTODOS

6.1.1 Condições experimentais

Pintos Cobb500[®] machos, de um dia (n=765), foram obtidos de um incubatório local e distribuídos em boxes dentro um galpão de cortinas laterais. Trinta e dois pintos foram alojados em cada um dos 24 boxes (14 frangos/m²). A cama utilizada foi de cepilho de madeira e cada box foi equipado com bebedouro pendular e comedouro tubular, fornecendo acesso *ad libitum* a água e alimento durante o experimento. O programa de luz foi de 24h de luz nos primeiros 14 dias de idade e iluminação natural após esse período.

As dietas foram a base de milho e soja e formuladas para o período inicial (um a 18 dias) e de crescimento (19 a 35 dias). Para a formulação das dietas, foram considerados os níveis

nutricionais das matérias-primas de acordo com Rostagno et al. (2011). A composição das dietas iniciais e de crescimento estão na Tabela 1 e 2.

A inclusão da protease foi de 250g/t, de acordo com as recomendações do fabricante. A matriz nutricional da enzima foi seguida conforme recomendação do fabricante e encontra-se descrita no Tabela 3. Todas as dietas continham farinha de penas, sendo que os níveis de inclusão de farinha de penas foram: 2% e 3% para a fase inicial e de crescimento, respectivamente.

A execução deste estudo foi aprovada pelo Comitê de Ética e Princípios de Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA/UFMG – nº. 437 / 2015).

Tabela 1. Composição das dietas na fase inicial (um a 18 dias de idade das aves)

Ingredientes (%)	INICIAL			
	A	B	C	D
	Sem enzima com valorização de energia e proteína	Enzima com valorização de energia e proteína	Enzima com valorização de proteína	Sem enzima com valorização de proteína
Milho	65,11	65,09	64,41	64,44
Farelo de Soja (45% PB)	24,91	24,91	25,02	25,02
Farinha de carne/ossos (40% PB)	5,81	5,81	5,81	5,81
Farinha de penas	2,00	2,00	2,00	2,00
Óleo degomado de soja	0,57	0,57	1,13	1,13
Calcário	0,21	0,21	0,21	0,21
Sal	0,32	0,32	0,32	0,32
Suplemento mineral e vitamínico*	0,40	0,40	0,40	0,40
DL-Metionina (98%)	0,31	0,31	0,31	0,31
L-Lisina HCL (98%)	0,31	0,31	0,31	0,31
L-Treonina	0,06	0,06	0,06	0,06
Protease ²	-	0,025	0,025	-
Total	100	100	100	100
Níveis nutricionais				
EM, kcal/kg	2,972	3,000	3,000	3,000
Proteína Bruta, %	21,19	22,00	22,00	21,19
Extrato Etéreo, %	4,109	4,108	4,638	4,640
Cálcio, %	0,950	0,950	0,950	0,950
P disp, %	0,480	0,480	0,480	0,480
Sódio, %	0,190	0,190	0,190	0,190
Lisina dig. aves, %	1,142	1,180	1,180	1,142
Metionina dig. aves, %	0,573	0,583	0,584	0,573
Met + Cis dig. aves, %	0,880	0,880	0,880	0,852
Treonina dig. aves, %	0,735	0,770	0,770	0,735
Triptofano dig. aves, %	0,2027	0,203	0,203	0,192

¹Suplemento Vitamínico Mineral Cada 1,0 kg contém: Vit. A 3.500.000 UI, Vit. D3 625.000 UI, Vit. E 6.250 mg, Vit.K3 750 mg, Vit.B1 500 mg, Vit.B2 1.250 mg, Vit.B6 1.000 mg, Vit. B12 6.250 mcg, Biotina 25 mg, Niacina 8.750 mg, Ácido Fólico 250 mg, Ácido Pantotênico 3.000 mg, Selênio 45 mg, Iodo 175 mg, Ferro 12.525 mg, Cobre 2.500 mg, Manganês 19.500, Zinco 13.750 mg., Halquinol 7.500 mg, Salinomicina 16,5g.

²Cibenza DP100

Tabela 2. Composição das dietas na fase crescimento (19 a 38 dias de idade das aves)

Ingredientes (%)	Crescimento			
	A	B	C	D
	Sem enzima com valorização de energia e proteína	Enzima com valorização de energia e proteína	Enzima com valorização de proteína	Sem enzima com valorização de proteína
Milho	69,80	69,77	69,10	69,13
Farelo de Soja (45% PB)	18,93	18,93	19,05	19,05
Farinha de carne/ossos (40% PB)	5,37	5,37	5,367	5,37
Farinha de pena	3,00	3,00	3,00	3,00
Óleo degomado de soja	1,79	1,79	2,34	2,34
Sal	0,32	0,32	0,32	0,32
Suplemento mineral e vitamínico*	0,40	0,40	0,40	0,40
DL-Metionina (98%)	0,16	0,16	0,16	0,16
L-Lisina HCL (98%)	0,18	0,18	0,18	0,18
Cloreto de colina (60%)	0,05	0,05	0,05	0,05
Protease ²	-	0,025	0,025	-
Total	100	100	100	100
Níveis nutricionais				
EM, kcal/kg	3,122	3,150	3,150	3,151
Proteína Bruta, %	19,19	20,00	20,00	19,19
Extrato Etéreo, %	5,429	5,428	5,958	5,959
Cálcio, %	0,800	0,800	0,800	0,800
P disp, %	0,447	0,447	0,447	0,447
Sódio, %	0,190	0,190	0,190	0,190
Lisina dig. aves, %	0,912	0,950	0,950	0,912
Metionina dig. aves, %	0,406	0,417	0,417	0,407
Met + Cis dig. aves, %	0,712	0,740	0,740	0,712
Treonina dig. aves, %	0,632	0,666	0,666	0,632
Triptofano dig. aves, %	0,167	0,178	0,179	0,168

¹Suplemento Vitamínico Mineral Cada 1,0 kg contém: Vit. A 3.500.000 UI, Vit. D3 625.000 UI, Vit. E 6.250 mg, Vit.K3 750 mg, Vit.B1 500 mg, Vit.B2 1.250 mg, Vit.B6 1.000 mg, Vit. B12 6.250 mcg, Biotina 25 mg, Niacina 8.750 mg, Ácido Fólico 250 mg, Ácido Pantotênico 3.000 mg, Selênio 45 mg, Iodo 175 mg, Ferro 12.525 mg, Cobre 2.500 mg, Manganês 19.500, Zinco 13.750 mg, Halquinol 7.500 mg, Salinomicina 16,5g.

²Cibenza DP100

Tabela 3. Valorização da matriz nutricional da enzima protease utilizada na formulação das rações na fase inicial e de crescimento

	Tratamentos B e C	Tratamentos I e J
Proteína	0,816%	0,816%
Energia met. (kcal/kg)	28,92	-
Lisina	0,038%	0,038%
Metionina	0,011%	0,011%
Met + Cys	0,028%	0,028%
Treonina	0,035%	0,035%
Arginina	0,055%	0,055%
Valina	0,033%	0,033%
Triptofano	0,011%	0,011%
Isoleucina	0,030%	0,030%
Leucina	0,065%	0,065%

6.1.2 Tratamentos

Os tratamentos foram definidos pela inclusão da enzima protease (com ou sem) e valorização da matriz nutricional da enzima (com e sem):

- Tratamento A (controle negativo): dieta com farinha de pena, sem protease e com valorização de energia, proteína bruta e aminoácidos;
- Tratamento B (uso comercial): dieta com farinha de pena, com protease e com valorização nutricional de energia, proteína bruta e aminoácidos;
- Tratamento C: dieta com farinha de pena, com protease e com valorização nutricional de proteína bruta e aminoácidos;
- Tratamento D: dieta com farinha de pena, sem protease e com valorização nutricional de proteína bruta e aminoácidos.

6.1.3 Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente ao acaso, em arranjo fatorial 2 x 2 (duas formas de inclusão da enzima x duas formas de valorização da matriz nutricional) na fase inicial e na fase de crescimento. Para avaliar o desempenho foram utilizadas seis repetições, sendo cada repetição composta de 32 aves. Para o rendimento de carcaça foram utilizadas seis repetições sendo cada repetição composta por duas aves.

6.1.4 Desempenho

Os frangos e as sobras das rações foram pesados, semanalmente e ao final de cada fase, durante todo o período experimental, para avaliar o desempenho (consumo de ração, peso corporal e conversão alimentar). Esses dados foram utilizados para calcular os valores acumulados de um a 18 dias de idade e de 18 a 35 dias de idade. A mortalidade foi registrada diariamente e usada para ajustar a conversão alimentar, obtida pelo consumo de ração: ganho de peso.

6.1.5 Rendimento de carcaça e cortes

O rendimento de carcaça foi avaliado aos 38 dias de idade, quando foram abatidas 48 aves do total das 768 aves alojadas. Esta amostra foi proveniente de animais apanhados aleatoriamente em cada box, sendo abatidas 12 aves por tratamento. Os frangos foram submetidos a jejum de ração de oito horas e após a identificação individual foram pesados. O abate foi realizado no abatedouro da empresa Granja Brasília Agroindustrial Avícola, localizado no município de Ibitité. Os procedimentos de abate foram os mesmos adotados em um abatedouro industrial, de acordo com as normas do SIF.

Para avaliação do rendimento de carcaça, foi considerado o peso da carcaça limpa eviscerada (sem pés, cabeça e pescoço) em relação ao peso vivo em jejum obtido antes do abate. Para avaliação dos cortes (coxa+sobrecoxa, peito, dorso, asa) os rendimentos foram obtidos considerando-se a relação ao peso da carcaça eviscerada.

6.1.6 Análises estatísticas

As médias de cada repetição foram a unidade experimental para os dados de desempenho. A média de duas aves foi a unidade experimental para os dados de rendimento de carcaça. As médias foram submetidas a ANOVA em um arranjo fatorial. Todas as possíveis interações dentro e entre os principais efeitos foram avaliados usando o programa SAS (SAS Institute, 2012), quando significativas, as médias dos dados normais foram comparadas pelo teste de Tukey. Os dados não normais e que foram possíveis de serem analisados transformados foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis, utilizando o mesmo programa. Os parâmetros de significância utilizados foram baseados em $p \leq 0,05$.

6.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.2.1 Desempenho

Os resultados para consumo de ração (CR), ganho de peso (GP) e taxa de conversão alimentar (CA), estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Efeito da protease e da valorização sobre o consumo de ração (CR), ganho de peso (GP) e conversão alimentar (CA) em frangos de corte de um a 18 e de um a 35 dias de idade

Tratamentos	1 – 18 d			1 – 35 d		
	CR (kg)	GP (kg)	CA (kg/kg)	CR (kg)	GP (kg)	CA (kg/kg)
Enzima						
Sem	0,881	0,696	1,265	3,347	2,191	1,528
Com	0,872	0,696	1,253	3,316	2,188	1,516
Valorização						
Energia/PB	0,867	0,693	1,251	3,302	2,181	1,514
PB	0,885	0,700	1,265	3,357	2,198	1,528
ANOVA						
Enzima	0,285 ^{ns}	0,888 ^{ns}	0,328 ^{ns}	0,280 ^{ns}	0,824 ^{ns}	0,349 ^{ns}
Valorização	0,099 ^{ns}	0,480 ^{ns}	0,328 ^{ns}	0,133 ^{ns}	0,508 ^{ns}	0,350 ^{ns}
Enzima x Valorização	0,121 ^{ns}	0,722 ^{ns}	0,294 ^{ns}	0,303 ^{ns}	0,896 ^{ns}	0,167 ^{ns}
CV (%)	2,72	2,93	2,60	2,50	2,92	2,11

^{ns} Não significativo

Médias não seguidas por letras distintas, diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

Não houve interação entre enzima e valorização para as variáveis CR, GP e CA ($P>0,05$). As variáveis CR, GP e CA, não foram afetadas significativamente ($P>0,05$) pela presença ou não de enzima e de valorização ou não da matriz nutricional da enzima (Tabela 4). Portanto as transformações determinadas pelos tratamentos não foram suficientes para alterar o desempenho de frangos de cortes de um a 35 dias de idade. Assim, podemos inferir, que a valorização de energia e proteína associada ou não ao uso de enzima protease não compromete o desempenho de frangos de corte, quando comparado ao uso de dietas com valorização apenas de proteína bruta associada ou não a enzima protease. Portanto, nas condições em que foi realizado esse estudo o uso protease e os dois tipos de valorização testados não são capazes de influenciar o desempenho e o rendimento de carcaça das aves, indicando que a valorização nutricional para proteína parece estar excessiva. Desta forma, a decisão sobre o uso de enzima para frangos de corte deve ser baseada no custo da dieta e que a valorização proteica da enzima deve ser verificada.

De forma semelhante, Oliveira (2014) observaram que a suplementação enzimática com protease e a valorização de proteína e aminoácido não tiveram efeito sobre o desempenho de frangos de corte.

6.2.2 Rendimento de carcaça

Os resultados para rendimento de carcaça estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Rendimento de carcaça aos 38 dias

Tratamentos	Rendimento				
	Carcaça (%)	Coxa + sobrecoxa (%)	Dorso (%)	Peito (%)	Asa (%)
Enzima					
Sem	71,68	27,75	18,92	41,60	11,47
Com	71,95	29,31	18,72	40,55	11,38
Valorização					
Energia/PB	72,16	28,21	18,50	41,86	11,28
PB	71,59	29,16	19,05	40,17	11,57
ANOVA					
Enzima	0,645 ^{ns}	0,188 ^{ns}	0,735 ^{ns}	0,489 ^{ns}	*** ^{ns}
Valorização	0,252 ^{ns}	0,388 ^{ns}	0,366 ^{ns}	0,106 ^{ns}	0,552 ^{ns}
Enzima x Valorização	0,215 ^{ns}	0,419 ^{ns}	0,354 ^{ns}	0,168 ^{ns}	0,428 ^{ns}
CV (%)	2,31	8,70	10,45	6,63	7,13

^{ns} Não significativo / *** $P>0,9$

Médias não seguidas por letras distintas, diferem entre si pelo teste de Tukey ($P\leq 0,05$)

Não houve interação entre enzima e valorização para as variáveis, rendimento de carcaça ($P>0,05$).

As variáveis rendimento de carcaça, coxa e sobrecoxa, dorso, peito e asa, não foram afetados significativamente ($P>0,05$) pela presença ou não de enzima protease e de valorização ou não da matriz nutricional da enzima (Tabela 6). Resultados semelhantes foram encontrados por Oliveira (2014) que não observou efeito de enzima e de valorização (proteína bruta e aminoácidos) sobre o rendimento de carcaça.

6.3. CONCLUSÕES

Nas condições em que foi realizado o experimento pode-se concluir que a adição de enzima protease não promove efeito sobre o desempenho e rendimento de carcaça. O uso de dietas para frangos de corte com redução de proteína bruta e aminoácidos promove resultados semelhantes de desempenho e rendimento de carcaça ao uso de dietas com redução de proteína bruta, aminoácidos e energia. Este resultado indica que a valorização proposta de energia não é capaz de alterar o resultado zootécnico, indicando que os níveis de energia das dietas utilizadas estão acima das necessidades das aves. Portanto, o tipo de valorização e o uso protease não são capazes de influenciar o desempenho e rendimento de carcaça das aves, indicando que os níveis de energia da dieta parecem estar superestimados. Seria importante a realização de mais estudos correlacionando o uso de protease, diferentes níveis de energia e diferentes valorizações (proteína e energia) para ter uma conclusão mais detalhada sobre este tema.

6.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

LIMA, A. C. F.; MACARI, M.; PIZAURO J. J. M.; MALHEIROS E. B. Atividade enzimática pancreática de frangos de corte alimentados com dietas contendo enzima ou probiótico. *Rev. Bras. Cienc. Avic.*, v. 4, n. 3, p. 187-193, 2002.

OLIVEIRA, R. F. ; ARAUJO, C. S. S. ; MURAKAMI, A. A. ; VILELA, J. S. ; GRANGHELLI, C. A. ; KOIYAMA, N. T. G. ; MOTA, P. H. Protease exógena em dietas para frangos de corte. *Novos desafios da pesquisa em nutrição e produção animal*. 1. ed. Pirassununga: 5D, 2014, p. 76-96.

ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; DONZELE, J. L.; et al. Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos. Composição de alimentos e exigências nutricionais. Viçosa: UFV, 2011. 252 p.

SAS. STATISTICAL ANALISYS SYSTEM. User's guide: statistics. Version 9.3. 4th ed. North Caroline: SAS Inst. INC., 2012

CONCLUSÕES FINAIS

- A utilização da enzima sem valorização melhora o ganho de peso de frangos de corte de um a 35 dias de idade, desta forma é observado um efeito positivo no uso da enzima “on top”
- A valorização da dieta piora o ganho de peso e o fator de produção de frangos de corte de um a 35 dias de idade, portanto, conclui-se que a valorização nutricional recomendada para a protease parece ser excessiva independente do substrato utilizado.
- Dietas com farinhas de penas pioram o ganho de peso e o fator de produção de frangos de corte de um a 35 dias de idade, esse resultado pode estar correlacionado com a menor quantidade de óleo na formulação das dietas com farinhas de penas.
- Dietas valorizadas melhoram o coeficiente de metabolizabilidade dos nutrientes em frangos de corte, isso pode ter ocorrido porque com a valorização ocorre menor disponibilidade de nutrientes que pode levar a melhor aproveitamento, devido a necessidade fisiológica do animal.
- Dietas com o uso de enzima diminuíram a atividade enzimática, isso pode ser explicado porque as enzimas exógenas suprem a necessidade fisiológica do animal e por isso a energia utilizada para a produção de enzimas pode ser direcionada para o crescimento. Contudo, o uso de enzimas em dietas sem farinha de penas parece reduzir ainda mais a produção de quimotripsina quando comparado com dietas com farinha de penas, isso pode ter ocorrido devido à menor presença de proteína na ração levando o animal a produzir menos enzimas para digerir esses nutrientes como no caso de dietas que continham farinha de penas.
- A adição de enzima protease com valorização de energia e proteína ou somente com valorização de proteína não promove efeito sobre o desempenho e rendimento de carcaça, indicando que a valorização da matriz nutricional proteica da enzima está superestimada uma vez que o uso da protease em dietas valorizadas não é capaz de melhorar o desempenho e rendimento de carcaça das aves.

- A valorização de proteína bruta e aminoácidos promove resultados semelhantes de desempenho e rendimento de carcaça quando comparada ao uso de dietas com redução de proteína bruta, aminoácidos e energia, independente da inclusão de enzima. Isso indica que o nível utilizado para energia parece estar acima da necessidade das aves
- De forma geral, podemos inferir que a presença do substrato (farinha de penas) foi capaz de promover diferenças significativas nas variáveis analisadas, levando a pior ganho de peso. Além disso, pode ser observado efeito positivo no uso da protease “on top”. Também observamos que a valorização parece estar excessiva por ocasionar pior ganho de peso em dietas com valorização.