

RODRIGO KNOP GUAZZI MESSIAS

**EFEITO DE UMA PROTEASE MONOCOMPONENTE SOBRE A DIGESTIBILIDADE
DE AMINOÁCIDOS E DA ENERGIA METABOLIZÁVEL DA SOJA INTEGRAL
DESATIVADA PARA FRANGOS DE CORTE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2010

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

M585e
2010

Messias, Rodrigo Knop Guazzi, 1984-
Efeito de uma protease monocomponente sobre a digestibilidade de aminoácidos e da energia metabolizável da soja integral desativada para frangos de corte / Rodrigo Knop Guazzi Messias. – Viçosa, MG, 2010.
viii, 49f. : il. ; 29cm.

Orientador: Luiz Fernando Teixeira Albino.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 45-49.

1. Frango de corte - Nutrição. 2. Digestibilidade.
3. Aminoácidos na nutrição animal. 4. Enzimas proteolíticas.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 636.5085

RODRIGO KNOP GUAZZI MESSIAS

**EFEITO DE UMA PROTEASE MONOCOMPONENTE SOBRE A DIGESTIBILIDADE
DE AMINOÁCIDOS E DA ENERGIA METABOLIZÁVEL DA SOJA INTEGRAL
DESATIVADA PARA FRANGOS DE CORTE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para a obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 22 de julho de 2010

Prof. Horácio Santiago Rostagno
(Coorientador)

Prof. Sérgio Luiz de Toledo Barreto
(Coorientador)

Prof. Marcelo Dias da Silva

Dr. Edwiney Sebastião Cupertino

Luiz Fernando Teixeira Albino
(Orientador)

A Deus pela vida.

Aos meus Pais, Irmãos, Tios e Avós pela confiança inabalável.

Aos Amigos que fizeram tudo isso valer a pena.

Dedico!

"A cada dia que vivo, mais me convenço de que o desperdício da vida está no amor que não damos, nas forças que não usamos, na prudência egoísta que nada arrisca e que, esquivando-nos do sofrimento, perdemos também a felicidade."

Carlos Drummond de Andrade

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus...

A Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Zootecnia pela oportunidade de cursar o Mestrado.

A CAPES e a DSM Nutritional Products pelo apoio nas pesquisas.

Ao Professor Luiz Fernando Teixeira Albino por todos os ensinamentos, amizade e toda a ajuda dada a mim até hoje.

Ao Professor Horácio Santiago Rostagno por todos os ensinamentos e conselhos ao longo deste tempo.

Aos meus pais Marcus Messias Filho e Rita de Cássia Knop Guazzi Messias, irmãos Marcus Daniel (Dé) e Luiz Henrique (Rique), minhas avós Maria Ignez e Diva, aos tios Ana Elisa (Dindinha), Alberto (Bebé), Helena (Nena), José Américo (Zezé) e Maria Cristina (Tina), aos primos Marcus (Marquinhos), Aline (Nine) e Carlo Luigi (Calu), por todo afeto, apoio, confiança, conselhos, incentivos e ajuda.

A Vô Beié pelo exemplo de vida.

A Família 38tão e a República AR-15 por todos os bons momentos vividos.

Aos funcionários do Setor de Avicultura, em especial Adriano, Elísio e José Lino por toda a ajuda dada durante os experimentos.

Aos companheiros de batalha Wagner, Gabriel, Anastácia, Carla, Fernando, Eliane, Sandra, Thony, Guilherme, Sebastian, Jorge, Valdir, Rodolfo, Rosana, João Paulo e Paulo Roberto (Viva o BOPE!).

A todos os outros amigos que de uma forma ou outra foram indispensáveis para que eu chegasse até aqui

BIOGRAFIA

Rodrigo Knop Guazzi Messias filho de Marcus Messias Filho e Rita de Cássia Knop Guazzi Messias, nasceu em Ponte Nova MG, em 23 de abril de 1984.

Em 2003 ingressou no curso de Zootecnia na Universidade Federal de Viçosa, tendo colado grau em 26 de janeiro de 2008.

Em agosto de 2008 iniciou o curso de Mestrado em Zootecnia na área de Nutrição e Produção de Monogástricos submetendo-se a defesa em 22 de julho de 2010

VIII
SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
ix	
1.INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. DIGESTÃO DA PROTEÍNA	3
2.2. FATORES QUE INFLUENCIAM NA DIGESTÃO E ABSORÇÃO	5
2.3. FATORES ANTINUTRICIONAIS.....	9
2.3.1. <i>Fitato</i>	9
2.3.2. <i>Viscosidade da dieta</i>	10
2.3.3. <i>Inibidores de proteínas</i>	12
2.3.4. <i>Fatores antinutricionais da soja crua</i>	13
2.4. USO DE ENZIMAS.....	14
2.5. ADIÇÃO DE PROTEASES.....	18
2.6. PROCESSAMENTO DA SOJA	21
CAPÍTULO 1- DIGESTIBILIDADE DE AMINOÁCIDOS E ENERGIA METABOLIZÁVEL DA SOJA INTEGRAL DESATIVADA PARA FRANGOS DE CORTE	
1.INTRODUÇÃO.....	23
2.MATERIAIS E MÉTODOS	24
2.1. EXPERIMENTO 1 – DIGESTIBILIDADE DE AMINOÁCIDOS.....	24
2.2. EXPERIMENTO 2 – DETERMINAÇÃO DOS VALORES DE ENERGIA METABOLIZÁVEL.....	27
3.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
4.CONCLUSÕES	44
5.REFERÊNCIAS.....	45

RESUMO

MESSIAS, Rodrigo Knop Guazzi, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, julho de 2010. **Efeito de uma protease monocomponente sobre a digestibilidade de aminoácidos e da energia metabolizável da soja integral desativada para frangos de corte.** Orientador, Luiz Fernando Teixeira Albino. Coorientadores: Horacio Santiago Rostagno e Sergio Luiz de Toledo Barreto.

Foram conduzidos dois experimentos no setor de avicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa com o objetivo de avaliar a digestibilidade dos aminoácidos e o valor de energia metabolizável da soja integral desativada utilizando-se uma protease. No primeiro experimento, avaliou-se a digestibilidade dos aminoácidos da soja integral desativada (SID) e de uma dieta à base de milho e de farelo de soja (dieta basal). Foram utilizados 420 pintos de corte machos, linhagem comercial Cobb, distribuídos em delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5×2 (cinco dietas suplementadas ou não com a enzima protease), totalizando dez dietas, cada uma com seis repetições de sete aves por unidade experimental. Os tratamentos consistiram das seguintes dietas: dieta isenta de proteína (DIP), DIP + SID; basal + amido; Basal + SID e Basal, todas com e sem a adição de protease. O uso da enzima protease melhorou significativamente ($P < 0,05$) a digestibilidade dos aminoácidos e da proteína bruta tanto da SID, quanto da dieta basal. No segundo experimento determinou-se os valores de energia metabolizável aparente (EMA) e de energia metabolizável aparente corrigida (EMAn) da SID. Utilizou-se 168 pintos de corte machos da linhagem comercial Cobb distribuídos em um delineamento experimental inteiramente casualizado com 4 tratamentos, 6 repetições e 7 aves por unidade experimental. Os tratamentos consistiram das seguintes dietas: Basal + SID e Basal, com e sem a adição de protease. Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) para os valores de EMA e de EMAn entre a SID e a dieta Basal com e sem a adição da enzima.

ABSTRACT

MESSIAS, Rodrigo Knop Guazzi, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa , July,2010. **Effect of a protease monocomponent on the digestibility of amino acids and metabolizable energy in a full fat soybean for Broilers.** Advisor: Luiz Fernando Teixeira Albino. Co-Advisors: Horácio Santiago Rostagno and Sérgio Toledo Barreto.

It was conducted two trials on the Avian Sector of the Department of Animal Science of Federal University of Viçosa. The aim of the first trial was to evaluate the effect of a monocomponent protease (PM) on the digestibility of amino acids in a full fat soybean (SID) and a diet based on corn and soybean meal (Basal). It was compared two methods of amino acid digestibility ascertainment, named as Method 1 and Method 2, for that were used 420 males boiler chicks of the commercial line Cobb distributed in a completely randomized design consisted of 10 treatments, 6 replicates and 7 birds per experimental unit. The used diets were as follows: Diet without Protein (DIP), DIP + SID, Basal + starch, Basal + SID and Basal, all diets with and without PM. The PM increased significantly ($P<0.05$) the digestibility of amino acids and crude protein of the SID as much as the Basal. The two methods presented statistic difference ($P<0.05$) in which the method 1 was greater than the method 2. On the second trial, it was determined the apparent metabolizable energy (EMA) and the nitrogen-corrected apparent metabolizable energy (EMAn), for that were used 168 males broiler chicks of the commercial line Cobb distributed in a completely randomized design consisted of 4 treatments, 6 replicates and 7 birds per experimental unit. It was used the following diets: Basal + SID and Basal, with and without PM. There wasn't significantly difference ($P<0.05$) on the EMA and EMAn between the diets with and without MP, although they presented a reasonable numerical difference.

1.INTRODUÇÃO

O Brasil destaca-se como o maior exportador de carne de frango, com produtos que atendem a padrões de consumo internacional, com preço competitivo, mesmo sofrendo taxações em diversos países. Esses resultados podem estar relacionados aos baixos custos de produção, uma vez que o clima propicia a criação durante todo o ano, e aos avanços nas pesquisas em nutrição, sanidade, manejo e ambiência.

O custo de produção é uma das grandes preocupações, não só na avicultura, mas em qualquer atividade agropecuária, já que sempre se trabalha com baixa lucratividade e o preço do produto é determinado pelo mercado. Assim, quanto menor o custo de produção, maior o lucro da atividade. Considerando que cerca de 75% do custo de produção é determinado pela alimentação, é necessário que se desenvolvam pesquisas visando soluções para que haja maior aproveitamento dos alimentos pelos animais.

Outra grande preocupação é a poluição ambiental causada pela atividade, pois muitas vezes os resíduos da produção contêm agentes contaminantes da água, do ar e do solo. Sabe-se, por exemplo, que dietas com grandes quantidades de proteína bruta podem aumentar a excreção de nitrogênio pelos animais, o que confirma a necessidade do estudo constante do manejo e da alimentação em busca de soluções para redução desses contaminantes. Uma solução para esse problema seria o uso de enzimas exógenas, que podem ser usadas individualmente ou em conjunto para melhorar a digestibilidade dos alimentos e permitir a inclusão de menor quantidade de nutrientes, como proteína e fósforo, nas dietas.

Dois experimentos foram realizados com os objetivos de: avaliar a influência de uma protease na digestibilidade de aminoácidos de uma dieta tradicional e de uma soja integral desativada; comparar dois métodos de determinação dessa digestibilidade; e determinar os valores de energia metabolizável da soja integral desativada com e sem o uso da protease.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Digestão da proteína

Nas aves, o papo, proventrículo, moela, pâncreas e intestino delgado têm papel ativo na digestão protéica e, apesar de essa digestão iniciar-se no proventrículo, é no esôfago e no papo que ocorre a secreção de muco que lubrifica o trato e amacia o alimento. A digestão gástrica destrói a integridade física dos alimentos e melhora a acessibilidade para a enzima. A proteólise é o primeiro estágio da digestão. A digestão ocorre no proventrículo e na moela, cujo pH é mais baixo que o do papo, do intestino delgado, do ceco e da cloaca. Esse pH baixo é muito importante para a digestão gástrica.

O proventrículo possui glândulas gástricas localizadas na mucosa, a qual contém células que secretam HCl e pepsinogênio. Em pH muito baixo, a desnaturação da proteína ocorre pelo desenovelamento das proteínas e pela clivagem das ligações peptídicas. O pepsinogênio é convertido em pepsina em pH baixo. A pepsina é uma endopeptidase, que cliva rapidamente resíduos de fenilalanina, triptofano e leucina, já os resíduos de ácido glutâmico, ácido aspártico, cistina e alanina são pontos de clivagem mais lentos. O aminoácido-alvo é clivado na extremidade nitrogênio ou carboxila (Dozier 2008).

A moela é um órgão que possui musculatura capaz de macerar a digesta facilitando a ação das enzimas do intestino delgado. No entanto, pode ocorrer refluxo para o proventrículo, exigindo maior ação das peptidases desse órgão.

O pâncreas, cuja principal função é a produção de enzimas digestivas, é formado em grande parte por células acinares que secretam, precursores de enzimas como tripsinogênio, quimotripsinogênio A, quimotripsinogênio B, proelastase e procarboxipeptidases.

A maior parte da digestão e da absorção protéica ocorre no intestino delgado, onde as enzimas secretadas pelo pâncreas “quebram” as cadeias peptídicas em cadeias menores e aminoácidos livres. O tripsinogênio é convertido em tripsina e hexopeptídeo pela ação da enteroquinase. A tripsina age sobre a arginina e a lisina na extremidade carboxila sob pH de 8 a 9 e ativa a quimotripsina A e B, elastase e carboxipepdase A e B. A quimotripsina atua sobre os resíduos de tirosina, triptofano e fenilalanina em pH de 7 a 8. A elastase atua sobre os aminoácidos alanina, glicina e serina. A carboxipeptidase A é específica para os aminoácidos neutros e aromáticos em pH em torno de 7,4. Por outro lado, a carboxipeptidase B ataca resíduos terminais de arginina e lisina. Há ainda cerca de 13 peptidases presentes na borda em escova ou no citoplasma e que complementam o processo digestivo, tendo em vista as evidências de que os oligopeptídios com seis aminoácidos ou menos seriam resistentes à hidrólise luminal (Rutz, 2002).

A maioria dos aminoácidos é absorvida na forma livre, porém nem todos eles são oriundos da proteína da digesta. Parte é proveniente da descamação natural do trato e também de resíduos de enzimas digestivas, uma vez que as células do trato digestivo das aves jovens são substituídas a cada 48 horas. Di e tripeptídeos são absorvidos pelo intestino e hidrolisados superficialmente ou intracelularmente.

Em resumo, no processo de digestão, os polipeptídios da dieta são desdobrados na moela e no proventrículo pela pepsina, os polipeptídios menores são convertidos em aminoácidos e oligopeptídeos pela tripsina, quimotripsina e pela elastase; e, no intestino delgado, os oligopeptídeos são transformados em dipeptídeos pelas carboxipeptidases e aminopeptidases para a síntese de proteína no organismo.

2.2. Fatores que influenciam na digestão e absorção

Os nutrientes presentes nos alimentos, determinados por meio da análise química, não são totalmente disponíveis para os animais. O desempenho dos animais depende da disponibilidade dos nutrientes e da intensidade como são absorvidos e utilizados (Torres, 2003). De acordo com Bedford (1996), o nutriente é disponível se puder ser usado nas funções metabólicas do organismo ao chegar ao tecido vivo do animal e seu perfeito aproveitamento depende de diversos fatores, inclusive de sua digestibilidade.

São muitos os fatores que influenciam a digestão e absorção protéica, entre eles, o gradiente de concentração, uma vez que a maioria dos aminoácidos é absorvida por transporte ativo; a competição por sítio de transporte; a presença de fatores antinutricionais; e a condição física dos animais. Normalmente nutrientes não são totalmente absorvidos e digeridos, e as diferenças podem ocorrer mesmo entre diferentes amostras de um mesmo ingrediente. Essas diferenças podem ser ocasionadas pelo conteúdo de fibras e de substâncias antinutricionais, como antitripsinas e lectinas, de polissacarídeos não-amiláceos e de ácido fítico, pelo tratamento térmico do ingrediente ou pela presença de um nutriente em forma menos digestível (amilose × amilopectina) (Viana 2009).

Alguns alimentos têm maior ou menor disponibilidade de nutrientes, o que pode resultar em variação significativa na digestibilidade entre diferentes amostras de um mesmo alimento. A disponibilidade deveria ser uma característica do alimento independente do animal que o consome, porém há algumas interações animal/alimento que não podem ser ignoradas, pois

influenciam na disponibilidade dos nutrientes (Albino, 1991). Entre as causas de variação na disponibilidade de nutrientes entre os animais, está a atividade microbiana no lúmen do intestino, a ação das enzimas endógenas dos animais, a influência da temperatura ambiente, a taxa de passagem do alimento pelo trato digestivo, a espécie, a raça, a linhagem, a idade, o peso, o consumo de ração e de água e a saúde dos animais.

Segundo Misir & Sauer (1982), a digestibilidade aparente pode ser superestimada quando o amido é altamente digestível e subestimada quando é menos digestível. Portanto, a fonte de carboidratos da dieta é um dos fatores que influenciam a digestibilidade aparente, uma vez que a utilização de fibra na dieta proporcionará maior nível de energia disponível para os microrganismos no intestino grosso.

Inicialmente, acreditava-se que os aminoácidos eram transportados por simples difusão, mas essa hipótese foi logo abandonada quando se percebeu a existência de estereoespecificidade, ou seja, que os L-isômeros eram absorvidos contra um gradiente de concentração, enquanto os D-isômeros não tinham essa capacidade. Mais tarde, descobriu-se que, na verdade, os L-aminoácidos são absorvidos mais rapidamente que os D-aminoácidos; além disso, os aminoácidos neutros são absorvidos mais rapidamente que os básicos e os ácidos.

Na parte mais inicial do intestino (duodeno), a digestão protéica ainda não é completa, portanto a absorção é mínima, visto que a proteína endógena é mais lentamente digerida, enquanto a porção distal do intestino delgado possui maior importância na absorção de aminoácidos. Nas aves, a maior parte dos carreadores encontra-se na porção ileal do intestino delgado, parte onde ocorre maior absorção. Todavia, isso não é verdadeiro para a parte mais

distal do íleo, pois, quando a digesta chega a essa parte, a maioria dos aminoácidos já foi absorvida.

Acredita-se que existem três sistemas de transporte de aminoácidos, um para cada tipo, ou seja, um para aminoácidos básicos, outro para os neutros e outro para os ácidos. Nesses sistemas, parecem existir subsistemas: por exemplo, dentro dos aminoácidos neutros, existe um subsistema exclusivo para glicina, outro para metionina e aminoácidos alifáticos e um terceiro para os demais aminoácidos. O transporte ativo envolvendo sódio, ou transporte ativo secundário, não é responsável pelo transporte apenas de aminoácidos, mas também de açúcares, porém é difícil demonstrar a dependência de sódio para a absorção de aminoácidos *in vivo*, visto que esse mineral se difunde facilmente pela parede intestinal e a dependência não é homogênea, ou seja, aminoácidos ácidos são menos dependentes de sódio que os neutros, que, por sua vez, são menos dependentes que os aminoácidos básicos.

Açúcares podem atuar inibindo ou estimulando a absorção de aminoácidos, uma vez que os não-metabolizáveis dependem de transporte ativo e tendem a inibir a absorção, porém os açúcares metabolizáveis tendem a estimular, especialmente em casos de alta demanda de energia pelo organismo. Segundo Rutz (2002), existem várias teorias para explicar a natureza das interações:

- 1) Presença de um carreador com sítios de ligação para vários solutos a serem transportados. O transporte seria inibido alostericamente, quando da ligação de um nutriente a ser transportado.
- 2) A inibição ocorre por competição dos nutrientes por uma fonte energética comum, visto que esses processos dependem de energia.

3) O gradiente de sódio é responsável direto pelo transporte ativo.

Uma vez que o transporte de aminoácidos depende de proteínas de membrana, fatores que interfiram na produção dessas proteínas irão afetar a absorção dos aminoácidos. Por exemplo, baixos níveis das vitaminas B6, D e E e de tiamina reduzem a velocidade do transporte de aminoácidos em aves.

Alguns antibióticos, como oligomicina e ciclohexamina, inibem a absorção de aminoácidos, porém a penicilina estimula a absorção de lisina e a clortetraciclina leva à absorção de L-arginina, DL-valina, L-histidina DL-leucina, DL-lisina, DL-metionina, DL-fenilalanina e DL-treonina. A restrição alimentar estimula a absorção de aminoácidos, assim como a inclusão de altos níveis de aminoácidos na dieta. A absorção tende a diminuir com o avançar da idade, do mesmo modo que longos períodos de restrição hídrica diminuem a absorção de alguns aminoácidos, como a metionina. As condições sanitárias também influenciam na absorção dos aminoácidos.

Como dito, a idade do animal afeta a absorção dos aminoácidos. Logo após a eclosão, a mucosa intestinal de pintinhos encontra-se delgada, permitindo a absorção até de proteínas intactas (anticorpos maternos presentes na gema), um processo associado à proteção imunológica. Todavia, essa capacidade logo é cessada com o desenvolvimento da parede intestinal e com o aumento da capacidade digestiva do animal.

A absorção de peptídeos e aminoácidos ocorre em velocidades diferentes, já que é feita em transportadores diferentes e que o transporte de peptídeos é mais rápido.

2.3. Fatores antinutricionais

Em dietas para aves, normalmente dois ou três ingredientes compõem pelo menos 90% da ração: o milho é o alimento mais usado para o fornecimento de energia e o farelo de soja para o fornecimento de proteína. É comum ainda a utilização de subprodutos industriais que, no entanto, podem conter fatores antinutricionais, prejudiciais ao desempenho mesmo quando em pequenas quantidades.

Os fatores antinutricionais podem ter vários efeitos, como a redução da digestibilidade, caso estejam em quantidades mais representativas. São, na verdade, compostos produzidos pelas plantas para proteção natural contra fungos, bactérias, insetos, pássaros e mamíferos que possam atacá-las, uma vez que podem causar distúrbios digestivos nesses inimigos naturais. Esses fatores não são tóxicos aos animais, mas provocam distúrbios digestivos, diminuindo a digestibilidade dos alimentos e o ganho de peso dos animais, piorando a conversão alimentar e aumentando a excreção de nutrientes, o que é prejudicial ao ambiente. Em alguns casos, essas substâncias podem causar lesões nos órgãos digestivos dos animais.

2.3.1. Fitato

O fitato está presente em todos os ingredientes de origem vegetal e funciona como reserva fosfórica durante o processo de germinação das sementes. É uma molécula polianiónica com potencial para quelatar nutrientes positivamente carregados, o que caracteriza sua propriedade antinutricional, comprometendo a utilização de proteínas, energia, cálcio e minerais-traço (Selle & Ravindran, 2007). Fitato é o sal formado pelo ácido fítico, quando este se liga a íons de sódio, magnésio, potássio, cálcio e zinco, entre outros. Os minerais e determinados

nutrientes, uma vez ligados à molécula de ácido fítico, tornam-se indisponíveis ao animal, ou seja, não são solubilizados. Em geral, os cereais e as sementes de leguminosas usadas na alimentação de aves apresentam quantidades de fitatos que podem afetar o desempenho animal (Maenz, 2001, citado por Dari, 2004).

A redução da digestibilidade protéica pode ser explicada pela formação de complexos entre o ácido fítico e as proteínas da dieta ou ainda se complexar a enzimas proteolíticas (tripsina e pepsina), inibindo sua atividade. Na digestão de lipídeos totais da digesta, o complexo cálcio-fitato pode reagir com ácidos graxos formando sabões insolúveis no lúmen intestinal. Na digestão de carboidratos, liga-se diretamente ao amido ou inibe a ação da amilase, contudo essa ação ainda é um pouco discutida entre estudiosos da área.

2.3.2. Viscosidade da dieta

Os polissacarídeos não-amiláceos (PNA) são carboidratos que aumentam a viscosidade das dietas por sua capacidade de ligar-se a grandes quantidades de água formando um gel viscoso (Santos Jr. et al., 2004), o que diminui a taxa de difusão de substratos e enzimas digestivas e impede suas interações na superfície da mucosa intestinal (Choct, 2001), comprometendo a digestão e absorção de nutrientes. Além disso, a viscosidade da digesta interfere na microflora intestinal e nas funções fisiológicas do intestino (Choct et al., 2004).

O termo PNA inclui grande extensão de moléculas de polissacarídios, com exceção do amido. Os polissacarídeos não-amiláceos dividem-se em três grandes grupos: celulose, polímeros não-celulósicos (pentosanos, arabinoxilanos, xilanos, β -glucanos) e polissacarídeos pécticos (glicomananos, galactomananos, arabinanos, xiloglucanos e galactanos), entre outras moléculas.

Para reduzir a viscosidade do conteúdo digestivo, é necessário que os polissacarídeos não-amiláceos solúveis sejam decompostos em pequenas unidades pela ação enzimática, perdendo assim a capacidade de retenção de água. Com a redução da viscosidade, a ação enzimática sobre o conteúdo intestinal é mais eficaz, o que melhora a capacidade de digestão dos nutrientes, aumenta a velocidade de trânsito intestinal e reduz a quantidade de água nas fezes, resultando em melhor qualidade da cama (Opalinski, 2006).

O mecanismo de ação dos polissacarídeos não-amiláceos solúveis como fatores antinutricionais em dietas para frangos de corte e o efeito da suplementação de enzimas exógenas nessas dietas foram investigados por Choct et al. (1996), que priorizaram o estudo da inter-relação entre viscosidade da digesta e fermentação ao longo do intestino. O aumento dos níveis de PNA solúveis aumentou a viscosidade da digesta e reduziu a energia metabolizável da dieta, diminuindo o ganho de peso e piorando a conversão alimentar. A suplementação enzimática das dietas que possuíam PNA solúveis reverteu os efeitos adversos, aumentando a energia metabolizável e melhorando o desempenho dos frangos. Esses autores observaram intensa fermentação no intestino delgado nas aves que receberam as dietas enriquecidas com PNA solúveis, que foi contornada com a suplementação de enzimas exógenas. Concluíram que a fermentação no intestino delgado das aves aumenta na presença de grandes quantidades de PNA solúveis na dieta, o que prejudica o desempenho e o bem-estar das aves, já que o odor de amônia nos galpões de produção é alto, no entanto esses efeitos deletérios podem ser amenizados com a utilização de enzimas exógenas.

Han (1997) observou significativa redução da viscosidade da digesta no jejuno de aves alimentadas com dietas à base de cevada suplementadas com 0,1% de enzimas. Estudando o

efeito três marcas comerciais de xilanase, cada uma com sua especificidade (A, B e C, com afinidade por PNA solúveis e insolúveis; PNA insolúveis; e PNA solúveis, respectivamente), Choct et al. (2004) verificaram que somente as xilanases A e C foram efetivas na redução da viscosidade de digesta. Todavia, apesar de a adição da xilanase B não ter reduzido a viscosidade, o desempenho dos frangos melhorou, evidenciando que a viscosidade da digesta não pode ser usada como único indicador de efeito antinutricional dos polissacarídeos não-amiláceos em dietas para aves.

Nagaraj et al. (2007) estudaram os efeitos da suplementação de enzimas em dietas para frangos de corte sobre a redução da incidência de pododermatite em frangos e verificaram menor viscosidade da digesta nas aves sob suplementação. Os autores relacionaram positivamente a redução da viscosidade da digesta com a redução da umidade da cama e a menor incidência de lesões nas aves mais velhas e concluíram que a suplementação enzimática das dietas pode ser uma estratégia no controle da pododermatite.

2.3.3. Inibidores de proteínas

Inibidores de proteína são peptídeos capazes de se complexar a enzimas pancreáticas tornando-as inativas. Podem ser classificados em 13 famílias: seis delas originadas das plantas e apenas duas com algum efeito importante no desempenho animal. Os inibidores competem com o substrato pela enzima e, ao se complexarem, deixam a enzima totalmente inativa.

Como dito anteriormente, apenas dois inibidores possuem efeito importante ao desempenho animal, eles são: Kunitz e Bowman-Birk, que constituem aproximadamente 6% da proteína bruta da soja. O inibidor Kunitz tem peso molecular próximo de 20000 com duas pontes

dissulfeto e especificidade pela tripsina e é mais sensível ao tratamento térmico. O inibidor Bowman-Britz tem peso molecular por volta de 8000 e sete pontes dissulfeto, podendo se ligar tanto à tripsina quanto à quimotripsina e é mais termoestável que o Kunitz.

A redução do crescimento é causada pela redução da digestibilidade da proteína da dieta. Segundo Silva & Smithard (2002), os inibidores de proteína inativam as enzimas pancreáticas, forçando maior produção dessas enzimas endógenas pelo pâncreas e provocando aumento do volume desse órgão.

2.3.4. Fatores antinutricionais da soja crua

Segundo Said (s.d.), a soja crua deve ser processada para ser utilizada na alimentação de suínos e aves porque contém substâncias tóxicas que podem ser prejudiciais aos animais. Os principais fatores antinutricionais que devem ser considerados são: a) inibidores de tripsina e quimotripsina, que inibem a digestão protéica; b) lectinas, cujo principal modo de ação é combinar-se com as células da parede intestinal e, com isso, causam interferência não-específica na absorção de nutrientes (Jaffé, 1980); c) fatores alérgicos (glicinina e β -conglucina), que reduzem a absorção de nutrientes e têm efeitos deletérios sobre as microvilosidades do intestino delgado; d) lipase e lipoxigenase, que promovem a oxidação e rancificação da gordura da soja; e) polissacarídeos não-amiláceos solúveis (PNA), que causam redução no desempenho dos animais.

As enzimas existentes têm ação limitada no auxílio à digestão durante o tempo de trânsito de alimentos em suínos e aves (Marsman et al., 1997). Portanto, pesquisas devem se concentrar na obtenção dessas enzimas melhoradas ou modificações no processamento da soja para aumento da energia metabolizável do farelo de soja (Choct, 1997).

2.4. Uso de enzimas

Enzimas são proteínas globulares, de estrutura terciária ou quaternária, que agem como catalisadores biológicos, aumentando a velocidade das reações no organismo, sem serem alteradas neste processo (Champe & Harvey, 1989; Fireman & Fireman, 1998). As enzimas digestivas têm um sítio ativo que permite suas atuações na ruptura de determinada ligação química (Penz Jr., 1998) e somente atuam em condições específicas de temperatura, pH e umidade (Bühler et al., 1998).

As enzimas digestivas são substratos dependentes, ou seja, a secreção enzimática é ativada pela presença do substrato, por isso, as aves têm deficiência de enzimas nas primeiras semanas de idade. Esse fenômeno ocorre em todos os animais, mas existem enzimas que não são secretadas mesmo na presença de substrato (celulolase, hemicelulase, pentonase, β -glucanase, xilanase, galactosidase e fitase), pois o código genético das aves não dispõe da indicação para sua síntese (Viana 2009).

Para maior atividade, existe para cada enzima um ambiente ótimo, uma vez que a ação das enzimas é controlada, entre outros fatores por temperatura, pH e viscosidade do meio. Viveiros et al. (1994) avaliaram a estabilidade de enzimas autoclavadas a temperaturas de 50 a 90°C e não observaram perda da atividade enzimática, fato que atribuíram à própria resistência da enzima ou à proteção oferecida pelo material usado na autoclavagem. No entanto, Gary (1995) avaliando os efeitos de temperaturas de peletização entre 60 e 90°C sobre a atividade das enzimas celulase, pentosanase, amilase bacteriana e amilase fúngica, observaram que, à medida que se aumenta a temperatura, a eficiência das enzimas é reduzida.

O estudo das enzimas iniciou-se em 1857, quando Louis Pasteur notou existir relação entre a fermentação e a atividade biológica de leveduras. Mais tarde, Takamine Iogró descobriu que poderia produzir carboidrases e proteases a partir do fungo *Aspergillus oryzae*, no entanto, foi somente na II Guerra Mundial que as pesquisas expandiram com a produção de antibióticos. Na década de 1950, as enzimas começaram a ser estudadas na Universidade Estadual de Washington – USA como alternativa para diminuir o excesso de umidade em cama de frangos alimentados com cereais ricos em polissacarídeos estruturais, uma vez que esses polissacarídeos aumentam a viscosidade, dificultando a ação das enzimas endógenas e reduzindo a digestibilidade, o que aumenta o volume e excretas com excesso de umidade. Os países europeus começaram a despontar nas pesquisas com enzimas na década de 1960, já que a cevada era a principal fonte de energia que utilizavam em rações para monogástricos. Assim, descobriu-se que ingredientes de origem vegetal possuem compostos que podem se complexar com nutrientes reduzindo, ou até mesmo impossibilitando sua digestão. Esses compostos passaram a ser chamados fatores antinutricionais (Sebastian et al., 1996).

Na década de 1990, começou a se propor o uso de enzimas em dietas à base de alimentos altamente digestíveis, como milho, farelo de soja e sorgo, no intuito de aumentar ainda mais sua digestibilidade e permitir o uso de alimentos alternativos, podendo assim reduzir os níveis nutricionais e diminuir o custo de produção (Bedford, 1996).

Atualmente, já é realidade no Brasil a utilização de vários complexos enzimáticos derivados de fermentação microbiana em dietas de baixa viscosidade, à base de milho e farelo de soja. Segundo Sheppy (2001), existem quatro principais razões para a utilização de enzimas na nutrição animal:

- anular o efeito antinutricional de alguns alimentos, pois os componentes antinutricionais não são susceptíveis à ação de enzimas endógenas e podem interferir na digestão normal dos alimentos, prejudicar o desenvolvimento do animal e causar distúrbios digestíveis;
- aumentar a disponibilidade de proteínas e minerais inacessíveis ao animal, ou seja, protegidos pelas paredes celulares de fibras com baixa digestibilidade ou sob formas químicas que impedem seu aproveitamento;
- quebrar ligações químicas específicas que não permitem às enzimas digestivas endógenas disponibilizar determinados nutrientes que seriam eliminados nas excretas;
- auxiliar animais jovens, que, devido à imaturidade do sistema digestivo, podem apresentar produção enzimática endógena inadequada.

De acordo com Classen & Bedford (1991), a estrutura molecular das enzimas é bastante frágil e pode ser desnaturada por calor, ácidos, vitaminas, minerais, metais pesados e por agentes oxidantes, a maioria encontrada nos premixes. Por essa razão, existe a preocupação de que as enzimas utilizadas na alimentação animal possam manter nível de atividade suficiente para promover respostas significativas.

Um fator que contribui para a atividade das enzimas são os íons metálicos. Algumas enzimas são classificadas como metal-enzimas e exigem íons-metals para sua atividade e estabilidade. Sabe-se que as proteases neutras exigem zinco e as amilases bacterianas, cálcio. Outros íons metálicos podem ter propriedades inibidoras significativas para muitas enzimas. O chumbo e os íons de cobre são altamente inibidores para α -amilase fúngica, enquanto o zinco, o níquel e os íons ferrosos afetam apenas levemente sua atividade (Viana 2009).

Além disso, de acordo com Classen & Bedford (1991), durante o seu processamento, realiza-se prévia seleção de cepas produtoras de enzimas mais resistentes às condições adversas do trato digestivo das aves.

As técnicas de biologia molecular tornaram o uso de enzimas exógenas economicamente viável, com isso, sua utilização em dietas avícolas tem sido considerada uma alternativa para redução de custos e aumento da eficiência da produção.

As enzimas comercialmente produzidas geralmente são provenientes de bactérias do gênero *Bacillus* sp ou de fungos do gênero *Aspergillus* sp (Fireman & Fireman, 1998), portanto, os microrganismos são a principal fonte de enzimas exógenas. As enzimas, também conhecidas como aditivos alimentares, têm sido incorporadas aos alimentos dos animais com o propósito de melhorar seu desempenho e sua rentabilidade. Essas substâncias têm como característica central o fato de não agirem como nutrientes (Peixoto & Maier, 1993). Atualmente, no mercado, existem enzimas destinadas a rações para animais e que contêm matérias-primas alternativas (trigo, cevada e triticale) e alimentos tradicionalmente utilizados (milho e farelo de soja).

O grau de melhora a ser obtido pela adição de enzimas à dieta depende de vários fatores, como o tipo e a quantidade de cereal, o nível do fator antinutricional presente nessa dieta, o espectro e a concentração das enzimas utilizadas, a espécie (aves respondem melhor à inclusão de enzimas na dieta que suínos) e a idade do animal (animais jovens são mais responsivos ao tratamento com enzimas que os mais velhos) (Marquardt, 1997).

2.5. Adição de proteases

Muitos tipos de proteínas podem passar intactos pelo intestino delgado, servindo como substrato para microrganismos maléficos, aumentando sua população e diminuindo a absorção de nutrientes em geral. Além disso, o nitrogênio não absorvido no trato é excretado, aumentando a poluição ambiental e piorando a qualidade do ar no interior das instalações, fato que justificam os estudos sobre a utilização de proteases em dietas de frango de corte.

As proteases utilizadas geralmente são produzidas por plantas e/ou microrganismos. Os microrganismos são excelente fonte de proteases, por sua variedade bioquímica e facilidade de manipulação genética. Numerosas proteases são produzidas por microrganismos distintos, dependendo da espécie, ou até mesmo de cepas dentro da mesma espécie, uma vez que uma mesma cepa pode produzir diferentes proteases de acordo com as condições em que são manipuladas.

A suplementação enzimática de protease nas rações pode ser usada com o objetivo de reduzir a proteína dietética e proporcionar o mesmo desempenho dos frangos de corte (Yu et al., 2007). Em dietas com menor teor de proteína, porém com perfil de aminoácidos equilibrado, é possível que a excreção de nitrogênio no ambiente diminua com a redução do uso de alimentos protéicos da ração, o que ainda tem a vantagem de reduzir os custos de produção.

Segundo Olukosi et al. (2007), a resposta dos animais à inclusão de enzimas depende dos alimentos utilizados e da idade do animal, pois, em animais mais jovens, o uso de enzimas tende a ser mais benéfico, pois o sistema digestivo desses animais ainda está em desenvolvimento e sua capacidade digestiva natural é mais baixa. Yu et al. (2007) afirmaram que um importante

pressuposto na seleção de uma enzima exógena é que os resultados *in vitro* possam ser reproduzidos nos animais. Por exemplo, a bromelina é uma protease encontrada em plantas e que tem a mesma atividade proteolítica da produzida por *Streptomyces caespitosus* quando se utilizam caseína, farelo de soja, glúten de milho ou farinha de peixe como substrato em testes *in vitro* (Lee et al., 2000), no entanto, de acordo com Yu et al. (2007), a estabilidade dessa enzima no trato gastrointestinal é questionável, pois a bromelina não melhorou o desempenho de frangos de corte.

Ghazi et al. (2002) observaram que a adição de fontes de protease poderia aumentar a energia metabolizável verdadeira e a digestibilidade de nitrogênio em frangos, com grandes diferenças entre as fontes de protease. Ghazi et al. (1997) notaram melhora no desempenho de frangos de corte quando incluíram uma protease específica (isolada a partir de cepas de *Aspergillus*) em uma ração à base de farelo de soja. No entanto, o desempenho das aves não melhorou quando se utilizou outra protease específica, isolada a partir de cepas de *Bacillus*. As proteases ainda podem ser usadas para melhorar a degradação de proteínas, como glicinina e β -conglucina, e de alguns fatores antinutricionais, como lectina e antitripsina do farelo de soja processado de forma inadequada.

A suplementação enzimática pode trazer maiores benefícios quando se utiliza um coquetel ou um complexo enzimático em vez de apenas uma enzima. Segundo Jaroni et al. (1999), a adição de proteases juntamente com enzimas que degradem polissacarídeos não-amiláceos tem sido sugerida porque as proteínas são importantes pontos de ligação para os arabinosilanos. Assim, enzimas capazes de quebrar essas ligações podem aumentar a liberação de pentosanas. Pettersson & Aman (1989) observaram diminuição da viscosidade quando

adicionaram protease e xilanase em uma dieta à base de centeio, trigo, farinha de peixe e farinha de carne e ossos para frangos de corte.

Olukosi et al. (2007) observaram que a utilização de um complexo enzimático à base de xilanase, amilase e protease melhorou a digestibilidade do nitrogênio em comparação a uma ração à base de milho e farelo de soja com deficiência de cálcio, fósforo e energia metabolizável, contudo, o nitrogênio teve uma digestibilidade inferior quando se adicionou este complexo enzimático a uma ração à base de milho e farelo de soja que atendeu às exigências nutricionais.

Rodrigues et al. (2003) estudaram o efeito da adição de complexo enzimático (protease, xilanase e amilase) sobre a digestibilidade de nutrientes em rações contendo milho de diferentes regiões para frangos de corte. Embora a procedência das amostras de milho — cujos teores de proteína bruta eram diferentes — tenha influenciado o ganho de peso e a conversão alimentar, os autores verificaram melhora na digestibilidade ileal da proteína bruta, do aminoácido e da energia digestível ileal das rações contendo complexo enzimático.

Em leitões, a função pancreática aumenta na terceira semana de idade, enquanto a amilase e a protease, presentes em baixas quantidades no nascimento, tendem a aumentar de acordo com a idade do animal, porém o desmame repentino na terceira ou quarta semana de vida provoca queda na produção enzimática (Lindeman et al., 1986). A utilização de produtos enzimáticos, como proteases e amilases, na alimentação de suínos tem melhorado a digestibilidade da matéria seca e do nitrogênio de rações à base de milho e farelo de soja para leitões durante as três primeiras semanas após a desmama (Easter, 1988).

2.6. Processamento da soja

O Brasil é um dos maiores produtores de soja do mundo e grande parte dessa produção é destinada à alimentação animal, principalmente na forma de farelo, um subproduto da produção de óleo. Todavia, devido à sua excelente qualidade nutricional atribuída ao seu alto teor proteico e energético, a soja integral tem sido largamente estudada para ser introduzida na alimentação de aves e suínos. Contudo, para expressar todo o seu valor nutricional, deve passar por algum tipo de processamento para inativação de seus fatores antinutricionais, como as hemaglutininas ou lectinas, inibidores de proteases ou antitripsínico.

Existem sete métodos de processamento da soja integral: tostagem em tambor rotativo; tostagem por vapor úmido; tostagem por vapor seco; tostagem por “Jet sploder”; micronização; extrusão seca ou úmida; e microondas (Brito 2003). A extrusão é um tipo de processamento no qual a parede celular é rompida, promovendo maior exposição dos nutrientes, que provoca a gelatinização do amido, a desnaturação das proteínas e o cisalhamento e reestruturação de produtos expandidos dispensando a moagem do produto. A tostagem é o cozimento feito por meio de alguma fonte de calor, durante período de tempo variável conforme o tipo de equipamento utilizado, e que exige a moagem do produto final. Na micronização a soja crua é submetida a aquecimento por vapor indireto a temperatura próxima de 165°C por 2 a 3 minutos; a casca do grão é retirada e o grão descascado é submetido a um processo de moagem por rolos (micronização) até atingir granulometria de 30 microns.

O processamento do grão afeta diretamente a disponibilidade dos nutrientes, pois a inativação da atividade do componente inibidor da tripsina pelo tratamento térmico é acompanhada pelo aumento concomitante na taxa de utilização da proteína.

Tanto a tostagem quanto a extrusão aumentam a exposição das proteínas, facilitando a ação das enzimas proteolíticas, o que poderia facilitar a digestão dos nutrientes. Outro benefício é a liberação de tocoferóis que atuam como oxidantes naturais, o que é muito importante devido ao alto teor de extrato etéreo da soja integral, portanto o tipo de processamento influencia diretamente a qualidade do produto. Marsman (1997), em pesquisa com frangos de corte de 1 a 21 dias de idade, observou que, nas aves alimentadas com as dietas formuladas com soja extrusada, a digestibilidade da proteína, do amido e dos polissacarídeos não-amiláceos foi significativamente maior que naquelas alimentadas com dietas formuladas com soja tostada.

CAPÍTULO 1- DIGESTIBILIDADE DE AMINOÁCIDOS E ENERGIA METABOLIZÁVEL DA SOJA INTEGRAL DESATIVADA PARA FRANGOS DE CORTE

1. INTRODUÇÃO

Do início do Século XX até os dias atuais, a avicultura evoluiu expressivamente, saindo de um sistema artesanal e de subsistência para um modelo industrializado, altamente tecnificado, onde é possível produzir um frango saudável e pesado em pouco tempo em uma área pequena e com baixo custo de produção.

Essa evolução é resultado do avanço nas áreas de nutrição, melhoramento genético, manejo, sanidade e ambiência, que, além da extrema organização da cadeia, tornaram viável a criação de frangos de corte. Nesse contexto evolutivo da produção, o Brasil destaca-se como o maior exportador mundial de carne de frango e, como a carne de frango tem preço acessível e excelentes características nutricionais, é hoje a carne mais consumida no País.

Considerando que a nutrição é responsável pela maior parte dos custos de produção, é imprescindível a realização de pesquisas para melhorar as características nutricionais dos alimentos utilizados em dietas para frangos de corte, principalmente dos alimentos alternativos. Uma das alternativas seria o uso de enzimas exógenas, que podem melhorar a digestibilidade de alguns nutrientes dos alimentos, possibilitando seu uso em dietas com deficiência desses nutrientes, tornando-as mais baratas e reduzindo a excreção de agentes contaminantes pelos animais.

Assim, objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito de uma protease monocomponente sobre a digestibilidade de aminoácidos e da energia metabolizável da soja integral desativada.

2. Materiais e Métodos

2.1. Experimento 1 – Digestibilidade de aminoácidos

O experimento foi realizado nas instalações do setor de avicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. As temperaturas médias mínimas e máximas no período experimental foram 19 e 27°C, respectivamente, e a temperatura média total, 23°C.

Foram utilizados 420 pintos de corte machos, linhagem comercial Cobb, na fase de 12 a 22 dias de idade. Os animais foram distribuídos em delineamento inteiramente ao acaso, em fatorial 5×2 , composto de cinco dietas com e sem a adição de enzima, totalizando dez dietas, cada uma avaliada com seis repetições de sete aves por unidade experimental (Tabela 1). A enzima utilizada foi uma protease comercial, monocomponente, constituída de 75000 PROT/g de uma protease produzida utilizando-se *Bacillus licheniformis* e adicionada em 200 g/t de ração. Uma unidade de atividade da enzima (PROT) é a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol por minuto de p-nitroanilina a partir do substrato (Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA) em pH 9.0 e temperatura de 37°C.

A soja integral desativada (SID) apresentava em sua composição 88,31% de matéria seca, 35,95% de proteína bruta, 77,87% de solubilidade em KOH, 0,04 de atividade ureática e 5.168 kcal de energia Bruta/kg de matéria natural.

Quadro 1 – Dietas experimentais

	Sem enzima		Com enzima
Dieta 1	Dieta isenta de proteína (DIP)	Dieta 6	DIP
Dieta 2	DIP + soja integral desativada	Dieta 7	DIP + soja integral desativada
Dieta 3	Basal + amido	Dieta 8	Basal + amido
Dieta 4	Basal + soja integral desativada	Dieta 9	Basal + soja integral desativada
Dieta 5	Basal	Dieta 10	Basal

As aves foram alojadas em galpão de alvenaria com piso coberto com maravalha, onde receberam ração comercial que atendia às recomendações de Rostagno et al. (2005). Aos 12 dias de idade, foram transferidas para baterias metálicas com compartimentos distribuídos em dois andares, dispostas em uma sala de 68 m², com pé-direito de aproximadamente 2,8 m e janelas grandes de vidro. As aves receberam luz natural e/ou artificial por 24 horas, além de uma fonte de calor para mantê-las em conforto térmico. As aves tiveram ainda água e alimento à vontade.

Ao final do período experimental, cuja duração foi de dez dias, as aves foram abatidas por deslocamento cervical e imediatamente seccionadas para obtenção da digesta ileal da porção ileoterminal. Por meio de leve pressão com os dedos indicador e polegar, foi coletada a digesta anterior 5 cm à junção ileocecólica até 25 cm em direção anterior ou em direção ao jejuno. O conteúdo de cada repetição foi colocado em pote plástico devidamente identificado e imediatamente armazenado a uma temperatura de -40°C por 72 horas. Em seguida, as amostras foram moídas em moinho tipo bola e enviadas para análise e determinação do conteúdo de matéria seca, proteína, aminoácidos e cinza ácido insolúvel.

Tabela 1 - Composição das dietas experimentais

Ingrediente	Dieta				
	DIP	DIP + SID	Basal	Basal + SID	Basal + amido
Amido	81,01	51,01	-	-	30,00
Soja integral desativada	-	30,00	-	30,00	-
Dieta basal	-	-	-	70,00	70,00
Açúcar	5,00	5,00	-	-	-
Milho	-	-	57,16	-	-
Farelo de soja	-	-	36,00	-	-
Óleo de soja	5,00	5,00	2,00	-	-
Fosfato bicálcico	2,10	2,10	1,85	-	-
Calcário	1,00	1,00	0,90	-	-
Sal	0,45	0,45	0,45	-	-
Sabugo de milho	4,00	4,00	-	-	-
L-lisina HCl 99%	-	-	0,11	-	-
DL-metionina 99%	-	-	0,23	-	-
L-treonina 98%	-	-	0,04	-	-
Premix mineral ¹	0,08	0,08	0,05	-	-
Premix vitamínico ²	0,15	0,15	0,10	-	-
Cloreto de colina	0,20	0,20	0,10	-	-
Antioxidante (BHT)	0,01	0,01	0,01	-	-
Cinza ácida insolúvel (Celite™)	1,00	1,00	1,00	-	-
Total	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

¹ Manganês - 80,0 mg; ferro - 50,0 mg; zinco - 50,0 mg; cobre - 10,0 mg; cobalto - 1,0 mg; iodo - 1,0 mg.

² Vitamina A - 10.000 UI; vitamina D3 - 2.000 UI; vitamina E - 30 UI; vitamina B1 - 2,0 mg; vitamina B6 - 4,0 mg; ácido pantotênico - 12,0 mg; biotina - 0,10 mg; vitamina K3 - 3,0 mg; ácido fólico - 1,0 mg; ácido nicotínico - 50,0 mg; vitamina B12 - 15 mcg; selênio - 0,25 mg.

Após a obtenção dos resultados laboratoriais, foram calculados os coeficientes de digestibilidade por dois métodos:

Método 1: método tradicional da Dieta isenta de Proteína, no qual a soja integral substitui parte do amido. Os cálculos para determinação do fator de indigestibilidade foram feitos de acordo com as seguintes fórmulas:

$$FI1 = \frac{[\text{Cinza Ácida Insolúvel}] \text{ na dieta teste}}{[\text{Cinza Ácida Insolúvel}] \text{ na amostra}}$$

FI2= [Cinza Ácida Insolúvel] na DIP/ [Cinza Ácida Insolúvel] na amostra

Os coeficientes de digestibilidade ileal (CDI) dos aminoácidos e da proteína foram determinados utilizando as seguintes fórmulas:

$$\text{CDI aparente} = \frac{(\% \text{ do AA na dieta} - (\% \text{ do aminoácido na digesta} \times \text{FI1})) \times 100}{\% \text{ AA na dieta}}$$

$$\text{CDI verdadeira} = \frac{(\% \text{ AA na dieta} - ((\% \text{ AA na digesta} \times \text{FI1}) - (\text{AA endogeno} \times \text{FI2})) \times 100}{\% \text{ AA na dieta}}$$

Método 2: considerou-se a dieta basal + amido como dieta-referência e utilizou a soja integral desativada em substituição ao amido. A digestibilidade dos aminoácidos da soja integral foi obtida por diferença.

$$\text{DDB} = (\text{digestibilidade da dieta basal} + \text{amido}) \times \% \text{ dieta basal}$$

$$\text{DSID} = (\text{digestibilidade da dieta basal} + \text{soja integral desativada}) - \text{DDB}$$

em que:

DDB = digestibilidade da dieta basal.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e caso a interação fosse significativa, ao teste de média pelo teste Student-Newman-Keul's usando o programa estatístico SAEG (2000).

2.2. Experimento 2 – Determinação dos valores de energia metabolizável

Foi realizado um ensaio biológico no setor de avicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, com a finalidade de determinar os valores de

energia metabolizável aparente (EMA) e energia metabolizável aparente corrigida (EMAn) da soja integral desativada com e sem o uso de uma protease monocomponente.

Para avaliação da composição energética dos alimentos avaliados, foram realizadas análises para determinação dos teores de matéria seca, energia bruta e nitrogênio no Laboratório de Nutrição Animal de Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, segundo técnicas descritas por Silva (1990).

Os valores de energia metabolizável foram determinados pelo método de coleta total de excretas utilizando-se pintos em crescimento no período de 12 a 22 dias de idade. Os pintos foram alojados do 1º ao 12º dia de idade em um galpão de alvenaria e posteriormente transferidos para gaiolas de metabolismo, onde foram realizados os ensaios biológicos. O período experimental foi de dez dias — cinco dias para adaptação dos animais às rações experimentais e às baterias e cinco dias para coleta de excretas.

Foram utilizados 168 frangos machos da linhagem comercial Cobb, distribuídos em delineamento inteiramente ao acaso, com quatro dietas, cada uma avaliada em seis repetições com sete aves por unidade experimental.

As rações e a água foram fornecidas à vontade durante o período experimental. As aves receberam luz natural e/ou luz artificial durante as 24 horas do dia. As coletas de excretas foram feitas duas vezes ao dia em intervalos de 12 horas entre cada coleta. Para evitar contaminações e perda de amostra experimental, as bandejas foram revestidas com plástico e colocadas sob o piso de cada unidade experimental. As excretas coletadas foram colocadas em sacos plásticos, devidamente identificadas, pesadas e armazenadas em *freezer* até o final do período de coleta,

quando, então, foram homogeneizadas e retiradas alíquotas, que foram colocadas em estufa de circulação de ar a 60°C para a pré-secagem. Posteriormente foram realizadas as análises laboratoriais para determinação dos teores de matéria seca, nitrogênio e energia bruta no Laboratório de Nutrição Animal de Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, segundo técnicas descritas por Silva (1990).

Ao término do experimento, foi determinada a quantidade de ração consumida por unidade experimental, durante os cinco dias de coleta. Uma vez obtidos os resultados das análises laboratoriais dos alimentos, da ração-referência, das rações-teste e das excretas, foram calculados os valores de energia metabolizável aparente (EMA) e energia metabolizável aparente corrigida (EMAn), por meio de equações propostas por Matterson et al. (1965).

Tabela 2 – Composição das dietas experimentais

Ingrediente	Ração basal + SID	Ração basal
Soja integral desativada	30,00	-
Ração basal	70,00	-
Milho	-	57,129
Farelo de soja	-	36,00
Óleo de soja	-	2,00
Fosfato bicálcico	-	1,85
Calcário	-	0,904
Sal	-	0,45
L-lisina HCl 99%	-	0,11
DL-metionina 99%	-	0,23
L-treonina 98%	-	0,04
Premix mineral ¹	-	0,05
Premix vitamínico ²	-	0,10
Cloreto de colina	-	0,10
Antioxidante (BHT)	-	0,01
Cinza ácida insolúvel (Celite TM)	-	1,00
Total	100,00	100,00
Proteína bruta	25,80	21,00

¹ Manganês - 80,0 mg; ferro - 50,0 mg; zinco - 50,0 mg; cobre - 10,0 mg; cobalto - 1,0 mg; iodo - 1,0 mg.

² Vitamina A - 10.000 UI; vitamina D3 - 2.000 UI; vitamina E - 30 UI; vitamina B1 - 2,0 mg; vitamina B6 - 4,0 mg; ácido pantotênico - 12,0 mg; biotina - 0,10 mg; vitamina K3 - 3,0 mg; ácido fólico - 1,0 mg; ácido nicotínico - 50,0 mg; vitamina B12 - 15 mcg; selênio - 0,25 mg.

A dieta basal foi formulada de acordo com as recomendações das Tabelas Brasileiras (Rostagno et al 2005) e continha 21,00% de proteína bruta e 3.000 kcal de EM/kg.

Para os cálculos de EMA e EMAn serão utilizadas as seguintes fórmulas:

$$EMA = \frac{EBI - EBE}{CONS} \times 1000$$

em que: EBI = energia bruta ingerida; EBE = energia bruta excretada; CONS = consumo total.

$$\text{EMAn} = \frac{\text{EBI} - (\text{EBE} + (\text{BN} \times 8,22)) \times 1000}{\text{CONS}}$$

em que: EBI = energia bruta ingerida; EBE = energia bruta excretada; BN = balanço de nitrogênio; CONS = consumo total.

$$\text{EMalimento} = \frac{\text{EMb} + (\text{EMt} - \text{EMb})}{\% \text{ substituição}}$$

em que: EMB = energia metabolizável da dieta basal; EMt = energia metabolizável da dieta-teste.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados sobre a excreção endógena de aminoácidos estão apresentados na tabela abaixo.

Tabela 3. Aminoácidos endógenos excretados (g/100 g MS Ingerida)

	g/kg de Matéria Seca Ingerida			
	S/ ENZIMA	C/ ENZIMA	ANOVA (sig.)	CV%
Ác. Aspartico	0,610	0,730	0,136	18,8
Ác. Glutâmico	1,280	1,500	0,008	8,3
Serina	1,080	0,920	0,145	17,7
Glicina	1,090	0,960	0,234	17,1
Histidina	0,220	0,300	0,004	14,8
Arginina	0,790	0,810	NS	10,3
Treonina	1,100	0,930	0,03	11,3
Alanina	0,650	0,660	NS	9,6
Prolina	1,020	0,870	0,211	19,9
Tirosina	0,410	0,450	0,339	18,5
Valina	0,760	0,540	0,048	26,3
Metionina	0,200	0,200	NS	21,1
Cistina	0,460	0,300	0,011	24,8
Isoleucina	0,520	0,360	0,071	31
Leucina	0,810	0,600	0,128	31
Fenilalanina	0,700	0,630	0,098	10,3
Lisina	0,430	0,480	0,194	14,9
Soma AAs	12,130	11,240	0,171	9
Proteína Bruta	15,700	12,450	0,005	11,1

A enzima promoveu aumento significativo ($P < 0,05$) na digestibilidade aparente e verdadeira dos aminoácidos, tanto os essenciais quanto os não-essenciais, assim como da proteína bruta na dieta à base de milho e de farelo de soja.

Tabela 4 - Coeficientes de digestibilidade ileal aparente e verdadeira dos aminoácidos não-essenciais da dieta basal

	Dieta		Anova	
	Sem enzima	Com enzima	Significância	CV (%)
Coeficiente de digestibilidade aparente				
Ácido aspártico	76,9B	89,4A	0,001	2,021
Ácido glutâmico	82,3B	89,1 ^a	0,001	1,482
Alanina	80,3B	84,6A	0,006	2,571
Prolina	78,1B	83,4A	0,002	2,89
Tirosina	79,9B	84,4A	0,005	2,64
Cistina	67,1B	76,4A	0,003	5,69
Coeficiente de digestibilidade verdadeira				
Ácido aspártico	79,0B	92,1A	0,001	1,965
Ácido glutâmico	85,0B	92,5A	0,001	1,432
Alantoína	85,4B	90,3A	0,002	2,413
Prolina	84,2B	89,2A	0,004	2,691
Tirosina	84,1B	91,4A	0,001	2,472
Cistina	79,3B	87,6A	0,006	4,896

Letras diferentes na linha significam diferença estatística.

Esses resultados estão de acordo com relatos de Barbosa et al. (2008), que notaram aumento da digestibilidade da proteína bruta quando trabalharam com um complexo multienzimático, composto de amilase, protease e xilanase e duas dietas controle (positivo e negativo), de modo que a dieta controle positivo era formulada para atender às exigências nutricionais dos animais e a controle negativo possuía níveis nutricionais reduzidos segundo a matriz nutricional. Os autores constataram que não houve interação entre o efeito enzima × controle.

Entretanto, Zanella et al. (1999), em pesquisa com um complexo enzimático semelhante ao que foi utilizado por Barbosa et al. (2008) e avaliando a digestibilidade dos aminoácidos individualmente, encontraram diferença significativa ($P < 0,05$) apenas para treonina, serina e glicina, mas ainda assim com aumento da digestibilidade da proteína bruta quando adicionaram o complexo enzimático à dieta. Esses autores notaram também aumento no ganho de peso e melhora na conversão alimentar com o uso da enzima.

Brito (2003), avaliando o efeito de um complexo enzimático contendo celulase, amilase e protease em sojas com diferentes graus de processamento (normal, sub e superprocessada), comprovou haver interação entre o grau de processamento da soja e a ação das enzimas, pois houve maior diferença na soja estava subprocessada, ou seja, quando os fatores antinutricionais naturais da soja estavam mais ativos.

Olukosi et al. (2007) utilizaram o método de coleta ileal aos 22 dias de idade e óxido crômico como indicador em animais alimentados com dietas com níveis nutricionais reduzidos de energia metabolizável e fósforo, com e sem a adição de um complexo enzimático à base de xilanase, amilase e protease, com ou sem fitase, e encontraram maior retenção de nitrogênio e ganho de peso estatisticamente igual quando se comparou a dieta com a adição do complexo enzimático sem a fitase e da dieta sem nenhum aditivo, segundo o autor, o fósforo foi o limitante do crescimento.

Tabela 5 - Coeficientes de digestibilidade ileal aparente dos aminoácidos essenciais da dieta basal

Aminoácido	Dieta		Anova	
	Sem enzima	Com enzima	Significância	CV (%)
Coeficientes de digestibilidade aparente				
Serina	74,1B	83,7A	0,001	2,782
Glicina	68,7	71,2	0,142	3,913
Histidina	79,2B	86,1A	0,001	2,216
Arginina	84,4B	89,6A	0,001	1,506
Treonina	71,0B	80,5A	0,001	3,643
Valina	76,8B	83,0A	0,001	2,627
Metionina	93,2B	95,1A	0,001	0,709
Isoleucina	80,3B	84,4A	0,004	2,268
Leucina	85,0	85,7	NS	1,853
Fenilalanina	81,8B	86,1A	0,001	1,985
Lisina	85,5B	88,3A	0,006	1,615
Serina + glicina	71,6B	77,9A	0,001	3,239
Proteína Bruta	79,1B	83,4A	0,004	2,461
Soma	79,8B	86,0A	0,001	2,04

Letras diferentes na linha significam diferença estatística.

Tabela 6 - Coeficientes de digestibilidade ileal verdadeira dos aminoácidos essenciais da dieta basal

Aminoácido	Dieta		Anova	
	Sem enzima	Com enzima	Significância	CV (%)
Coeficiente de digestibilidade verdadeira				
Serina	81,9B	90,8A	0,001	2,541
Glicina	77,7	80,0	0,174	3,470
Histidina	82,4B	90,6A	0,001	2,119
Arginina	88,4B	93,5A	0,001	1,441
Treonina	80,6B	89,3A	0,001	3,248
Valina	85,5B	90,4A	0,002	2,386
Metionina	95,6B	97,1A	0,004	0,693
Isoleucina	85,4B	90,0A	0,002	2,130
Leucina	88,9	89,8	NS	1,77
Fenilalanina	86,2B	90,6A	0,001	1,886
Lisina	88,0B	91,4A	0,002	1,565
Serina + glicina	79,97	85,82	0,002	2,921
Proteína Bruta	85,2B	90,1A	0,002	2,280
Soma	84,4B	92,4A	0,001	1,913

Letras diferentes na linha significam diferença estatística.

A utilização de enzima promoveu aumento da digestibilidade da maioria da maioria dos aminoácidos, à exceção apenas de glicina, valina e isoleucina, fato que comprova os benefícios da protease nos valores nutricionais da soja integral.

Simbaya et al. (1996), em pesquisa com animais entre 4 e 18 dias de idade, utilizaram duas dietas, uma à base de trigo e farelo de soja e outra à base de trigo e farelo de canola (que possui menor digestibilidade dos nutrientes em relação ao farelo de soja), todas suplementadas com uma carboidrase para anular o efeito negativo do aumento da viscosidade da dieta causado pelo trigo. Esses autores avaliaram o desempenho dos animais e observaram menor ganho de peso naqueles alimentados com a dieta contendo farelo de canola, porém, quando adicionaram a protease, essa queda no rendimento foi menos pronunciada, fato que associaram ao aumento dos valores nutricionais da canola.

Tabela 7 - Coeficientes de digestibilidade ileal aparente dos aminoácidos não-essenciais da soja integral determinados por dois métodos

	Dieta		Método de determinação		Sem enzima		Com enzima		Anova				
	Sem enzima	Com enzima	Método 1	Método 2	Método 1	Método 2	Método 1	Método 2	Enzima	Método	Enzima × método	CV (%)	
Coeficiente de digestibilidade aparente													
Ác. aspártico	76,4b	84,5a	89,5a	71,4b	86,7aB	66,0bB	92,2xA	76,8y	A	0,001	0,001	0,007	2,62
Ác. glutâmico	79,0b	84,6a	89,7a	73,9b	87,6aB	70,3bB	91,7xA	77,5y	A	0,001	0,001	0,047	2,266
Alanina	71,5b	75,6a	80,3a	66,8b	78	64,9	82,5	68,8	0,005	0,001	Ns	4,473	
Prolina	71,4b	76,4a	82,1a	65,7b	79,6	63,3	84,7	68,1	0,001	0,001	Ns	3,339	
Tirosina	76,4	78,5	84,3a	70,6b	83,2	69,7	85,4	71,6	0,070	0,001	Ns	3,379	
Cistina	48,8b	59,5a	59,2a	49,1b	55	42,6	63,3	55,6	0,001	0,001	0,305	10,322	

Letras minúsculas (a,b ou x,y) avaliam as médias dentro de cada fator (sem enzimas; com enzimas; enzimas; método). Letras maiúsculas (A, B) comparam as médias obtidas com enzimas e sem enzimas da mesma dieta. Teste de SNK (P<0,05).

Tabela 8 - Coeficientes de digestibilidade ileal verdadeira dos aminoácidos não-essenciais da soja integral determinados por dois métodos

	Dieta		Método de determinação		Sem enzima		Com enzima		Anova			CV (%)
	Sem enzima	Com enzima	Método 1	Método 2	Método 1	Método 2	Método 1	Método 2	Enzima	Método	Enzima × método	
Coeficiente de digestibilidade verdadeira												
Ác. aspártico	79,1b	88,5a	93,6a	74,0b	90,3aB	68,0bB	97,0xA	80,0yA	0,001	0,001	0,007	2,56
Ác. glutâmico	83,3b	90,3a	95,7a	78,0b	93,0aB	73,7bB	98,3xA	82,3yA	0,001	0,001	0,048	2,194
Alanina	80,5b	86,3a	92,7a	74,1b	89,6	71,4	95,8	76,8	0,001	0,001	Ns	4,152
Prolina	81,9b	88,5a	95,5a	74,9b	93,1	70,8	97,8	79,1	0,001	0,001	0,099	3,077
Tirosina	82,9b	89,4a	94,8a	77,4b	91,1	74,6	98,5	80,3	0,001	0,001	Ns	3,078
Cistina	70,3b	81,0a	89,7a	61,6b	86,9	53,8	92,5	69,5	0,001	0,001	0,06	8,296

Letras minúsculas (a,b ou x,y) avaliam as médias dentro de cada fator (sem enzimas; com enzimas; enzimas; método). Letras maiúsculas (A, B) comparam as médias obtidas com enzimas e sem enzimas da mesma dieta. Teste de SNK ($P < 0,05$).

Neste trabalho, a digestibilidade de todos os aminoácidos diferiu significativamente entre os dois métodos, e os valores obtidos pelo método 2 (método onde a SID substitui o amido na dieta basal) foram sempre menores que os obtidos pelo método 1 (tradicional). Neste trabalho, as dietas com diferentes níveis de proteína bruta foram utilizadas nos dois testes e os maiores valores de digestibilidade da proteína provavelmente foram ocasionados pela maior concentração de enzimas em relação ao substrato. Esses resultados confirmaram relatos de Angkanaporn et al. (1997), que, em experimento com galos cecectomizados, encontraram relação entre a digestibilidade e os valores de proteína bruta da dieta e observaram que as dietas com menores porcentagens de proteína bruta apresentaram maior digestibilidade da proteína.

Tabela 9 - Coeficientes de digestibilidade ileal aparente dos aminoácidos essenciais da soja integral determinados por dois métodos

Aminoácido	Dieta		Método de determinação		Sem enzima		Com enzima		Anova			
	Sem enzima	Com enzima	Método 1	Método 2	Método 1	Método 2	Método 1	Método 2	Enzima	Método	Enzima × método	CV (%)
Coeficiente de digestibilidade aparente												
Serina	70,5b	77,7a	80,6a	67,6b	76,9	64,2	84,3	71,1	0,001	0,001	ns	3,5
Glicina	63,5	66,2	70,2a	59,5b	68,6	58,3	71,7	60,7	0,064	0,001	ns	5,3
Histidina	76,8b	81,5a	87,9a	70,5b	85,9	67,6	89,8	73,3	0,001	0,001	ns	2,65
Arginina	81,9b	86,0a	90,2a	77,7b	88,8	75,0	91,6	80,3	0,001	0,001	0,083	1,95
Treonina	63,2b	69,8a	71,0a	62,0b	67,4	59,1	74,7	64,8	0,001	0,001	ns	6,04
Valina	70,0b	73,4a	77,6a	65,8b	75,6	64,4	79,7	67,2	0,021	0,001	ns	4,72
Metionina	80,7b	85,0a	86,7a	78,9b	83,8	77,5	89,6	80,4	0,001	0,001	0,12	2,66
Isoleucina	76,9b	78,4a	84,1a	71,2b	83,2	70,6	85	71,8	0,023	0,001	ns	3,82
Leucina	80,4	79,5	86,7a	73,2b	86,6	74,1	86,8	72,3	ns	0,001	ns	3,78
Fenilalanina	75,9b	79,9a	85,5a	70,3b	83,3	68,4	87,7	72,2	0,001	0,001	ns	3,07
Lisina	82,5	84,0	89,3a	77,1b	88,3	76,7	90,4	77,6	0,086	0,001	ns	2,38
Serina + glicina	65,8b	71,5a	75,7a	61,6b	73,0	58,6	78,4	64,6	0,001	0,001	ns	4,47
Proteína Bruta	80,7	83,0	79,7a	84,0b	78,2	83,2	81,1	84,8	0,110	0,001	ns	3,97
Soma	74,8b	79,6a	84,3a	70,1b	82,2	67,5	86,5	72,7	0,001	0,001	ns	3,01

Letras minúsculas (a,b ou x,y) avaliam as médias dentro de cada fator (S/Enz; C/Enz; Enz; Método). Letras maiúsculas (A, B) comparam as médias C/Enz e S/Enz do mesmo tratamento. Teste de SNK (P<0,05).

Tabela 10 - Coeficientes de digestibilidade ileal verdadeira dos aminoácidos essenciais da soja integral determinados por dois métodos

Aminoácido	Dieta		Método de determinação		Sem enzima		Com enzima		Anova			
	Sem enzima	Com enzima	Método 1	Método 2	Método 1	Método 2	Método 1	Método 2	Enzima	Método	Enzima × método	CV (%)
Coeficiente de digestibilidade verdadeira												
Serina	82,0b	88,4a	94,3a	76,1b	91,4	72,5	97,2	79,7	0,001	0,001	ns	3,17
Glicina	76,0	78,6	86,7a	67,9b	85,3	66,6	88,0	69,1	0,098	0,001	Ns	4,73
Histidina	81,5b	88,5a	95,1a	75,0b	91,9	71,1	98,2	78,8	0,001	0,001	ns	2,56
Arginina	88,2b	92,1a	97,4a	83,0b	96,2aB	80,2bB	98,5xA	85,7yA	0,001	0,001	0,03	1,841
Treonina	78,4b	83,9a	90,2a	72,0b	87,4	69,3	93,1	74,7	0,005	0,001	ns	5,25
Valina	83,8	85,5	93,9a	75,4b	93,1	74,5	94,7	76,3	0,277	0,001	ns	4,26
Metionina	89,4b	92,4a	96,0a	85,8b	94,0	84,8	98,0	86,9	0,007	0,001	0,27	2,56
Isoleucina	84,6	86,9	94,0a	77,5b	92,7	76,5	95,3	78,4	0,082	0,001	ns	3,56
Leucina	87,4	86,9	95,4a	78,9b	95,1	79,8	95,8	78,0	ns	0,001	ns	3,56
Fenilalanina	83,6b	88,0a	95,2a	76,3b	93,0	74,2	97,4	78,5	0,001	0,001	ns	2,91
Lisina	86,4b	89,0a	94,6a	80,8b	92,9	79,8	96,2	81,7	0,005	0,001	ns	2,32
Serina + glicina	79,1b	84,0b	90,9a	72,3b	88,6	69,7	93,1	74,8	0,001	0,001	ns	3,874
Proteína Bruta	87,1b	90,3a	92,9a	84,6b	90,9	83,4	94,9	85,8	0,025	0,001	ns	3,66
Soma	82,3b	90,1a	95,1a	77,2b	91,5	73,1	98,8	81,4	0,001	0,001	ns	2,707

Letras minúsculas (a,b ou x,y) avaliam as médias dentro de cada fator (S/Enz; C/Enz; Enz; Método). Letras maiúsculas (A, B) comparam as médias C/Enz e S/Enz do mesmo tratamento. Teste de SNK (P<0,05).

No cálculo da digestibilidade verdadeira de aminoácidos de um alimento, é possível utilizar o método tradicional, uma vez que é necessário utilizar uma dieta isenta de proteína para de calcular a excreção endógena, porém, para avaliar o efeito de uma enzima em porcentagem do aumento na digestibilidade de nutrientes, seria melhor utilizar o Método 2. Apesar de exigir uma dieta isenta de proteína no cálculo da excreção endógena e de não ter havido neste experimento interação entre a enzima e a dieta para a maioria dos aminoácidos, no método 2 é necessário utilizar uma dieta mais próxima da comercial para o cálculo da digestibilidade de nutrientes do alimento, assim, efeitos que possivelmente podem interferir na digestibilidade, como valor nutricional e tempo de passagem, são reduzidos, o que comprova o real efeito da enzima sobre o alimento.

Não houve diferença significativa nos valores de energia metabolizável aparente e aparente corrigida ($P > 0,05$) entre a ração basal, à base de milho e farelo de soja, e aquela com soja integral, embora os resultados tenham apresentado considerável diferença matemática e coeficiente de variação considerado baixo em termos estatísticos.

A dieta composta por 70% de ração basal e 30% de soja integral desativada apresentou diferença estatística ($P < 0,05$), comprovando que houve atuação da enzima na presença de alto teor de proteína bruta. Angkanaporn et al. (1997) demonstraram haver influência do nível proteico sobre a digestibilidade das dietas. Sabe-se também que o efeito das enzimas tende a ser maior quando se trabalha com ingredientes de baixa digestibilidade.

Tabela 11 - Valores de energia metabolizável aparente (EMA) e de energia metabolizável aparente corrigida (EMAn) das rações experimentais e da soja integral desativada na matéria natural (kcal/kg)

	EMA		EMAn	
	Sem enzima	Com enzima	Sem enzima	Com enzima
Ração basal	2932	2970	2847	2884
Significância	NS		NS	
CV (%)	3,51		3,50	
Ração basal + soja integral	2976	3045	2871	2941
Significância	*		*	
CV (%)	1,21		1,23	
Soja integral	3313	3453	3162	3307
Significância	0,08		0,07	
CV (%)	3,66		3,77	

CV = coeficiente de variação; NS = não-significativo; * P<0,05.

Mahagna et al. (1995) avaliaram o efeito do uso de enzimas exógenas (amilase e protease separadamente) sobre o desempenho e a digestibilidade de frangos de corte e não encontraram efeito significativo da enzima sobre nenhum dos parâmetros avaliados. Segundo esses autores, os resultados obtidos com enzimas em experimentos *in vitro* não são os mesmos obtidos em experimentos *in vivo*, uma vez que as condições ambientais dos dois tipos de experimento são totalmente diferentes. Afirmaram ainda que a enzima aumentou a taxa de passagem pelo estômago, pois encontraram menor conteúdo na moela e maior quantidade no intestino delgado de animais que receberam dietas suplementadas com enzimas e, apesar de possuir maior quantidade da digesta, o intestino delgado desses animais apresentou menor peso em comparação ao daqueles que não receberam enzimas nas dietas. Houve ainda, conforme os autores, uma queda no pH do conteúdo intestinal e menor atividade de enzimas pancreáticas, o que pode ter compensado o efeito da enzima.

Entretanto, Pinheiro et al. (2004) estudaram a atividade de enzimas pancreáticas e intestinais e notaram aumento da atividade das enzimas amilase, lipase, quimotripsina, sacarase e maltase quando adicionaram enzimas exógenas à dieta. Esses autores não avaliaram a energia metabolizável, mas encontraram diferença significativa no ganho de peso dos animais de 14 a 42 dias de idade.

Brito (2003), avaliando a influência da adição de um complexo enzimático à base de amilase, celulase e protease em soja normal, sub ou supertostada, verificou aumento nos valores de energia metabolizável aparente desses alimentos, porém esse autor trabalhou com complexo enzimático contendo carboidrases, o que pode explicar a diferenças entre os resultados. Além disso, o autor relatou que a soja supertostada promoveu melhor resultado em comparação à subtostada, uma vez que na soja super tostada os fatores antinutricionais foram inativados.

São poucas as pesquisas utilizando proteases monocomponente. Normalmente os autores trabalham com complexos enzimáticos contendo carboidrases, fitase e protease, podendo ter assim ocorrer efeito de associação entre as enzimas.

4. CONCLUSÕES

Dietas suplementadas com enzima protease monocomponente têm maior digestibilidade de aminoácidos. A adição da protease monocomponente na soja integral desativada promove aumento da digestibilidade de aminoácidos. O método tradicional de determinação da digestibilidade dos aminoácidos indica valores de digestibilidade de aminoácidos mais próximos daqueles descritos nas Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos, enquanto o método 2 (onde se substitui o amido pelo alimento avaliado na dieta basal) indica sempre valores mais baixos. Não há diferença estatística nos valores de energia metabolizável aparente e aparente corrigida entre uma dieta à base de milho e farelo de soja e uma dieta com soja integral desativada acrescida ou não de protease monocomponente.

5. REFERÊNCIAS

ALBINO, L.F.T. Sistemas de avaliação nutricional de alimentos e suas aplicações na formulação de rações para frangos de corte. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 1991.

ANGKANAPORN, K.; RAVINDRAN, V.; BRYDEN, W.L. Influence of caecectomy and dietary protein concentration on apparent excreta amino acid digestibility in adult cockerels. **British Poultry Science**, v.38, p.270–276, 1997.

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

BRITO, C.O.; ALBINO, L.F.T.; ROSTAGNO, H.S. Adição de complexo enzimático em dietas a base de soja extrusada e desempenho de pintos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.2 p.457-461, 2006.

BEDFORD, M.R. Efeito del uso de enzimas digestivas en la alimentación de aves. **Avicultura Profesional**, v.14, n.4, p.24-29, 1996.

BÜHLER, M.; LIMPER, J.; MÜLLER, A. et al. Las enzimas en la nutrición animal. 1.ed. Bonn: AWT, 47p. 1998.

CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A. Enzimas. In: __. Bioquímica ilustrada. 2.ed. São Paulo: Artes Médicas, p.53-66. 1989.

CHOCT M. Enzyme supplementation of poultry diets based on viscous cereals. In: Bedford, M.R. & Partridge, G.G. (ed.) Enzymes in farm animal nutrition. Oxford, CAB Publishing. 2001.

CHOCT, M.; HUGHES, R.J.; WANG, J. et al. Increased small intestinal fermentation is partly responsible for the anti-nutritive activity of non-starch polysaccharides in chickens. **British Poultry Science**, v.37, n.3, p.609-621, 1996.

CHOCT, M.; KOCHER, A.; WATERS D.L.E. et al. A comparison of three xylanases on the nutritive value of two wheats for broiler chickens. **British Journal of Nutrition**, v.92, p.53–61, 2004.

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

COUSINS, B. Enzimas na nutrição de aves. In: Simpósio Internacional Acav – Embrapa sobre nutrição de aves, 1., 1999, Concórdia, SC. **Anais...** Concórdia: EMBRAPA-CNPSA, p.115-129. 1999.

COWIESON, A.J.; ADEOLA, O. Carbohydrases, protease, and phytase have an additive beneficial effect in nutritionally marginal diets for broiler chicks. *Poultry Science* 84:1860–1867 2005.

DARI, R.L. Utilização de fitase na alimentação de aves. Anais da Conferência APINCO Ciência e Tecnologia Avícolas, Santos, SP, p.127. 2004.

DOZIER, W.A. Fisiologia da digestão de proteína em aves. II Fórum de Enzimas. Anais p. 3- 7, 2008.

EASTER, R.A. Acidification of diets for pigs. In: HARESING, W.; COLE, P.J.A. (Eds). Recent advance in animal nutrition. p.61- 71, 1988.

FIREMAN, F.A.T.; FIREMAN, A.K.B.A.T. Enzimas na alimentação de suínos. **Ciência Rural**, v.28, n.1, p.173-178, 1998.

FISCHER, G.; MAIER, J.C.; RUTZ, F. et al. Desempenho de frangos de corte alimentados com dietas à base de milho e farelo de soja, com ou sem adição de enzimas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.1, p.402-410, 2002.

GHAZI, S.; ROOKE, J.A.; GALBRAITH, H. et al. The potential for the improvement in the nutritive value of soybean meal by different proteases in broiler chicks and broiler cockerels. **Brasilian Poultry Science**, v.43, p.70-77, 2002.

GHAZI, S.; ROOKE, J.A.; GALBRAITH, H. et al. Effect of adding protease and alpha-galactosidase enzyme to soybean meal on nitrogen retention and true metabolisable energy in broilers. **British Poultry Science**, v.38, p.528-531, 1997.

HAN, Z. Effect of enzyme supplementation of diets on the physiological function and performance of poultry. In: Marquardt R.R. & Han Z. (ed.) *Enzymes in Poultry and Swine Nutrition*. IDRC. 1997.

JAFFÉ, W.G. Hemagglutinins. IN: Liener, I.E. Toxic constituents of plant foodstuffs, 2^a ed. New York:Academic Press, p.73-102, 1980.

JARONI, D.; SCHEIDELER, E.S.; BECK, M. et al. The effect of diet wheat middlings and enzyme supplementation II : apparent nutrient digestibility, digestive tract size, gut viscosity, and gut morphology in two strains of leghorn hens. **Poultry Science**, v.78, p.1664-1674, 1999.

LEE, T.T.; CHIOU, P.W.S.; HSU, J.C. et al. Evaluation of protease digestion on various feed proteins by chemical assay. **Journal of Chinese Society of Animal Science**, v.29, p.21-28, 2000.

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

LINDEMANN, M.D.; CORNELIUS, S.G.; EL KANDELGY, S.M. et al. Effect of age, weaning and diet on digestive enzyme level in the piglet. **Journal of Animal Science**, v.62, n.5 p.1298-1307, 1986.

MAHAGNA, M.; NIR, I.; LARBIER, M. et al. Effect of age and exogenous amylase and protease on development of the digestive tract, pancreatic enzyme activities and digestibility of nutrients in young meat-type chicks. **Reprod Nutr Dev.**, v.35, p.201–212, 1995.1

MARQUARDT, R.R. Enzyme enhancement of the nutritional value of cereals: role of viscous, water-soluble, nonstarch polysaccharides in chick performance. In: Marquardt R.R. & Han Z. (ed.) *Enzymes in Poultry and Swine Nutrition*. IDRC. 1997.

MARSMAN, G.J.P.; GRUPPEN, H.; VAN DER POEL, A.F.B. et al. The effect of thermal processing and enzyme treatments of soybean meal on growth performance, ileal nutrient digestibilities, and chime characteristics in broiler chicks. **Poultry Science**, v.76, n.864-872, 1997.

MATTERSON, L.D.; POTTER, L.M.; STUTZ, M.W. et al. The metabolizable energy of feed ingredients for chickens. University of Connecticut Storrs. Agricultural Experiment Station Research Report, v.11, 11p, 1965.

MISIR, R.; SAUER, W.C. Effect of starch infusion at the ileum on nitrogen balance and apparent digestibility of nitrogen and amino acids in pig feed meat-and bone soybean meal diets. **Journal of Animal Science**, v.55, n.3, p.599-607, 1982.

NAGARAJ, M.; HESS, J.B.; BILGILI, S.F. Evaluation of a feedgrade enzyme in broiler diets to reduce pododermatitis. **J. Appl. Poultry Res**, v.16, 52-61. 2007.

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

OPALINSKI, M. **Utilização de enzima e soja integral em rações para frangos formuladas com ingredientes alternativos com base em aminoácidos digestíveis e totais**. Dissertação Mestrado em Zootecnia Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2006.

PEIXOTO, R.R.; MAIER, J.C. Aditivos. In: *Nutrição e alimentação animal*. 2.ed. Pelotas: EDUCAT/UFPel, p.125-130. 1993.

PENZ JR., A.M. Enzimas em rações para aves e suínos. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 35., 1998, Botucatu. Simpósio Sobre Aditivos Na Produção De Ruminantes E Não ruminantes. **Anais**. Botucatu: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 398p. p.165-178. 1998.

PETTERSSON, D.; AMAN, P. Enzyme supplementation of a poultry diet containing rye and wheat. **British Journal Nutrition** , v.62, p.139-149, 1989.

RODRIGUES, P.B.; ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T. et al. Desempenho de frangos de corte, digestibilidade de nutrientes e valores energéticos de rações formuladas com vários milhos, suplementadas com enzimas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.1, p.171-182, 2003.

ROLAND D.A. Comparison of nathuphos and phyzyme as phytase sources for commercial layers fed corn-soy diet. Poultry Science Assoc. 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. 2.ed, Minas Gerais: Viçosa. P. 186, 2005.

RUTHERFURD, S.M.; CHUNG, T.K.; MOUGHAN, P.J. The effect of microbial phytase on ileal phosphorus and amino acid digestibility in the broiler chicken. Por extenso Brit. Poultry Science, v.44, p.598-606. 2002.

RUTZ, F. Proteínas: digestão e absorção. In MACARI, M.; FURLAN, R.L.; GONZÁLES,E. (Ed) Fisiologia aviária. Aplicada a frangos de corte. Jaboticabal (SP). Funep/ Unesp. P. 135- 141, 2002.

SAEG - Sistema de análises estatísticas e genéticas. Universidade Federal de Viçosa - UFV. Versão 8.0. Viçosa, MG: 2000. 59p. (Manual do usuário).

SAID, N.W. Soybean processing. Insta Pro International, Des Moines, IA. 7p. s.d.

SAKOMURA, N.K.; ROSTAGNO, H.S. Métodos de pesquisa em nutrição de monogásticos. Jaboticabal: FUNEP. p.283, 2007.

SANTOS JR., A.A.; FERKET, P.R.; GRIMES J.L. et al. Dietary pentosanase supplementation of diets containing different qualities of wheat on growth performance and metabolizable energy of turkey poults. Int. **Journal of Poultry Science**, v.3, n.1, p.33-45. 2004.

SEBASTIAN, S.; TOUCHBURN, S.P.; CHAVEZ, E.R. et al. The effects of supplemental microbial phytase on the performance and utilization of dietary calcium, phosphorus, cooper and zinc in broilers chickens fed corn – soy bean diets. **Poultry Science**, v.75, n.6, p.729–736, 1996.

SELLE, P.H.; RAVIDRAN, V. Microbial phytase in poultry nutrition: Review. **Animal Feed Science Technology**, v. , n. , p. , 2007. inserir volume, número e intervalo de páginas

SELLE, P.H.; RAVINDRAN, V.; CALDWELL, R.A. et al. Phytate and phytase: consequences for protein utilization. *Nutr. Res. Rev.* por extenso v.13, p.255-278, 2000.

SHEPPY, C. The current feed enzyme market and likely trends. *Enzyme In: Farm Animal Nutrition*, CABI, New York, p.1-10, 2001.

SILVA, D.J. *Análise de Alimentos: métodos químicos e biológicos*. 2. Ed. Viçosa, MG: UFV, 1990. 165p.

SILVA, S.S.P.; SMITHARD, R.R. Effect of enzyme supplementation of a rye-based diet on xylanase activity in the small intestine of broilers, on intestinal crypt cell proliferation and on nutrient digestibility and growth performance of the birds. **British Poultry Science**, v.43, p.274-282, 2002.

SIMBAYA, J.; SLOMINSKI, B.A.; GUENTER, W. et al. The effects of protease and carbohydrase supplementation on nutritive value of canola meal for poultry: in vitro and in vivo studies. **Animal Feed Science and Technology**, v.61, n.1, p.219–234, 1996.

TAVERNARI, F.C.; ALBINO, L.F.T.; ROSTAGNO, H.S. Digestibilidade de proteína. II Fórum de Enzimas. **Anais...** p.67-95, 2008.

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. **Ciência Agrotécnica**, v.27, n.6, p.1401-1408, 2003.

VIANA, M.T.S. **Efeito da suplementação de enzimas sobre o desempenho e o metabolismo de galinhas poedeiras**. Universidade Federal de Viçosa, Abril de 2009.

VIVEIROS, A.; BRENES, A.; PIZARRO, M. et al. Effect enzyme supplementation of a diet based on barley, and autoclave treatment on apparent digestibility, growth performance and gut morphology of broilers. **Animal Feed Science and Technology**, v.48 p.237-251, 1994.

YI, Z.; KONERGAY, E.T.; RAVINDRAN, V. et al. Improving phytase phosphorus availability in corn and soybean meal for broilers using microbial phytase and calculating of phosphorus equivalency values for phytase. **Poultry Science**, v.75, n.240-249, 1996.

YU, B.; WU, S.T.; LIU, C.C. et al. Effects of enzyme inclusion in a maize-soybean diet on broiler performance. **Animal Feed Science and Technology**, v.134, p.14-16, 2005.

ZANELA, I.; SAKOMURA, 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.