

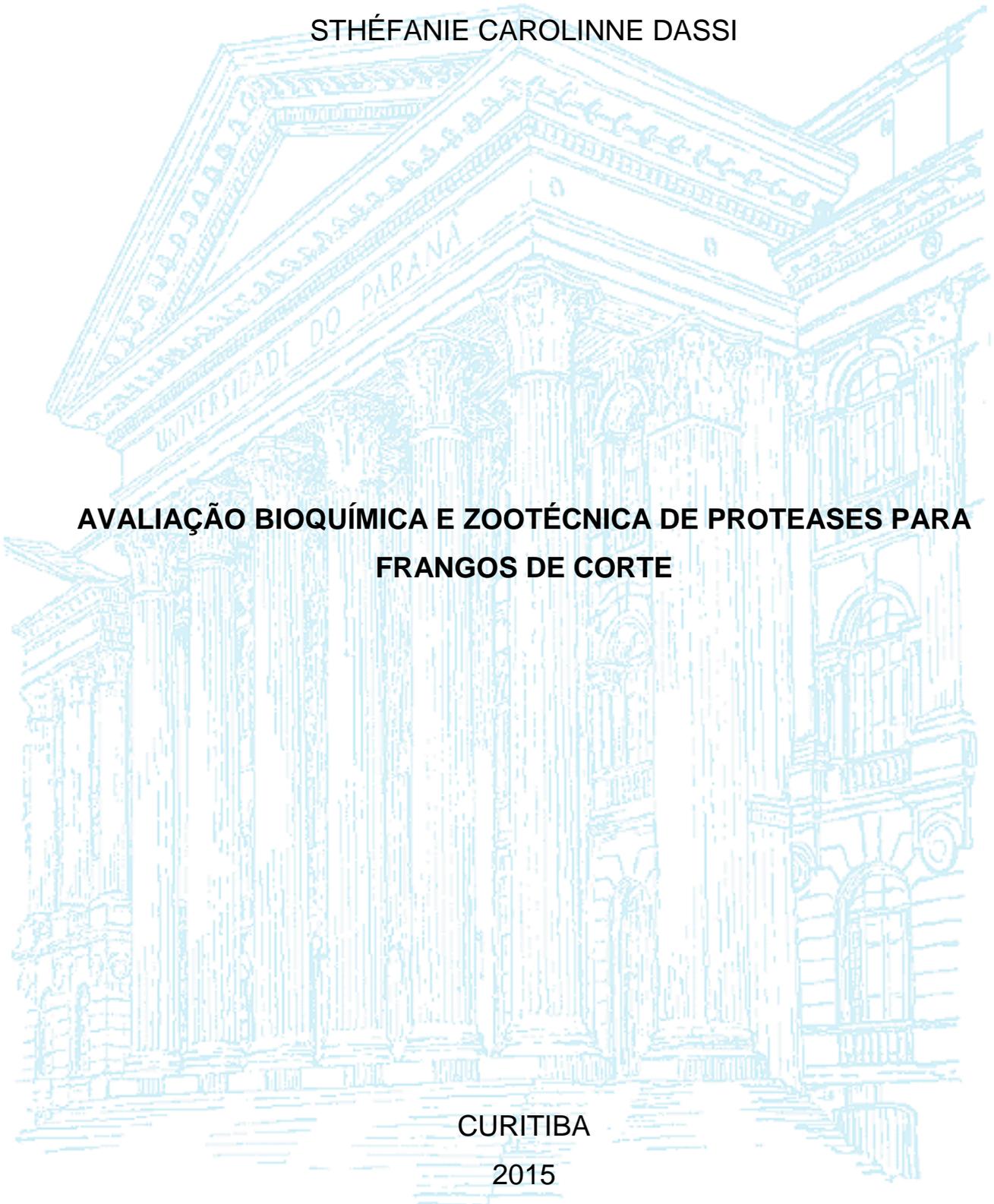
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

STHÉFANIE CAROLINNE DASSI

**AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA E ZOOTÉCNICA DE PROTEASES PARA
FRANGOS DE CORTE**

CURITIBA

2015



STHÉFANIE CAROLINNE DASSI

**AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA E ZOOTÉCNICA DE PROTEASES PARA
FRANGOS DE CORTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia, área de concentração em Fisiologia Animal Comparativa e dos Animais Domésticos, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Fisiologia.

Orientadora: Prof. Dra. Ana Vitória Fischer da Silva.

Co-orientadora: Prof. Dra. Katya Naliwaiko

CURITIBA

2015

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Dassi, Sthéfanie Carolinne

Avaliação bioquímica e zootécnica de proteases para frangos de corte. /
Sthéfanie Carolinne Dassi. – Curitiba, 2015.
92f. : il. ; 30cm.

Orientadora: Ana Vitória Fischer da Silva

Co-orientadora: Katya Naliwaiko

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

1. Enzimas. 2. Alimentos fermentados. 3. Frango de corte. I. Título. II.
Silva, Ana Vitória Fischer da. III. Naliwaiko, Katya. IV. Universidade
Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Fisiologia.

CDD (20. ed.) 612



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Departamento de Fisiologia
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia



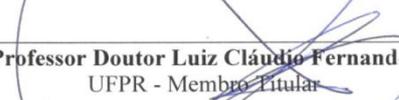
Ata da defesa de dissertação de mestrado de STHÉFANIE CAROLINNE DASSI

Aos cinco dias do mês de agosto do ano de dois mil e quinze, foi realizada no Auditório do Departamento de Fisiologia no Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, a defesa de dissertação da mestranda **Sthéfanie Carolinne Dassi**, intitulada **“AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA E ZOOTECNICA DE PROTEASES PARA FRANGOS DE CORTE”**. A abertura teve início às 09h00min pela Presidente da Banca Examinadora e Orientadora da candidata, Professora Doutora Ana Vitória Fischer da Silva. A Presidente apresentou ao público presente os membros da banca examinadora e logo passou a palavra à aluna, para que fizesse uma apresentação sucinta de sua dissertação. Após a explanação oral, a Professora Doutora Ana Vitória Fischer da Silva passou à palavra a primeira examinadora, Professora Doutora Ananda Portela Felix do Departamento de Zoologia da UFPR. Na sequência, passou à palavra ao segundo examinador, Professor Doutor Luis Cláudio Fernandez do Departamento de Fisiologia da UFPR. A aluna respondeu as perguntas dos examinadores e se posicionou frente às críticas. Findas as arguições pelos demais membros da banca, a Presidente, Professora Doutora Ana Vitória Fischer da Silva fez uma rápida apreciação das conclusões mais importantes dos debates realizados e comunicou que a Banca Examinadora iria reunir-se em sessão secreta para discussão e atribuição dos conceitos. Os trabalhos foram interrompidos por cinco minutos. Após haver analisado o referido trabalho e argüido a candidata, os membros da banca examinadora reunidos em sessão secreta deliberaram pela " Aprovação ", habilitando-a ao título de Mestre em Fisiologia, condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Art. 59º do Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação. Eu, Ana Vitória Fischer da Silva, Presidente da Banca Examinadora lavrei a presente ata, a qual assino juntamente com os senhores examinadores.

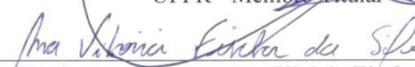
Curitiba, 05 de agosto de dois mil e quinze.



Professora Doutora Ananda Portela Felix
UFPR- Membro Titular



Professor Doutor Luiz Cláudio Fernandes
UFPR - Membro Titular



Professora Doutora Ana Vitória Fischer da Silva
UFPR - Orientadora e Presidente da Banca Examinadora

AGRADEÇO

A Deus pela vida, saúde e pela oportunidade de estudar e trabalhar.

DEDICO:

Ao meu pai Ivan Luiz Dassi:

Não tenho palavras para agradecer a tudo que você me ajudou em toda a minha vida! Obrigada pelas palavras de carinho e motivação, por acreditar e confiar em mim, por ter certeza que tudo ia dar certo e que eu iria conseguir, mesmo quando eu tive dúvidas, você sabia! Obrigada por todos os abraços apertados quando ia te visitar, sejam os de boas-vindas ou os de despedida, isso me marcou demais nesses anos! Obrigada pelos finais de semana maravilhosos com churrascos de domingo em família! Amo você!

A minha mãe Nádia Rosane Palma Miollo:

Quantas coisas nós passamos juntas não? Não sei por onde começar! Obrigada pela vida, pelo amor, exemplo de garra e força e pela ajuda em todo caminho da minha formação! Quantas lágrimas e risadas, brigas e reconciliações passamos nessa longa trajetória! Obrigada por estar ao meu lado e me incentivar sempre, embora muitas vezes não acreditei que daria certo! Obrigada pelos finais de semana com chimarrão e pipoca! Salgada, porque nunca gostei muito da doce! Amo você!

Aos meus irmãos Jéssica G. Dassi, Rodrigo L. P. Dassi e Pedro H. P. Dassi:

"Ter um irmão é ter, pra sempre, uma infância lembrada com segurança em outro coração". Sem vocês, não haveria estrutura, apoio nem amor! Obrigada por vocês existirem na minha vida!

Ao meu namorado Yugo Tsuneta:

Seu apoio e incentivo, especialmente na reta final dessa etapa, foram fundamentais pra eu conseguisse avançar dia após dia! Obrigada pelo amor, companheirismo e por acreditar em mim!

AGRADECIMENTOS

Agradeço em especial a minha orientadora Profa. Dra. Ana Vitória Fischer da Silva e ao Prof. Dr. Sebastião Aparecido Borges. Vocês são e sempre serão como pais para mim, pois nunca mediram esforços para me ajudar e incentivar!

A Profa. Dra. Márcia Helena Appel, Profa. Dra. Katya Naliwaiko, e Prof. Dr. Luiz Claudio Fernandes pela paciência, pela amizade e por tudo que me ensinaram em todo o tempo de convivência no Laboratório de Metabolismo.

Ao Prof. Dr. Alex Maiorka, Profa. Dra. Simone Gisele de Oliveira, e Profa. Dra. Ananda Portela Felix pela competência e exemplo de profissionalismo e por fazer parte de toda minha formação.

A todos os colegas da Pós pelo companheirismo, amizade e motivação, em especial Andrielle Capote, Stefani Fischer, Dagliane Pagliosa, Letícia Garcia e Amanda Venturelli.

A todos os colegas do LEPNAN; em especial Andréia Massuquetto, Vinícius Schramm, Jean Durau, Vivian Vieira, Josiane Panisson e a todos os estagiários que me auxiliaram na condução do experimento.

Aos demais orientados da Profa. Dra. Ana Vitória: Suelen Baal, Felipe Silva, Tiago dos Santos, Amanda Bialli, Mariana Scheraiber, Karoline Vanelli, e Wladimir Polese. Obrigada de coração.

A todos os funcionários do Laboratório de Nutrição Animal (LNA) pelo auxílio na condução das análises.

A empresa TECTRON pelo apoio financeiro e pelo incentivo na condução dos experimentos.

Ao Programa de Pós Graduação em Fisiologia e a CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

A todos que de alguma forma me ajudaram e apoiaram!

AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA E ZOOTÉCNICA DE PROTEASES PARA FRANGOS DE CORTE

RESUMO

A oferta de enzimas exógenas para nutrição animal é uma realidade e as proteases representam grande oportunidade de melhorar a digestibilidade dos ingredientes proteicos. A suplementação de enzimas exógenas específicas melhora o valor nutricional dos alimentos, tornando o processo de digestão mais eficiente. O presente trabalho foi dividido em dois experimentos. O experimento 1 teve por objetivo avaliar a inclusão de um blend de 2 proteases (TM) na dose de 125 g/ton em rações contendo diferentes ingredientes proteicos e observar seus efeitos sobre o coeficiente de digestibilidade aparente ileal da matéria seca (CDAIMS), proteína bruta (CDAIPB) e energia metabolizável aparente (EMA) em frangos de corte aos 21 dias. Utilizou-se o método de Matterson et al. (1965), com 80% da ração referência (RR) + 20% do ingrediente teste. O experimento 2 teve por objetivo estudar a solubilização de proteínas *in vitro* com 3 derivados de levedura *Saccharomyces cerevisiae* com potencial enzimático (A, B, C). Por meio do método de Bradford (1976), mensurou-se a quantidade de proteína solúvel nas amostras isoladas e em combinação com uma ração basal para frangos de corte. As variáveis foram a granulometria das amostras (fina e natural) e o pH de incubação (tampão Citrato pH 3,0 e tampão Tris pH 7,4). A granulometria mais fina da amostra C foi mais eficiente para solubilizar as proteínas do que a natural ($p < 0,05$, teste t), entretanto o mesmo não se observou para as demais amostras. O pH foi relevante na extração de proteínas, no qual o pH 7,4 aumentou a solubilização de todas as amostras ($p < 0,05$, teste t). Ao incubar os produtos + ração na dose recomendada pelo fabricante nos dois pHs, observou-se o mesmo efeito. Utilizou-se um kit comercial para determinação de atividade enzimática pela técnica de fluorescência em todas as amostras e detectou-se presença de proteases no produto TM, e também nos derivados de levedura A, B, C. A inclusão do blend de proteases (TM) aumentou o CDAIMS e EMA da RR; o CDAIMS do farelo de soja; o CDAIMS, CDAIPB e EMA da soja integral desativada; e CDAIMS e CDAIPB da farinha de penas ($p < 0,05$, teste t). Não houve efeito da inclusão da enzima sobre a soja integral crua ($p > 0,05$). Esses dados representam uma oportunidade de uso desses produtos como enzimas na nutrição de aves. São necessários mais estudos para evidenciar os efeitos positivos obtidos no presente trabalho e aliar técnicas que permitam melhor caracterizar a composição química e o modo de ação fisiológico desses compostos.

Palavras-chave: Atividade enzimática, Digestibilidade, Enzimas, Fontes proteicas, Produtos fermentados

BIOCHEMICAL AND ZOOTECHNICAL ASSESSMENT OF PROTEASES FOR BROILERS

ABSTRACT

Supply of exogenous enzymes for animal feed is a reality and proteases represent a great opportunity to improve digestibility of protein sources. Supplementation of exogenous enzymes improves nutritional value of the food, making the digestive process more efficient. This study consisted in two experiments. Experiment 1 evaluated the inclusion of a two proteases blend (TM) at a dose of 125 g/ton in diets containing different protein sources and observed their effects on the apparent ileal digestibility of dry matter (CAIDDM), crude protein (CAIDCP) and apparent metabolizable energy (AME) in broilers at 21 days. We used the method of Matterson et al. (1965), 80% of reference diet (RD) + 20% of test ingredient. Experiment 2 aimed to study proteins solubilization in vitro with 3 metabolites derived of *Saccharomyces cerevisiae* yeast with enzyme potential (A, B, C). By Bradford method (1976), we measured the amount of soluble protein in isolated samples and in combination with a basal diet for broilers. Variables were sample particle size (fine and natural) and pH incubation (Citrate buffer pH 3.0 and Tris buffer pH 7.4). Sample C finer particle size was more efficient to solubilize proteins than natural ($p < 0.05$, t-test), however, the same was not observed for other samples. The pH is important to extract proteins, wherein pH 7.4 increased the solubilizing of all samples ($p < 0.05$, t-test). By incubating metabolites derived of yeast at a dose recommended by the manufacturer with basal diet in both pHs, we observed the same effect. We used a commercially available kit to determine enzyme activity by fluorescence method in all samples and detected presence of proteases in TM sample, and also in yeast derived A, B, C. Addition of proteases blend (TM) increased CAIDDM and AME of RR; CAIDDM of soybean meal; CAIDDM, CAIDCP and AME of deactivated soybean; and CAIDDM and CAIDCP of feather meal ($p < 0.05$, t test). There was no effect of the inclusion of the enzyme on raw whole soybean ($p > 0.05$). These data represent a chance to use those products as enzymes in poultry nutrition. Further studies are needed to show the positive effects obtained in this study and combining techniques to better characterize chemical composition and physiological mode of action of these compounds.

Keywords: Digestibility, Enzyme activity, Nutritional metabolites, Protease, Protein sources

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – COMPOSIÇÃO BROMATOLÓGICA DE UM ALIMENTO.....	17
FIGURA 2 – ANATOMIA DO TGI DAS AVES.....	28
FIGURA 3 – CORANTE COOMASSIE BRILLIANT BLUE - BG-250.....	51
FIGURA 4 – SALA DE METABOLISMO – SCA – UFPR.	55
FIGURA 5 – ÁREA DELIMITADA PARA COLETA DO CONTEÚDO ILEAL DAS AVES.....	60
FIGURA 6 – MODO DE AÇÃO DO KIT FLUORESCENTE PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	68
FIGURA 7 - CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS (MG/ML) EM DERIVADOS DE FERMENTAÇÃO DA LEVEDURA <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> NA FORMA NATURAL (N) OU MOÍDA (M).	72
FIGURA 8 - CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS (MG/ML) EM DERIVADOS DE FERMENTAÇÃO DA LEVEDURA <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> EM PH 3,0 E PH 7,4.	73
FIGURA 9 - CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS (MG/ML) EM RAÇÃO (R) PARA FRANGOS DE CORTE ADICIONADAS COM DERIVADOS DE FERMENTAÇÃO DA LEVEDURA <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> EM PH 3,0 E PH 7,4.	74

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - PARÂMETROS NUTRICIONAIS DO GRÃO DE SOJA CRU.....	19
TABELA 2 - PARÂMETROS NUTRICIONAIS DE FARELOS DE SOJA COM DIFERENTES PORCENTAGENS DE PROTEÍNA BRUTA.	20
TABELA 3 – PARÂMETROS NUTRICIONAIS DA FARINHA DE PENAS HIDROLISADA.....	21
TABELA 4 – PRINCIPAIS BENEFÍCIOS DA UTILIZAÇÃO DE ENZIMAS EXÓGENAS NAS DIETAS.....	37
TABELA 5 – LEVANTAMENTO DE PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS RELACIONADAS ÀS ENZIMAS NA NUTRIÇÃO ANIMAL UTILIZANDO A FERRAMENTA <i>WEB OF SCIENCE</i>	38
TABELA 6 – LEVANTAMENTO DE LITERATURA SOBRE A MENSURAÇÃO DO PH DE DIFERENTES SEGMENTOS DO TGI EM AVES.....	43
TABELA 7 – CARACTERÍSTICAS DOS PREBIÓTICOS E SUAS PROPRIEDADES.. ..	46
TABELA 8 – PRODUTOS A BASE DE FERMENTAÇÃO DE LEVEDURAS <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> UTILIZADOS.....	49
TABELA 9 – PRINCIPAIS SUBSTÂNCIAS QUE INTERFEREM NA DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS PELO MÉTODO DE BRADFORD.....	53
TABELA 10 – ESQUEMA DE ARRAÇOAMENTO PARA AS AVES DURANTE O PERÍODO EXPERIMENTAL.....	56
TABELA 11 – INGREDIENTES E COMPOSIÇÃO QUÍMICA (COM BASE NA MATÉRIA SECA) ANALISADA E CALCULADA DA RAÇÃO REFERÊNCIA.....	57
TABELA 12 – DESCRIÇÃO DOS TRATAMENTOS EXPERIMENTAIS.....	58
TABELA 13 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA ANALISADA DOS INGREDIENTES PROTÉICOS.....	58
TABELA 14 – REAGENTES PARA CONFEÇÃO DO REAGENTE DE BRADFORD.	62
TABELA 15 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA ANALISADA DA RAÇÃO UTILIZADA NO ENSAIO DE QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	63
TABELA 16 – COMPOSIÇÃO DE PROTEÍNA BRUTA (%) DOS PRODUTOS DERIVADOS DE FERMENTAÇÃO DA LEVEDURA <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	63

TABELA 17 – SOLUÇÕES TAMPÃO CITRATO PH 3,0 E TAMPÃO TRIS PH 7,4...	65
TABELA 18 – NÍVEIS DE INCLUSÃO DOS PRODUTOS CONFORME RECOMENDAÇÃO DOS FABRICANTES.....	66
TABELA 19 – TRATAMENTOS EXPERIMENTAIS DO ENSAIO 3 DE QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS.	67
TABELA 20 – COEFICIENTES DE DIGESTIBILIDADE APARENTE ILEAL DA MATÉRIA SECA (CDAIMS), PROTEÍNA BRUTA (CDAIPB) E ENERGIA METABOLIZÁVEL APARENTE (EMA) DA RAÇÃO REFERÊNCIA E DE INGREDIENTES PROTEICOS, COM OU SEM PROTEASES, EM FRANGOS DE CORTE.....	71
TABELA 21 – ATIVIDADE ENZIMÁTICA (U/G) DOS DERIVADOS DE FERMENTAÇÃO DE LEVEDURA <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> E DO COMPLEXO DE PROTEASES.	75

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

%	Porcentagem
®	Marca registrada
°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µl	Microlitro
ATCC	American Type Culture Collection
BAEE	N-Benzoyl-L-Arginine Ethyl Ester Hydrochloride
BSA	Bovine serum albumine (soroalbumina bovina)
CDI	Coeficiente de Digestibilidade do Ingrediente
CDIA	Coeficiente de digestibilidade ileal aparente
CIA	Cinza insolúvel em ácido
cm	Centímetro
EB	Energia bruta
EMA	Energia metabolizável aparente
FB	Fibra bruta
FDN	Fibra em detergente neutro
FI	Fator de indigestibilidade
FP	Farinha de penas
FS	Farelo de soja
g	Gramma
HCl	Ácido clorídrico
Kg	Quilograma
KOH	Hidróxido de potássio
mg	Miligramma
ml	Mililitro
MM	Matéria mineral
MO	Matéria orgânica
MS	Matéria seca
nm	Nanômetro
PB	Proteína bruta
pH	Potencial hidrogeniônico
q.s.p	Quantidade suficiente para
RPM	Rotações por minuto
RR	Ração referência

RT	Ração teste
SD	Standard
SIC	Soja integral crua
SID	Soja integral desativada
TGI	Trato gastrintestinal
ton	Tonelada
W	Watt

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Fontes proteicas nas dietas para frangos de corte	17
2.1.1 Soja Integral Crua	18
2.1.2 Soja Integral Desativada	19
2.1.3 Farelo de Soja.....	20
2.1.4 Farinha de Penas.....	21
2.2 Digestão e absorção de proteínas em frangos de corte	22
2.3 Digestibilidade dos nutrientes	23
2.3.1 Coleta total e parcial de excretas x Coleta ileal.....	24
2.4 Anátomo-fisiologia do TGI das aves e saúde intestinal	26
2.4.1 Bico e esôfago	28
2.4.2 Proventrículo e moela	29
2.4.3 Intestino delgado.....	30
2.4.4 Intestino grosso.....	31
2.4.5 Órgãos anexos.....	32
2.4.6 Saúde e integridade intestinal.....	33
2.5 Enzimas.....	34
2.5.1 Por que utilizar enzimas nas dietas?.....	36
2.5.2 Enzimas proteolíticas na nutrição de aves	37
2.6 Ação de enzimas exógenas e sua relação com a taxa de passagem da digesta, antiperistaltismo e pH dos segmentos intestinais em aves	40
2.6.1 Tempo de retenção e taxa de passagem da digesta	40
2.6.2 Antiperistaltismo.....	41
2.6.3 pH dos segmentos intestinais	42
2.7 Leveduras, prebióticos e derivados	43
2.7.1 Leveduras na nutrição de aves	45
2.7.2 Uso de derivados de fermentação de levedura na avicultura.....	48
2.8 Adaptação e aplicação de técnica para a quantificação de enzimas	49
2.8.1 Quantificação de proteínas	49
2.8.2 Método de Bradford	50
2.8.3 Atividade enzimática	53

3 MATERIAL E MÉTODOS	55
3.1 Experimento 1. Coeficiente de digestibilidade ileal de fontes proteicas	55
3.1.1 Local	55
3.1.2 Animais e alojamento.....	55
3.1.3 Instalações.....	55
3.1.4 Manejo	56
3.1.5 Dietas experimentais	56
3.1.6 Delineamento e tratamentos	58
3.1.7 Variáveis analisadas	59
3.1.8 Análise estatística	61
3.2 Experimento 2. Técnica para quantificação de proteínas e determinação da atividade enzimática.	61
3.2.1 Solução padrão de BSA – Soroalbumina bovina	61
3.2.2 Reagente de Bradford.....	62
3.2.3 Composição das amostras.....	62
3.2.4 Ensaio 1– Produtos na forma Natural e Moída	63
3.2.5 Ensaio 2 – Produtos em diferentes pHs.....	64
3.2.6 Ensaio 3 – Produtos em diferentes pHs + Ração.....	66
3.3 Determinação da atividade enzimática dos produtos utilizados nos experimentos 1 e 2.....	68
4 RESULTADOS	70
4.1 Experimento 1. Coeficiente de digestibilidade ileal de fontes proteicas	70
4.2 Experimento 2. Técnica para quantificação de proteínas e determinação da atividade enzimática.	72
4.2.1 Ensaio 1– Produtos na forma natural e moída.....	72
4.2.2 Ensaio 2 – Produtos em diferentes pHs.....	72
4.2.3 Ensaio 3 – Produtos em diferentes pHs + Ração.....	73
4.3 Determinação da atividade enzimática dos produtos utilizados no Experimento 1 e 2.....	74
5 DISCUSSÃO	76
5.1 Experimento 1. Coeficiente de digestibilidade ileal de fontes proteicas	76
5.2 Experimento 2. Técnica para quantificação de proteínas e determinação da atividade enzimática.	80
6 CONCLUSÕES	83
7 REFERÊNCIAS	84

1 INTRODUÇÃO

Dentre toda a indústria de aditivos alimentares utilizados na avicultura, o segmento de enzimas foi o que obteve o maior crescimento na última década. Estima-se que todo o mercado mundial de enzimas gire a quantia de 3 a 5 bilhões de dólares anualmente (KIARIE *et al.* 2013). A obtenção das enzimas ou complexos enzimáticos para as rações é oriunda de fermentações por microrganismos em meio líquido ou sólido. No entanto, ainda não está completamente conhecido os efeitos fisiológicos das enzimas, havendo grande interesse das indústrias fabricantes, bem como dos centros de pesquisa, em obter maior conhecimento sobre isso.

Sabe-se que os custos com a alimentação dos animais englobam de 60 a 75% dos custos totais de produção. A partir dessa informação, Doskovic *et al.* (2013) inferem que há grandes possibilidades de reduzir o custo total por meio da redução específica do custo da ração. Para conseguir esse intento é necessário conhecer a fisiologia do trato gastrintestinal das aves, necessidades nutricionais em cada fase e o modo como os nutrientes são digeridos e absorvidos pelos animais. Então, pode-se lançar mão de ferramentas, como os aditivos enzimáticos, que melhoram o valor nutricional dos alimentos, permitindo que sejam mais facilmente digeridos e absorvidos pelos animais. Outros benefícios da adição de enzimas às dietas, além de melhorar o desempenho dos animais e a digestibilidade dos nutrientes, está no fato de permitirem redução da excreção de nutrientes, especialmente nitrogênio e fósforo ao ambiente. Todos esses fatores levam à redução do custo de alimentação, uma vez que as aves tem a oportunidade de aproveitar de maneira mais eficiente os nutrientes presentes na ração (KIARIE *et al.* 2013).

Este trabalho de mestrado foi composto por duas pesquisas distintas que se correlacionam. Uma delas foi a adaptação e aplicação de técnicas amplamente estudadas na área de bioquímica, como a quantificação de proteínas pelo método de Bradford (1976), e a obtenção da quantificação e caracterização de enzimas por métodos de fluorescência. Essas técnicas foram aplicadas à diversos aditivos utilizados em rações de frangos de corte com origem a partir de fermentações por levedura *Saccharomyces cerevisiae* e também proteases oriundas de microrganismos. Essa parte da pesquisa não teve por objetivo esgotar o conhecimento acerca do assunto, visto que é extremamente amplo e complexo, mas sim fornecer a possibilidade de aplicar novas técnicas na área de nutrição animal

que possam complementar as já existentes, com o intuito de ampliar os conhecimentos e aliar técnicas de diversas áreas.

O outro segmento desse trabalho visou a obtenção de coeficientes de digestibilidade de frações nutricionais, como a matéria seca, a proteína bruta e a energia metabolizável de diversos ingredientes, com ou sem a inclusão de complexos enzimáticos proteolíticos. As proteases foram adicionadas às rações experimentais e observou-se os efeitos em diferentes fontes proteicas comuns na formulação de rações: farelo de soja, soja integral crua, soja integral desativada e farinha de penas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fontes proteicas nas dietas para frangos de corte

A alimentação dos frangos de corte consiste na união de diversos ingredientes em uma ração. O valor biológico de um alimento é baseado na sua composição nutricional. Os nutrientes podem ser caracterizados como os constituintes dos alimentos, com diversas composições químicas, que são importantes para a manutenção dos processos fisiológicos normais do organismo. Para Bertechini (2006) são considerados nutrientes todos os compostos presentes nos alimentos ou de forma livre que são utilizados para nutrição do organismo.

Bromatologicamente, os alimentos são constituídos por água e Matéria seca (MS). A MS, por sua vez é composta por Matéria Mineral (MM) e por Matéria Orgânica (MO). É na MO que se encontram os Carboidratos, Lipídeos, Proteínas e Vitaminas, conforme ilustra a Figura 1.

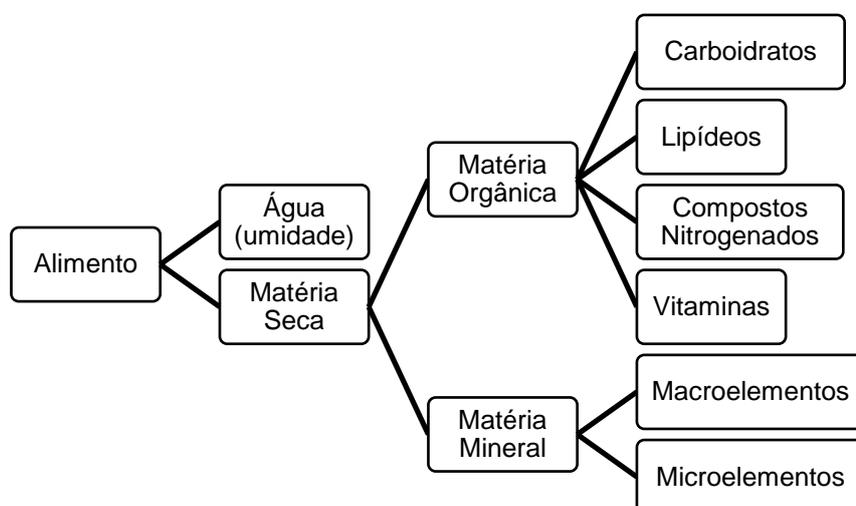


FIGURA 1 – COMPOSIÇÃO BROMATOLÓGICA DE UM ALIMENTO. FONTE: ADAPTADO DE: BERTECHINI (2006).

De todos os compostos nitrogenados, as proteínas representam a maior fração, chegando a 20% do peso dos tecidos. Nutricionalmente as proteínas são caracterizadas de acordo com seu aporte de aminoácidos. Dos 23 aminoácidos conhecidos, 11 são considerados dieteticamente essenciais, ou seja, necessitam ser ingeridos via ração. O termo Proteína Bruta (PB) se refere ao teor de nitrogênio contido no alimento, obtido a partir do método de Kjeldahl (1883). Desse valor,

considera-se que cada proteína tem em média 16% de nitrogênio, então faz-se a multiplicação por 6,25 (fator de correção comumente utilizado na nutrição animal) (BERTECHINI, 2006).

As necessidades de proteínas (aminoácidos) de um animal são variáveis conforme a idade, no qual animais mais novos necessitam de maior proteína dietética para deposição de tecido muscular. A necessidade proteica varia também com o status fisiológico, como crescimento, manutenção ou fase reprodutiva. Ainda, o consumo de proteína dietética varia conforme o balanço de energia da ração. Variações nos níveis de energia resultam em mudança na quantidade de ração consumida, pois as aves consomem ração primariamente para atender suas necessidades energéticas, o que pode levar a alterações na quantidade absoluta de proteína ingerida. Condições ambientais também afetam o consumo de ração, assim como o sexo da ave, no qual machos tendem a comer em média 13% a mais que fêmeas (BERTECHINI, 2006).

Segue abaixo descrição de quatro fontes de proteína amplamente utilizadas na avicultura de corte que foram usadas no presente trabalho. A soja crua, soja desativada, farelo de soja e farinha de penas podem representar potenciais substitutos parciais do farelo de soja como fonte proteica nas rações.

2.1.1 Soja Integral Crua

O grão integral de soja, ou soja crua, é fornecido diretamente aos animais após moagem, sem passar por processamentos térmicos para desativação de fatores antinutricionais. O grão de soja cru contém diversas substâncias antinutricionais que podem ser prejudiciais à saúde e ao desempenho dos animais (ROCHA *et al.* 2014). Estes fatores são atenuados ou neutralizados por processos industriais de aquecimento, resultando na soja integral desativada (REGINA, 2010). Os principais fatores antinutricionais da soja crua são: inibidores de quimiotripsina e tripsina, ou chamados inibidores de protease, fatores alergênicos, lectinas que provocam aglutinação com glicoproteínas nos glóbulos sanguíneos, polissacarídeos não amiláceos solúveis (PNAs) que reduzem o teor energético da soja e ácido fítico que reduz a absorção de diversos minerais (REGINA, 2010; ROCHA *et al.* 2014). A Tabela 1 cita os principais parâmetros nutricionais do grão de soja cru.

TABELA 1 - PARÂMETROS NUTRICIONAIS DO GRÃO DE SOJA CRU. FONTE: (SINDIRAÇÕES, 2009; ROSTAGNO *ET AL.* 2011).

Umidade (Máx %)	Proteína Bruta (Mín %)	Extrato etéreo (Mín %)	Fibra bruta (Máx %)	Matéria Mineral (Máx %)
14,0	36,0	20,0	6,0	5,50

2.1.2 Soja Integral Desativada

A soja integral desativada é o grão de soja cru que passou por tratamento térmico para desativação dos fatores antinutricionais. Vários tipos de processamento foram desenvolvidos para neutralizar ou minimizar essas substâncias, entre eles os principais são a extrusão e a tostagem (OLIVEIRA *et al.* 2005).

O processo de desativação da soja se constitui no controle de pressão, cozimento dos grãos, controle de umidade e extração do oxigênio através do vácuo. Assim a soja desativada torna-se uma matéria prima importante para a alimentação das aves (FREITAS *et al.* 2005).

A extrusão da soja é realizada através do cozimento do grão sob pressão mecânica, umidade e alta temperatura em curto intervalo de tempo. Oliveira *et al.* (2005) extrusaram a soja em temperaturas que variaram de 125°C a 140°C e não obtiveram prejuízo ao desempenho zootécnico das aves na fase de crescimento e final. Esse processo permite o rompimento da parede celular, proporcionando maior exposição dos nutrientes às enzimas do TGI das aves (LEITE *et al.* 2012). O processo de tostagem consiste no emprego de calor a seco em tambor rotativo com temperaturas variando de 110°C a 170°C, sem ruptura da parede celular. Ou ainda pode ser realizado com emprego de calor úmido, em um processo semelhante à uma autoclave (LEITE *et al.* 2012). Rocha *et al.* (2014) utilizaram soja integral desativada processada por calor a 150°C por 15 minutos e observaram melhores valores de digestibilidade da matéria seca e da proteína bruta quando comparado à soja crua ou a soja super-tostada, demonstrando que o processo de aquecimento para inativação de fatores antinutricionais precisa ser realizado com critério.

Independente do tipo de processamento, a maioria proporciona maior digestibilidade da soja integral e permitem o seu uso em maior proporção nas formulações para frangos de corte, uma vez que a soja integral desativada possui

elevado teor energético pela presença do óleo no grão em comparação ao farelo de soja. Porém é essencial que haja controle no processamento térmico para que não haja sub ou superprocessamento. O subaquecimento resulta na presença de fatores antinutricionais, enquanto o superaquecimento leva à perda de qualidade proteica do ingrediente (LEITE *et al.* 2012).

2.1.3 Farelo de Soja

A principal fonte de proteína utilizada para frangos de corte é o farelo de soja, que representa de 65% a 70% da proteína utilizada na formulação e é considerado o ingrediente proteico primário nas rações avícolas (de COCA-SINOVA *et al.* 2008). Possui ainda bom valor nutricional e valores de aminoácidos essenciais que favorecem seu uso na alimentação das aves (LEITE *et al.*, 2012).

O FS pode ser obtido com ou sem a casca e é o resultado do processo de moagem dos grãos para extração do óleo de soja, este destinado à alimentação humana e animal. Podem ser produzidos basicamente três tipos de FS: com 44% de proteína bruta (PB), com a adição de casca de soja pós-moagem; com 48% de PB, no qual as cascas são removidas antes da extração do óleo e o FS com 46% de PB, no qual o grão é moído já com a casca (BRASIL, 1988). Gerber *et al.* (2006) avaliaram diferentes FS com PB que variava de 44% a 48% e obtiveram que o maior nível proteico proporcionou melhor aproveitamento da energia da dieta.

TABELA 2 - PARÂMETROS NUTRICIONAIS DE FARELOS DE SOJA COM DIFERENTES PORCENTAGENS DE PROTEÍNA BRUTA. FONTE: (SINDIRAÇÕES, 2009, ROSTAGNO *et al.* 2011).

	Umidade (Mín %)	Proteína Bruta (Mín %)	Extrato etéreo (Mín %)	Fibra bruta (Máx %)	Matéria Mineral (Máx %)
44%	12,5	44,0	1,0	8,0	7,0
46%	12,5	46,0	1,0	6,0	7,0
48%	12,5	48,0	1,0	3,5	6,0

2.1.4 Farinha de Penas

As farinhas de origem animal têm sido intensamente estudadas, o que trouxe amplo conhecimento sobre suas implicações na nutrição animal, economia e aspectos sanitários e ambientais. Seu uso na nutrição de animais monogástricos é apreciado devido às suas características nutricionais desejáveis e baixo custo de obtenção em relação ao farelo de soja (BELLAYER, 2010). Porém, o mesmo autor cita que é necessário que a qualidade desse ingrediente seja passível de monitoramento eficaz, uma vez que existe uma dificuldade em padronização dos processos de produção e da origem das matérias primas que irão compor as farinhas de origem animal.

A utilização dos subprodutos de origem animal, como a FP, como fonte proteica alternativa nas rações, reduz os custos de produção, eleva a margem de lucro de abatedouros e frigoríficos avícolas, uma vez que cerca de 7% do peso de abate é composto pelas penas (MOURA, 1993). Acima de tudo, permite a redução da poluição ambiental caso esses resíduos fossem depositados no ambiente (SCAPIM *et al.* 2003).

A farinha de penas hidrolisada (FPH) é o produto da cocção sob pressão de penas limpas e não decompostas, obtida no abate de aves, podendo haver a participação de sangue desde que não altere significativamente sua composição. Nesse caso a farinha deve se chamar farinha de penas hidrolisadas e sangue (BELLAYER, 2010).

TABELA 3 – PARÂMETROS NUTRICIONAIS DA FARINHA DE PENAS HIDROLISADA. FONTE: (SINDIRAÇÕES, 2009, ROSTAGNO *et al.* 2011)

	Umidade (Mín %)	Proteína Bruta (Mín %)	Extrato etéreo (Mín %)	Fibra bruta (Máx %)	Matéria Mineral (Máx %)
Farinha de Penas	10,26	83,47	6,83	-	3,34

Em sua composição nutricional, a farinha de penas possui alto teor de proteína bruta, porém cerca de 85 a 90% dessa quantidade corresponde à queratina, uma proteína de baixa solubilidade e alta resistência à ação de enzimas (SCAPIM *et al.* 2003). A queratina possui grande quantidade de aminoácidos sulfurosos, principalmente cistina, e de interações hidrofóbicas em sua estrutura, o que contribui para a estabilidade da molécula e dificulta a ação enzimática. Apesar do alto teor de proteína bruta, a farinha de penas possui uma composição aminoacídica pobre. Esse fator é o principal limitante do uso em maiores quantidades da farinha de penas na formulação de rações para monogástricos.

Para melhorar o valor nutritivo desse material, é necessário que haja um processamento adequado com controle de diversos fatores, como temperatura, tempo de cozimento e tempo de secagem, pois estes afetam diretamente a qualidade da matéria prima final (SILVA *et al.* 2000).

Nascimento (2000) encontrou valores diferentes de digestibilidade da MS, PB e aminoácidos em diversas amostras de farinha de penas analisadas. Esses dados confirmam a falta de padronização no processo de produção desse ingrediente, o que dificulta a formulação de rações que o incluam, pois pode haver uma sub ou superestimação dos valores que levam a diminuição do desempenho dos lotes de frangos de corte. A porcentagem de inclusão das farinhas de penas na formulação gira em torno de 4% (NASCIMENTO, 2000). Porém, esse número é variável em função da qualidade da matéria prima disponível e pode ser elevado quando se utilizam aminoácidos sintéticos na formulação.

2.2 Digestão e absorção de proteínas em frangos de corte

A proteína presente na dieta precisa ser hidrolisada pelas enzimas proteolíticas digestivas das aves, que quebram as ligações peptídicas entre os aminoácidos tornando-os disponíveis para absorção pelo epitélio. Sabendo que o TGI das aves é mais curto que o dos mamíferos, é necessário que a maquinaria funcione de maneira eficiente para promover os processos de trituração do alimento e desnaturação das proteínas pela ação enzimática (RUTZ, 2002).

A digestão proteica inicia-se no proventrículo. Nos segmentos anteriores, como boca, esôfago e papo não existe ação de enzimas proteolíticas, nem ação mecânica de trituração. Nesses segmentos iniciais, existe secreção mucosa para

lubrificação da digesta e permitir melhor passagem até o proventrículo (RUTZ, 2002; DUKES, 2006).

No proventrículo há a secreção de ácido clorídrico (HCl) e pepsinogênio pelas células principais. O ambiente ácido (pH em torno de 2,0) proporcionado pelo HCl é ideal e transforma o pepsinogênio em pepsina. Essa enzima é caracterizada como endopeptidase e cliva as ligações entre os aminoácidos leucina-valina, tirosina-leucina, fenilalanina-tirosina. De acordo com Rutz (2002), a eficiência da digestão proteica no proventrículo depende da característica física da proteína ingerida e do tempo de permanência nesse segmento.

No duodeno, as proteínas da dieta sofrem ação das enzimas secretadas pelo pâncreas e intestino. O pâncreas secreta zimogênios que serão ativados no lúmen do intestino. O tripsinogênio secretado pelo pâncreas é ativado em tripsina por uma enteroquinase secretada no intestino. As principais enzimas proteolíticas secretadas pelo pâncreas são: tripsina, quimiotripsina, carboxipeptidases A e B e elastase (RUTZ, 2002).

A tripsina e a quimiotripsina são endopeptidases e quebram as ligações peptídicas em locais específicos no centro da cadeia e não nas porções terminais. A tripsina hidrolisa ligações dos aminoácidos lisina e arginina e a quimiotripsina cliva as ligações entre fenilalanina e tirosina. As carboxipeptidases são exopeptidases que hidrolisam as porções terminais da cadeia de aminoácidos. Assim, para Rutz (2002), a ação conjunta das endo e exopeptidases resulta na presença de oligopeptídeos, tripeptídeos e dipeptídeos e também aminoácidos livres no lúmen do intestino.

A hidrólise se completa pela presença das peptidases de membrana que culminam na absorção de aminoácidos livres e dipeptídeos para dentro dos enterócitos, que serão absorvidos na corrente sanguínea somente na forma de aminoácidos livres após ação de peptidases citosólicas (RUTZ, 2002).

2.3 Digestibilidade dos nutrientes

A digestibilidade dos nutrientes ou ingredientes é um método que permite avaliar a qualidade nutricional dos alimentos utilizados para frangos de corte. Por meio do conhecimento sobre a qualidade bromatológica (informações sobre a composição química e física dos ingredientes), aliado à digestibilidade de rações e

ingredientes, podem-se formular dietas mais precisas de acordo com os requerimentos em cada fase de vida do animal. A digestibilidade pode ser conceituada como a diferença na quantidade do ingrediente consumido e eliminado nas fezes (SAKOMURA & ROSTAGNO, 2007).

A energia é uma propriedade das substâncias químicas que é liberada quando do processo de oxidação dos nutrientes, ou do metabolismo energético produzindo calor. A energia bruta (EB) é obtida pela oxidação total da matéria orgânica e determinada em bomba calorimétrica. Para aves e suínos no Brasil, utiliza-se o parâmetro energia metabolizável aparente (EMA) como a forma mais comum. Esse valor é obtido a partir da diferença entre a EB do alimento ingerida e a EB excretada, compostas por fezes e urina (SAKOMURA & ROSTAGNO, 2007). Ainda, Matterson *et al.* (1965) citam que a EMA é a energia digestível subtraída da energia representada pela urina e gases, ou seja é o valor aproximado da energia que está efetivamente disponível para ser metabolizada pelas aves.

Existe grande variação dos resultados de digestibilidade publicados com enzimas. Essa variação pode ocorrer principalmente em função dos seguintes fatores: diferenças na metodologia para determinar a digestibilidade dos nutrientes, composição e dose da enzima utilizada em cada ensaio, e ainda se há a mistura de enzimas, podendo haver efeitos sinérgicos que alteram e dificultam a comparação dos resultados entre trabalhos, pH ótimo da enzima e pH dos segmentos intestinais, forma física da dieta (farelada, peletizada), idade das aves, presença de fatores antinutricionais nas dietas, entre outros (AFTAB, 2012).

2.3.1 Coleta total e parcial de excretas x Coleta ileal

A coleta total de excretas consiste na técnica mais utilizada para determinar a metabolizabilidade dos nutrientes e da energia (SAKOMURA & ROSTAGNO, 2007). Esse método consiste no cálculo entre todo alimento ingerido e toda a excreta produzida pelas aves em um determinado período de tempo, de acordo com a fórmula:

$$\text{COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDADE APARENTE (CDA) (\%)} = \frac{(\text{nutriente ingerido (g)} - \text{nutriente excretado (g)})}{\text{nutriente ingerido (g)}} \times 100$$

Esse método, apesar de ser o mais utilizado, pode obter resultados muito variáveis entre experimentos, uma vez que envolve variáveis como a idade das aves, período de adaptação, jejum, período de coleta e frequência de coleta de excretas que podem com frequência mudar em cada situação experimental. A coleta total de excretas pode ter implicações desfavoráveis, como a contaminação das bandejas de coleta com restos de ração, penas ou descamação da mucosa intestinal, que ao serem contabilizadas como excretas podem alterar consideravelmente os valores obtidos de metabolizabilidade dos nutrientes (DOURADO *et al.* 2010).

A técnica de coleta parcial de excretas é uma alternativa ao método de coleta total que se baseia no uso de uma substância indigestível, chamada de indicador. Esse indicador é adicionado às rações experimentais e recuperado de maneira quantitativa nas excretas, pois possui a característica de não ser digerido pelas enzimas digestivas do animal (SAKOMURA & ROSTAGNO, 2007), e pode ser obtido pela equação:

$$\text{COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDADE APARENTE (CDA) (\%)} = 100 - \left[\left(\frac{\% \text{ de indicador no alimento}}{\% \text{ de indicador nas fezes}} \right) \times \left(\frac{\% \text{ de nutriente nas fezes}}{\% \text{ de nutriente no alimento}} \right) \right] \times 100$$

O indicador deve possuir algumas características específicas para que seja possível executar esse método, como: não ser digerido pelas enzimas digestivas e ser totalmente recuperado nas fezes, não ser tóxico ao animal e não influenciar os processos fisiológicos de digestão, apresentando a mesma taxa de passagem que o bolo alimentar, e possuir uma técnica laboratorial específica para sua quantificação (SALES & JANSSENS, 2003).

Existem indicadores externos que podem ser adicionados às dietas, como o óxido crômico, dióxido de titânio e lignina de eucalipto, porém também pode-se utilizar indicadores internos, naturalmente presentes nos ingredientes utilizados para frangos de corte, como por exemplo a Cinza insolúvel em ácido (CIA), fibra bruta (FB), fibra em detergente ácido (FDA) e lignina.

Para a obtenção de resultados de digestibilidade das frações proteicas, a técnica mais indicada é a coleta ileal, ou seja, coleta do conteúdo presente no íleo

das aves diretamente nesse segmento. Essa metodologia é indicada, pois a fermentação microbiana ocorre principalmente no intestino grosso das aves (ceco e cólon) (DUKES, 2006), sendo a fermentação um fator de interferência na obtenção do valor de digestibilidade da fração proteica, pela síntese e degradação microbiana.

Geralmente, em ensaios de digestibilidade, costuma-se utilizar o alimento a ser testado como única fonte de alimentação para os animais, a fim de se obter o coeficiente de digestibilidade de determinado ingrediente. Entretanto, em algumas situações, por afetar a palatabilidade ou até mesmo não atender às necessidades nutricionais, pode-se utilizar uma dieta referência e misturar a ela uma determinada proporção do alimento a ser testado, geralmente 30 a 40%, porém variando conforme a composição química do ingrediente (KUNRATH, 2010). Esse método de substituição ou de diferença foi proposta por Matterson *et al.* (1965), e tem sido amplamente utilizada em ensaios de metabolismo e digestibilidade, de acordo com a fórmula:

COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDADE DO INGREDIENTE (CDI) =

$$CDRR + \left(\frac{(CDRT - CDRR)}{\frac{\% \text{ substituição}}{100}} \right)$$

CDRR – COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDADE DA RAÇÃO REFERÊNCIA

CDRT – COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDADE DA RAÇÃO TESTE

No presente trabalho, foi utilizada a coleta parcial de excretas para determinação da EMA e a coleta ileal para determinação dos Coeficientes de Digestibilidade Ileal Aparente da Matéria Seca (CDIAMS) e da Proteína bruta (CDIAPB) de 4 ingredientes, sendo o farelo de soja, a soja integral desativada, a soja integral crua e a farinha de penas, ambas as mensurações utilizando a CIA como indicador nas dietas, excretas e conteúdo ileal, e utilizando o método de substituição em 20% proposto por Matterson *et al.* (1965).

2.4 Anátomo-fisiologia do TGI das aves e saúde intestinal

O trato gastrintestinal (TGI) das aves é semelhante ao de outras espécies, com algumas exceções e particularidades anatômicas e funcionais (Figura 2). Em

geral, o material é ingerido, misturado, transformado em pequenas partículas acidificado no proventrículo e catalisado por enzimas endógenas em monossacarídeos, dipeptídeos e aminoácidos, ácidos graxos livres e monoglicerídeos para serem absorvidos (SVIHUS, 2014). A anatomia do canal alimentar das aves modificou-se evolutivamente para adaptar-se ao voo (DUKES, 2006). Dharne (2007) cita que o tamanho do TGI em relação ao peso corporal é menor em aves do que em mamíferos. Entretanto, esse fato é compensado pela maior vascularização do trato, alta taxa de secreção gástrica, aumento no tempo de trânsito intestinal e maior acidificação do TGI em comparação aos mamíferos (DHARNE, 2007). Também como adaptações ao voo, no sentido de reduzir o peso corporal, nas aves não há a presença de dentes, os músculos mandibulares e o osso da mandíbula são reduzidos e o estômago muscular (moela) se localiza próximo ao centro de gravidade da ave (DUKES, 2006; DHARNE, 2007).

Quando se trata de aves modernas para produção de carne ou ovos, a adaptação do TGI desses animais ocorreu no sentido de suportar a criação em sistemas intensivos, no qual se busca maior número de ovos por poedeira ou alta taxa de crescimento em frangos de corte (SVIHUS, 2014). Por exemplo, o autor cita que um frango macho de 30 dias de idade consome em torno de 10% do seu peso corporal em ração por dia e o seu TGI terá que ser capaz de metabolizar em torno de 7 gramas de ração por hora. Comparativamente a uma pessoa de 75 kg, é como se essa pessoa ingerisse mais de 450 gramas de alimento por hora durante 16 horas seguidas para se obter uma ingestão de alimento comparada ao seu peso corporal (SVIHUS, 2014).

As aves possuem maior altura de vilos e maior taxa de renovação do epitélio intestinal entre 48 e 96 horas, e uma resposta inflamatória rápida, em torno de 12 horas, quando comparada aos 3 a 4 dias dos mamíferos. Essas características, segundo Dharne (2007), as tornam mais suscetíveis a prejuízos na capacidade absorptiva do intestino do que comparado aos mamíferos.

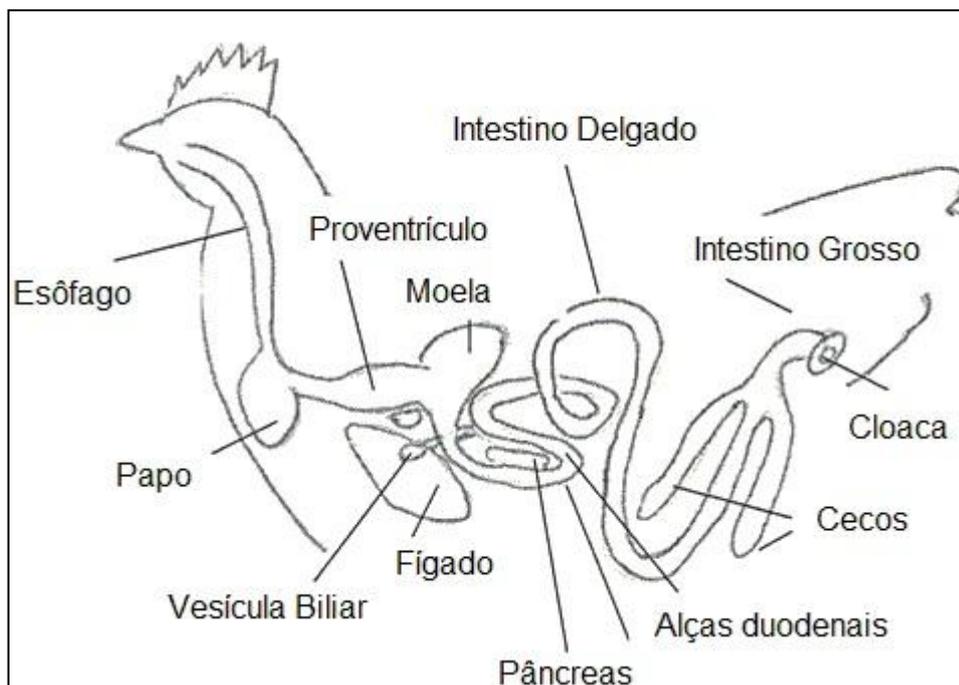


FIGURA 2 – ANATOMIA DO TGI DAS AVES. FONTE: TRADUZIDO DE: [HTTP://WWW.BACKYARDCHICKENS.COM](http://www.backyardchickens.com)

2.4.1 Bico e esôfago

No bico há a presença de glândulas salivares e papilas gustativas, e, segundo Dukes (2006), em frangos o número de papilas chega a quase 300 no epitélio superior do bico, tornando as aves sensíveis aos sabores salgado, amargo e doce. O tamanho e comprimento do TGI variam conforme a espécie e hábitos alimentares, mas também podem sofrer alterações em condições específicas de infecções parasitárias ou uso de medicamentos. Em geral tende a ter em torno de 210 cm.

O esôfago possui uma dilatação presente na maioria das aves, inclusive em frangos de corte, denominado papo. A entrada do papo é controlada por um esfíncter que se abre após o ventrículo ou moela ficar repleto (DUKES, 2006). Svihus (2014) cita que nem sempre o alimento fica armazenado no papo da ave. Em algumas situações a ingesta pode passar diretamente para o proventrículo e moela, e quando estes já estiverem repletos, o alimento tende a permanecer estocado no papo para posterior hidrólise. Para frangos alimentados *ad libitum*, resultados de Svihus *et al.* (2013) demonstram que o papo não é utilizado como 'órgão armazenador de alimento', uma vez que a presença de alimento é constante para a ave e ela tende a se alimentar em pequenas refeições a cada 30 minutos. Porém

para situações de alimentação restrita ou intermitente, o papo se torna um armazenador transitório de grandes quantidades de ração, pois o proventrículo e moela tem capacidade limitada de armazenamento. Em suma, o papo das aves não possui papel nutricional direto, pois não secreta enzimas e não absorve nutriente em quantidade considerável. Todavia, possui capacidade de misturar o alimento, fato importante para a hidrólise enzimática que será realizada no proventrículo adiante (SVIHUS, 2014).

2.4.2 Proventrículo e moela

O estômago das aves é dividido em dois segmentos: o glandular e o mecânico. O proventrículo, ou estômago glandular, secreta ácido clorídrico e as glândulas na mucosa possuem diversos ductos disseminados pela superfície luminal. O ventrículo, também conhecido como moela ou estômago muscular, possui a capacidade de armazenar em torno de 5 a 10 g de alimento (SVIHUS, 2014) e é especializado na trituração e mistura mecânica do alimento com o suco gástrico secretado pelo proventrículo (DUKES, 2006). Svihus (2014) cita que a moela é ainda mais importante nesse papel de mistura e quebra dos alimentos, uma vez que essa ação não é realizada na boca, pela ausência de dentes. Para tanto a moela possui músculos fortemente mielinizados e uma camada coilínea que auxilia na moagem dos alimentos, promovendo uma superfície semelhante a uma “lixa”. Os movimentos de contrações musculares ocorrem em torno de 4 vezes por minuto na moela, iniciando-se pelos músculos finos, com a abertura do piloro e uma forte contração peristáltica no duodeno. Um par de músculos grossos da moela se contrai após o duodeno, o que resulta em material gástrico sendo empurrado para o duodeno e também cranialmente para o proventrículo. Com o relaxamento dos músculos grossos, o proventrículo se contrai e o conteúdo volta para a moela (DUKES, 2006; SVIHUS, 2014). Para Svihus (2014), o proventrículo e a moela devem ser considerados como um compartimento apenas, uma vez que há fluxo rápido e constante de conteúdo entre os dois segmentos.

2.4.3 Intestino delgado

O intestino delgado é composto pelo duodeno, jejuno e íleo, entretanto não existe distinção histológica entre estes dois últimos segmentos (DUKES, 2006; SVIHUS, 2014). Comumente se utiliza o Divertículo de Meckel (vestígio do saco vitelino) para delimitar o segmento jejuno do íleo. Histologicamente, a mucosa se torna mais fina conforme avança do duodeno em direção ao íleo, em função do menor tamanho dos vilos e criptas. A forma das vilosidades é elipsoide e são recobertas pelos enterócitos com microvilosidades e também células caliciformes (DUKES, 2006).

Anatomicamente a primeira porção do intestino delgado das aves é o duodeno, composto por duas alças duodenais, descendente e ascendente. Esse segmento termina com a abertura dos ductos pancreáticos e biliares, onde o conteúdo ácido do proventrículo se mistura com os sucos provenientes desses ductos por meio de movimentos peristálticos, que culminam num pH em torno e 6, onde se iniciam os processos de digestão (SVIHUS, 2014).

O jejuno, segmento seguinte ao duodeno, possui papel chave no processo de digestão e absorção dos nutrientes devido ao seu comprimento, uma vez que o peso vazio desse segmento corresponde 20% a 50% mais que o íleo. O tempo de retenção nesse segmento está em torno de 40 a 60 minutos, metade do tempo que a digesta permanece no íleo (SVIHUS, 2014). O mesmo autor cita que grande parte da gordura, proteína, amido da dieta são absorvidos no terço final do jejuno.

O segmento íleo se inicia no divertículo de Meckel (vestígio do saco vitelino) e termina na junção íleo-ceco-cólica (SVIHUS, 2014). Embora tenha comprimento semelhante ao jejuno, seu papel principal está na absorção de água e sais minerais e pode ter papel relevante na absorção final de amido.

Grande parte dos estudos envolvendo o intestino delgado possuem informações oriundas de histologia, relacionando à morfologia dos segmentos com a função fisiológica. Entretanto é preciso entender que nem sempre uma grande estrutura de vilos no jejuno significa boa capacidade de digestão, uma vez que pode estar acontecendo injúrias à mucosa que promovem um maior turnover celular (SVIHUS, 2014). O mesmo autor cita que, para trazer maior confiabilidade nos dados histológicos, a pessoa que irá realizar a coleta não deve saber quais são os

tratamentos referentes àquelas aves e deve haver um método que selecione aleatoriamente as porções da lâmina para análise.

Dharne (2007) afirma que as células caliciformes produzem uma secreção composta por mucopolissacarídeos com o objetivo de proteger a mucosa de injúrias mecânicas, além de servir de barreira contra a invasão fúngica e bacteriana. Os enterócitos são células com barreira semipermeável que permitem a passagem seletiva de fluido, eletrólitos e nutrientes dissolvidos. É importante ressaltar que cada célula no epitélio intestinal faz parte de uma barreira física contínua, que pode perder sua integridade na presença de microrganismos patogênicos, toxinas que agridem a mucosa, ou até mesmo ingredientes presentes nas rações (DHARNE, 2007).

Os enterócitos presentes na borda em escova do epitélio intestinal secretam também diversas aminopeptidases e carboxipeptidases que são eficientes na degradação de pequenos peptídeos presentes no lúmen após ação da pepsina e tripsina secretadas pelo proventrículo e pâncreas, respectivamente (ISAKSEN *et al.* 2011).

Dukes (2006) e Dharne (2007) citam que, ao longo do intestino das aves, abaixo da camada epitelial, há um rico suprimento de tecido vascular, com uma rede de capilares sanguíneos bem definidos para rapidamente absorver e carrear os nutrientes, mas também qualquer substância endógena ou exógena que possam violar a barreira mucosa do intestino.

2.4.4 Intestino grosso

Abaixo, na junção íleocecocólica existe um anel de tecido muscular que se projeta no lúmen do cólon e funciona como uma válvula. Os dois cecos estão presentes em frangos de corte e na maioria das aves domésticas, exceto pombos (SVIHUS, 2014), e encontram-se imediatamente posteriores a esse anel. Como observado por Dukes (2006), os cecos se esvaziam duas vezes ao dia em média, tendo, portanto um longo tempo de retenção da digesta nesse segmento. Por meio de movimentos antiperistálticos, há a movimentação de bolo fecal da região onde se localiza o coprodeo (próximo à cloaca) novamente para dentro dos cecos, onde permanecem partículas com baixo peso molecular, solúveis e não viscosas. Svihus (2014) cita que uma das principais funções dos cecos é a absorção de água e

eletrólitos, juntamente com reabsorção de partículas de origem renal. O mesmo autor cita que 36% da água e 75% do sódio de origem renal são absorvidos nos cecos, tendo este segmento importante papel na reciclagem de sais minerais e substâncias nitrogenadas.

O tamanho dos cecos é influenciado pela dieta (SVIHUS, 2014) e nas espécies galiformes são mais longos e divididos em três zonas (base, corpo e ápice) com vilosidades que formam um filtro na base para evitar entrada de material intestinal grosseiro (DUKES, 2006). O intestino grosso (cólon) é curto e possui camada muscular espessa que drena na cloaca.

2.4.5 Órgãos anexos

Como órgãos anexos ao TGI, nas aves estão presentes o fígado, pâncreas e a vesícula biliar. O fígado é bilobado, onde o ducto direito desemboca no duodeno, e o esquerdo leva à vesícula biliar. Da vesícula biliar parte o ducto biliar que desemboca no duodeno, próximo ao fim da alça distal. Possui coloração de marrom-escuro a chocolate, exceto nos primeiros 10 a 14 dias de vida da ave, quando pode ser pálido devido à absorção de lipídios oriundos do saco vitelino (BRADLEY, 1960; DUKES, 2006). O fígado possui importante função na síntese da bile, pigmentos, sais biliares para digestão das gorduras em ácidos graxos e glicerol, além de ter papel chave no metabolismo central de nutrientes como carboidratos e proteínas, produz células sanguíneas, fatores de coagulação e armazenamento de compostos como glicogênio e vitaminas lipossolúveis (DUKES, 2006). A vesícula biliar encontra-se no lobo direito, abaixo do baço.

O pâncreas localiza-se entre as alças duodenais e é trilobado e possui três ductos que atingem o duodeno (DUKES, 2006). Esse órgão compõe a maior fonte de proteases no TGI, secretados na forma de pré-enzimas ou zimogênios que, em contato com a enzima tripsina, tornam-se ativas. Exemplos dessas pré-enzimas são a quimiotripsinogênio, tripsinogênio, proelastase e pro-carboxipeptidases que serão convertidas em quimiotripsina, tripsina, elastase, que são consideradas endopeptidases e carboxipeptidases A e B (exopeptidases). As endopeptidases clivam proteínas grandes em oligopeptídeos, que são então convertidos em aminoácidos livres pelas exopeptidases para posterior absorção pelo animal (ISAKSEN *et al.* 2011). Além da função exógena com a secreção do suco

pancreático, o pâncreas ainda é responsável pela secreção de hormônios na corrente sanguínea como a insulina e o glucagon, envolvidos diretamente no metabolismo de carboidratos (DUKES, 2006).

2.4.6 Saúde e integridade intestinal

Um assunto que tem sido extensivamente estudado atualmente é o conceito de saúde intestinal para frangos de corte. A saúde intestinal está diretamente ligada aos conceitos nutricionais (DHARNE, 2007). Para o autor, a formulação da ração e o manejo alimentar tem efeito marcante na saúde intestinal e podem influenciar na absorção dos nutrientes e conseqüentemente o crescimento dos animais, Ainda Svihus (2014), cita que um dos motivos que levam ao decréscimo na saúde intestinal são dietas desbalanceadas nutricionalmente, ou mesmo fatores externos como a microbiota.

A alta taxa de produção das linhagens comerciais atuais, e por conseqüência o alto consumo de alimentos, faz com que o TGI tenha suas funções sobrecarregadas e, portanto se torne mais vulnerável a funcionar incorretamente (SVIHUS, 2014), reduzindo a saúde intestinal. Problemas relacionados à saúde do TGI se devem principalmente à desvios nutricionais associados a um ambiente inadequado de criação, especialmente nas primeiras semanas de vida da ave. De acordo com Dharne (2007), para incrementar a saúde intestinal das aves é fundamental ter consolidado conhecimentos sobre a fisiologia do sistema digestório desses animais.

Um intestino saudável deve ser capaz de digerir adequadamente e absorver os nutrientes que compõem a dieta, ter o mínimo de perda de nutrientes via excretas, além de prover proteção contra agentes enteropatogênicos. Atingindo esses requisitos, acaba por melhorar o índice de conversão alimentar e reduzir a mortalidade e perdas por morbidade (DHARNE, 2007).

É fácil identificar o TGI que não esteja funcionando corretamente em casos severos de necrose das paredes do lúmen intestinal decorrentes de uma infecção por *Clostridium perfringens*. Entretanto, segundo Svihus (2014), os casos mais comuns são encontrar situações subótimas de funcionamento, sem amostras evidentes de disfunção. Ao avaliar o desempenho e digestibilidade dos nutrientes nessas condições imperfeitas de funcionamento, os valores encontrados serão

alterados, pois a baixa digestibilidade pode estar relacionada tanto com a qualidade do alimento ingerido, como pela falta de integridade do epitélio intestinal.

2.5 Enzimas

Enzimas são proteínas globulares com uma complexa estrutura tridimensional que aceleram processos químicos. Elas exercem seus efeitos catalíticos em condições ambientais adequadas, como pH, temperatura e umidade, além de possuírem substratos específicos para atuação (DOSKOVIC *et al.* 2013; ANGEL & SORBARA, 2014).

A adição de enzimas às reações químicas torna possível controlar sistemas biológicos onde estas atuam, uma vez que elas não são consumidas ao longo das reações. Assim, a enzima catalisa a reação e depois retorna ao seu estado original quando a reação estiver completa, permitindo dessa maneira, que uma pequena quantidade de enzimas possa atuar sobre uma quantidade grande de substratos (ANGEL & SORBARA, 2014).

Para Santos (2010), a utilização de enzimas na nutrição animal leva em consideração uma preocupação especial: esses aditivos precisam manter um nível de atividade suficiente para que se possa obter resposta significativa em termos de desempenho zootécnico com o seu uso. Além disso, é importante que, mesmo com a mistura de outros ingredientes em uma ração, ou em situações de armazenamento do produto em diferentes temperaturas, as enzimas se mantenham ativas ao longo de todo o processo de produção de rações e também não se degradem pela ação das enzimas endógenas do animal.

De acordo com Angel & Sorbara (2014), poucas publicações utilizando enzimas em dietas para aves incluem a quantidade de substrato utilizada, e ainda menos pesquisas demonstram o impacto da enzima na degradação do substrato. Os mesmos autores realizaram uma revisão integrativa no periódico *Poultry Science* de Janeiro de 2010 a Dezembro de 2013, e observaram 37 artigos publicados que continham a palavra fitase (enzima que degrada o ácido fítico presente nos vegetais) no título, resumo ou ambos. Dessa pesquisa os autores concluíram que apenas 1 artigo realizou uma análise *in vitro* para observar a degradação do substrato mediante a enzima. Ainda concluíram que muitas pesquisas não publicaram dados importantes para o entendimento da ação da enzima, por exemplo: 44% dos artigos

não analisaram a quantidade de enzima na dieta, 63% não analisaram a quantidade de substrato na dieta (por exemplo, a quantidade de fitato) e 81% não analisaram o que restou do substrato no conteúdo intestinal ou excretas após a ação da enzima. Diversos trabalhos são publicados utilizando enzimas, mas no geral há pouco conhecimento sobre os substratos ou como os substratos podem se diferenciar entre os ingredientes e até mesmo ao longo do TGI (ANGEL & SORBARA, 2014).

Da mesma forma, Krabbe & Lorandi (2014), afirmam que a pesquisa em enzimologia avançou muito nos últimos anos na área de nutrição de aves e suínos. Porém, existe muito conhecimento ainda a ser pesquisado sobre o tipo e nível de substratos utilizados, estabilidade da ação enzimática e os métodos analíticos para sua determinação. Para Angel & Sorbara (2014), o conhecimento sobre a enzima e seu substrato é insuficiente para ter uma ideia completa dos processos digestivos. É importante entender como o ambiente químico pode mudar conforme o segmento intestinal à que se refere. Somado a isso, é fundamental ter claro como os nutrientes se comportam e interagem em uma mistura de ingredientes como uma ração no TGI e também as mudanças químicas e físicas que estes são submetidos ao longo dos processos de digestão.

Comercialmente na nutrição de aves, existem diversos produtos enzimáticos que são utilizados na formulação das rações. Um produto enzimático é um aditivo contendo material enzimático processado e padronizado para uso em alimentos ou matérias primas para consumo animal. Assim, Krabbe & Lorandi (2014), explicam que as enzimas ou complexos enzimáticos utilizados na nutrição atualmente são obtidas por processos de biotecnologia que incluem seleção de microrganismos para fermentação. A grande maioria das enzimas utilizadas nas dietas animais é oriunda de fontes de fermentação fúngicas ou bacterianas (DOSKOVIC *et al.* 2013).

Blends ou complexos enzimáticos são produtos que contém mais de um tipo de enzima ou são combinações de enzimas mono-componentes. Por exemplo, duas proteases que agem sinergicamente e podem ser geradas a partir de fermentações de cepas de microrganismos selecionados que produzem enzimas específicas (FREITAS *et al.* 2011). Dessa maneira, pode haver mais de um tipo de enzima atuando simultaneamente em um produto obtido a partir de fermentações múltiplas. As enzimas atuais tem predominância de uma atividade específica, protease, por exemplo, mas pode haver enzimas secundárias atuando em outros substratos presentes na dieta (FREITAS *et al.* 2011; KRABBE & LORANDI, 2014).

2.5.1 Por que utilizar enzimas nas dietas?

Desde a década de 1980, as enzimas ou complexos enzimáticos têm sido utilizados nas rações, alterando o perfil nutricional dos ingredientes, e vem desempenhando um papel importante para melhorar a eficiência da produção de carne e ovos. Seu modo de ação consiste basicamente na ligação com agentes antinutricionais em alguns ingredientes ou clivagem de substâncias químicas não disponíveis anteriormente e permitir melhor aproveitamento dos nutrientes pelos animais (BARLETTA, 2011).

As enzimas ou complexos enzimáticos são aditivos exógenos adicionados às rações dos animais para aumentar a digestibilidade dos nutrientes e melhorar sua eficiência de utilização. Para uma reação enzimática ocorrer no TGI é necessário que as condições ideais para atuação da enzima estejam presentes. Além disso, o substrato deve estar numa forma física e química que possibilite a ação enzimática sobre ele (ANGEL & SORBARA, 2014). Ainda, segundo Krabbe & Lorandi (2014), não se devem esquecer os cofatores específicos que são necessários e cruciais para a atuação enzimática. Segundo os autores, esses cofatores tendem a ser um ponto-chave na pesquisa em enzimologia nos próximos anos.

As enzimas endógenas são sintetizadas pelo próprio animal ou pela microbiota naturalmente presente no TGI. Porém, o processo digestivo nos animais não é totalmente eficiente. Barletta (2011) cita que cerca de 15% a 25% do que é consumido pelos animais não é passível de digestão, seja pela presença de fatores antinutricionais que indisponibilizam nutrientes, ou porque o animal não sintetiza determinadas enzimas necessárias à quebra dessas ligações, ou ainda o animal sintetiza a enzima porém não em quantidade equivalente para digerir o ingrediente presente na ração, principalmente no caso de aves jovens. O material não digerido pelo animal é lançado ao ambiente, que pode acarretar em grande impacto ambiental.

A suplementação de enzimas exógenas específicas melhora o valor nutricional dos alimentos, tornando o processo de digestão mais eficiente. As enzimas auxiliam na quebra de fatores antinutricionais, melhoram a digestibilidade do amido, proteínas, aminoácidos e minerais como cálcio e fósforo (BARLETTA, 2011; DOSKOVIC *et al.* 2013). A Tabela 4 resume os principais benefícios da inclusão de enzimas nas dietas:

TABELA 4 – PRINCIPAIS BENEFÍCIOS DA UTILIZAÇÃO DE ENZIMAS EXÓGENAS NAS DIETAS. FONTE: ADAPTADO DE BARLETTA, 2011.

Ação	Mecanismo de atuação
Melhora eficiência e reduz custo de produção	Por meio da quebra dos fatores antinutricionais e permitir uma melhor digestão dos nutrientes presentes na ração.
Reduz impacto ambiental	Melhora na digestão e absorção dos nutrientes, reduzindo a excreção de fósforo e nitrogênio ao ambiente.
Melhora uniformidade dos ingredientes	Reduz a variação ou flutuação da composição nutricional dos ingredientes, resultando em formulações mais precisas.
Manutenção da saúde e integridade intestinal	Por melhorar a digestibilidade dos nutrientes, reduz a presença de nutrientes não digeridos que podem ser substrato para o crescimento microbiano patogênico.

2.5.2 Enzimas proteolíticas na nutrição de aves

A nutrição proteica e aminoacídica em aves tem sido um dos temas com maior número de pesquisas na última década (ANGEL & SORBARA, 2014; KRABBE & LORANDI, 2014). Entretanto, de acordo com Angel & Sorbara (2014), os métodos para detecção da digestibilidade proteica ou de aminoácidos são discutíveis no que tange a eficácia da utilização de uma enzima exógena, por exemplo. Espera-se que as enzimas proteolíticas sejam mais eficientes na degradação de proteínas de menor qualidade (mais insolúveis) ou peptídeos grandes. As proteases são capazes de hidrolisar frações proteicas, mesmo na presença de fatores antinutricionais como a lectina e inibidores de tripsina comuns na soja, elevando a digestibilidade de aminoácidos e a metabolização da energia da dieta. Devido a essa característica, Krabbe & Lorandi (2014), citam que pode haver um uso mais intensivo de dietas a base de milho e farelo de soja futuramente.

A primeira publicação com enzimas foi realizada em 1926, com a descoberta e purificação da urease por Sumner, e mais adiante em 1964 houve outras publicações com enzimas digestivas; porém somente a partir de 1980 intensificou-se

a publicação de artigos nessa área. Tuoying (2005) cita que enzimas são adicionadas às rações como aditivos alimentares a mais de 50 anos, porém a partir de 1995 notou-se grande avanço das pesquisas na área de enzimologia para nutrição. Krabe & Lorandi (2014) mostram uma tendência de aumento no número de pesquisas com proteases nos últimos 3 anos para frangos de corte e concluem que as proteases ou enzimas proteolíticas serão o próximo foco intensivo de pesquisa na nutrição animal relacionada à enzimologia e nutrição.

TABELA 5 – LEVANTAMENTO DE PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS RELACIONADAS ÀS ENZIMAS NA NUTRIÇÃO ANIMAL UTILIZANDO A FERRAMENTA *WEB OF SCIENCE*. FONTE: ADAPTADO DE: KRABBE & LORANDI (2014).

Palavras-chave	1981- 1990	1991- 2000	2001- 2010	2011- 2014	Total
Enzyme + animal + feed	20	1772	2407	1097	5296
Protease + animal + feed	-	145	176	109	430
Enzyme + broiler	40	542	1334	639	2555
Protease + broiler	-	41	124	60	225
Enzyme + poultry	25	387	950	432	1794
Protease + poultry	2	39	124	78	243

Atualmente as proteases são avaliadas por meio de técnicas que incluem a digestibilidade ileal aparente, estandardizada ou verdadeira dos aminoácidos. No entanto, para Angel & Sorbara (2014), novas práticas para avaliação desse tipo de enzima podem ser desenvolvidos no futuro. Krabbe & Lorandi (2014), afirmam que a tendência é clara no aumento do uso de enzimas na nutrição animal e a pesquisa deve seguir no sentido de ajustar os métodos atuais e buscar novos recursos, aprimorar os processos de cultivo de microrganismos para fermentação e identificação do perfil de substratos presentes nas matérias primas.

A aplicação de proteases na nutrição de aves tem como principal objetivo complementar as enzimas endógenas secretadas pelo animal. A fisiologia do TGI desses animais secreta diversos tipos de enzimas proteolíticas, entretanto com a inclusão de enzimas exógenas, o aproveitamento desses nutrientes pode ser intensificado (ISAKSEN *et al.* 2011).

Wang *et al.* (2006) citam que é recomendada a adição da proteases às dietas de frangos de corte, pois tendem a melhorar desempenho e rendimento de carcaça. Porém seus efeitos mais evidentes são visualizados quando da utilização de dietas formuladas com baixos níveis de aminoácidos essenciais ou com base em valor baixo de proteína total, assim tendem a minimizar excreções de nitrogênio.

As proteases produzidas por microrganismos podem ser classificadas em três grupos: proteases ácidas, com atividade em pH variando de 2,0 a 5,0; proteases neutras, com atividade ótima em pH entre 6,0 e 9,0; e proteases alcalinas com atividade entre pH 9,0 e 11,0 (GUERRA, 1991), embora autores como Pant *et al.* (2015) considerem proteases com pH ótimo de 7,4 como alcalinas. Vários grupos de microrganismos conseguem produzir proteases a partir de processos fermentativos devido à sua velocidade de crescimento e podem ser manipulados geneticamente a fim de que produzam enzimas com características específicas (RAO *et al.* 1998).

De acordo com Siala *et al.* (2009) a grande maioria das proteases são obtidas a partir de cepas bacterianas de *Bacillus*. Entretanto as proteases fúngicas representam grande potencial de crescimento, uma vez que possuem maior facilidade de processamento do que as de origem bacteriana. Os autores isolaram o microrganismo *Aspergillus niger* como grande produtor de proteases ácidas, tendo atividade ótima em pH em torno de 3,0, considerando-o de uso estratégico para a indústria. Castro *et al.* (2014) concordam com o exposto e citam que as proteases de *A. niger* são mais ativas em pH entre 3,0 e 4,0, mas são estáveis em pH variando de 2,5 a 4,5.

Com relação às proteases de origem bacteriana, Pant *et al.* (2015) citam que a indústria geralmente as utiliza como produtoras de proteases e que as oriundas de fermentação por bactérias do gênero *Bacillus subtilis* são consideradas proteases alcalinas e possuem pH de atividade entre 7,0 e 8,0, sendo o ponto ótimo de pH 7,4.

No presente trabalho foi utilizado um complexo enzimático composto por duas proteases: uma delas oriunda de processos fermentativos fúngicos de *Aspergillus niger* (ATCC 16888); e a outra oriunda de fermentação bacteriana por *Bacillus subtilis* (ATCC SD 2106).

2.6 Ação de enzimas exógenas e sua relação com a taxa de passagem da digesta, antiperistaltismo e pH dos segmentos intestinais em aves

2.6.1 Tempo de retenção e taxa de passagem da digesta

Diversos são os fatores que afetam a digestão dos ingredientes de uma ração. Entre eles estão o tempo que o alimento permanece em cada segmento do trato gastrintestinal, pH da digesta, tamanho da partícula de ração e a própria composição dos ingredientes (ANGEL & SORBARA, 2014).

A taxa de passagem do alimento pelo TGI pode afetar a digestibilidade dos nutrientes, uma vez que altera o tempo que os substratos estarão expostos a ação de enzimas e também à superfície absorptiva do epitélio intestinal (ANGEL & SORBARA, 2014). Ainda, de acordo com Angel *et al.* (2013), a velocidade com que um alimento passa pelo TGI pode também alterar as populações microbianas presentes em cada segmento.

Krabbe & Lorandi (2014) reforçam que a atividade enzimática é a atividade catalítica para converter uma quantidade de substrato em uma quantidade específica de produto por unidade de tempo em condições específicas. No que se refere ao TGI dos animais, os autores citam que as condições de tempo de passagem e pH do meio sofrem alterações constantemente em função de características da dieta, como a granulometria da ração, o efeito tampão dos alimentos, teor de fibras na dieta, etc... Além disso, são influenciadas também pelo ambiente externo a que o animal esteja submetido, como qualidade da água de bebida, temperatura e condições metabólicas.

Com relação à função do proventrículo e moela e sua relação com a taxa de passagem, algumas particularidades são importantes de serem mencionadas: o tempo de retenção da ingesta pode variar entre 1 hora e 1 hora e meia (VAN DER KLIS *et al.* 1990) até duas horas (SVIHUS *et al.* 2002); e o tamanho desses órgãos é muito influenciado pelo teor de componentes estruturais como a fibra insolúvel nas rações (AMERAH *et al.* 2009). Ainda, a moela possui capacidade de reter partículas grossas e largas para moagem e seletivamente permite a passagem de partículas finas e solúveis (SVIHUS, 2014).

Para Svihus (2014), o tempo de retenção das partículas nos segmentos do TGI vai ser maior conforme o teor de componentes estruturais da ração aumentar.

Por exemplo, se o tempo de retenção na moela for aproximadamente 1 hora com uma ração padrão com poucos componentes estruturais, provavelmente será em torno de 2 horas se a moela for estimulada pela adição de fibras às dietas.

2.6.2 Antiperistaltismo

De acordo com Dukes (2006), nas aves ocorre um movimento denominado antiperistaltismo, ou peristalse reversa, uma vez que os alimentos seguem em ambos os sentidos (cranial-caudal) no lúmen dos órgãos digestivos. Esse movimento retrógrado ocorre em porções específicas do trato como da moela para o proventrículo; do íleo proximal passando pelo jejuno, duodeno até o proventrículo; e também no intestino grosso, resultando em movimento do bolo da cloaca retornando aos cecos e íleo distal (DUKES, 2006). Para Angel & Sorbara (2014), as implicações do antiperistaltismo em aves são fundamentais na capacidade de digestão. Entretanto, o conhecimento acerca desse tema ainda é escasso, pois há dificuldade em mensurações quantitativas em termos de digestibilidade de nutrientes.

Apesar do antiperistaltismo, as enzimas secretadas pelo pâncreas, por exemplo, não são desnaturadas no proventrículo e moela, o que demonstra uma conservação das enzimas, fato este que diminui o custo energético para a ave e evidencia a importância do movimento retrógrado na capacidade digestiva desses animais (ANGEL *et al.* 2013; ANGEL & SORBARA, 2014). Essa informação corrobora com os dados de Sklan *et al.* (1978), que encontraram atividade de enzimas proteolíticas depois de incubar o conteúdo da moela no pH em torno de 3,5. Ainda, encontraram atividade proteolítica e lipolítica no mesmo conteúdo ao incubá-lo em pH 6,5. Esse fato demonstra que a atividade enzimática é dependente do pH utilizado, e nessa situação demonstrada por Sklan *et al.* (1978), não houve desnaturação das enzimas pancreáticas tripsina e lipase quando expostas à pH ácido, e apesar dos movimentos antiperistálticos presentes nas aves, essas enzimas continuam ativas quando retornam ao intestino delgado, local de atuação propriamente dito.

Angel *et al.* (2013) citam que esse fato das enzimas não se desnaturarem nas condições luminiais do proventrículo e moela são importantes para entender de que maneira o antiperistaltismo influencia a digestibilidade dos componentes da dieta. De acordo com esses autores, a reexposição da digesta aos diferentes pH do

TGI faz com que a ração esteja continuamente mudando suas condições químicas e físicas. Ainda, o mesmo autor cita que é importante rever os protocolos de determinação da digestibilidade parcial e total dos nutrientes e incluir também o jejum nesse contexto, em função da taxa de passagem, dos pHs dos meios e dos movimentos antiperistálticos.

2.6.3 pH dos segmentos intestinais

Em situações onde ocorre a adição de enzimas exógenas às rações, o papo tem papel chave, uma vez que esse segmento é o único local do TGI onde o conteúdo de água presente proveniente da ingestão das aves pode ser decisivo na eficácia da ação dessa enzima. Assim o tempo que a digesta permanece nesse segmento pode alterar para mais ou para menos a ação enzimática sobre os substratos ao longo do TGI (SVIHUS, 2014). Para Rynsburguer (2009), ainda são escassos os estudos referentes a função e morfologia do papo em aves, mas sabe-se que mudanças na microbiota desse segmento ocorrem com a idade da ave. O autor conclui que em aves adultas, a microbiota torna-se predominantemente acidogênica com a presença de *Lactobacillus spp.*, que com seu metabolismo reduzem o pH do papo.

Para Angel *et al.* (2013), o pH dentro de cada segmento do TGI é importante para definir o ambiente químico que o bolo alimentar vai estar exposto, e dele depende a efetividade da ação das enzimas, tanto endógenas como exógenas. Para esses autores, o que define a ação que as enzimas terão sobre os substratos é o tempo de passagem e o pH dos segmentos. Segue na Tabela 6 um levantamento de literatura onde constam diferentes trabalhos com mensurações de pH dos segmentos do TGI das aves, onde pode-se observar variações entre os experimentos.

TABELA 6 – LEVANTAMENTO DE LITERATURA SOBRE A MENSURAÇÃO DO PH DE DIFERENTES SEGMENTOS DO TGI EM AVES. *DADOS NÃO PUBLICADOS; CITADOS POR ANGEL *et al.* (2013).

Segmento	Moran, (1982)	Gauthier, (2002)	Rynsburguer & Classen, (2007)	Angel <i>et al.</i> (2010)	Angel <i>et al.</i> (dados não publicados)*
Papo	6,3	5,5	6,02	5,4	6,0 - 7,6
Proventrículo	1,8	2,5	3,37	-	1,9 - 4,1
Moela	2,5	3,5	3,27	2,0	2,9 - 5,6
Duodeno	6,4	5,0 - 6,0	7,74	5,8	5,8 - 6,0
Jejuno	6,6	6,5 - 7,0	-	6,3	6,4 - 6,6
Íleo	7,2	7,0 - 7,5	8,15	6,5	6,6 - 7,1
Cecos	6,9	8,0	-	6,3	6,7 - 7,3
Cloaca	7,0	-	-	-	

Em revisão bibliográfica de Svihus (2014), grandes variações de pH do papo foram descritas na literatura. Em alguns obtiveram pH acima de 6, embora outros experimentos descritos encontraram pH do papo na faixa de 4,5 a 5,9. As rações de monogástricos possuem pH variando em torno de 5,5 a 6,5. O autor conclui que quanto maior o tempo que a ingesta fica retida no papo, maior a fermentação que ocorre nesse segmento produzindo ácidos orgânicos e reduzindo o pH. A maioria das enzimas exógenas adicionadas às rações possui pH ótimo de atuação da faixa entre 4 e 6, porém pode haver variações dependendo da fonte da enzima que modifica a atividade catalítica do produto nas faixas de pH.

2.7 Leveduras, prebióticos e derivados

Leveduras são organismos unicelulares que são comumente encontrados em ambientes naturais. Há cerca de 1500 espécies conhecidas, mas estima-se que esse número represente apenas 1% de toda a diversidade das leveduras descritas. São microrganismos anaeróbios facultativos, ou seja, crescem na presença ou ausência de oxigênio (CURRY, 2009). Leveduras e seus fermentados estão intimamente associados com a história humana. As características bioquímicas da célula de levedura viva têm sido utilizadas no processamento de alimentos e

bebidas, combustíveis e servem como uma grande fonte de nutrientes. Nos últimos 20 anos, cresceu o número de pesquisas que utilizam leveduras ou componentes específicos de parede celular como aditivos alimentares, devido ao papel estratégico desses compostos na melhora do desempenho zootécnico (DAWSON, 2001).

Produtos a base de leveduras são utilizados na alimentação animal há séculos, mas seu mecanismo de ação *in vivo* e *in vitro* ainda não está totalmente elucidado. Leveduras vivas são descritas como capazes de proteger a mucosa intestinal contra microrganismos invasores, pois formam uma barreira contra esses patógenos. Além disso, contribuem com a maturação do sistema imunológico do animal hospedeiro, agindo como probióticos (REISINGER *et al.* 2012). Componentes da parede celular das leveduras, como os mananligossacarídeos, são conhecidos por prevenir a colonização dos patógenos no trato intestinal, ao se ligarem com bactérias patogênicas que possuem fímbrias tipo-1 específicas. Esses produtos possuem também atividade prebiótica, o que leva a um acréscimo das bactérias benéficas como lactobacilos e bifidobactérias (REISINGER *et al.* 2012).

A parede celular de leveduras é uma matriz complexa com misturas de carboidratos, principalmente manose, e proteínas que possuem características adsorptivas, que podem ser benéficas na ligação com toxinas e proteína específicas (DAWSON, 2001). São carboidratos, principalmente oligossacarídeos, por exemplo, mananligossacarídeos e β -glucanos, que quando extraídos da parede celular de leveduras podem impedir o desenvolvimento de bactérias não desejáveis e estimular o sistema imune não específico (LINGE, 2005). Segundo Flickinger & Fahey (2002), mananligossacarídeos são complexos de proteínas e polissacarídeos derivados de leveduras que são indigestíveis para animais monogástricos e podem agir no TGI como prebióticos, favorecendo as condições para a proliferação de bactérias benéficas. β -glucanas são polímeros de glicose derivados de parede celular de leveduras, mas também podem estar presentes em bactérias, fungos e cereais.

De acordo com Dawson (2001), as fímbrias das bactérias enteropatogênicas reconhecem os resíduos de manose e outros carboidratos da parede celular das leveduras. Assim, a inclusão de leveduras nas dietas pode bloquear o ataque de bactérias ao aderir nessas estruturas e reduzir a colonização. Segundo Spring *et al.* (2000), a parede celular de levedura, pela sua composição em mananligossacarídeos, possui a capacidade de reduzir a prevalência e prevenir a colonização de patógenos no trato gastrintestinal. Os mesmos autores relataram

redução de diversas cepas de *Salmonella* e *E. coli* no intestino ao utilizarem derivados de parede celular de leveduras na dieta das aves.

2.7.1 Leveduras na nutrição de aves

Nos anos recentes, aditivos alimentares como promotores de crescimento têm sido utilizados para efetivamente reduzir o consumo de ração, custos e aumentar o ganho de peso, reduzindo as injúrias ao animal (AGHDAM SHAHRYAR *et al.* 2012).

Além da qualidade dos produtos, os consumidores atuais tem dado atenção especial às questões de segurança alimentar. O uso de antibióticos como promotores de crescimento na indústria avícola tem sido recentemente discutido pelas políticas governamentais, também pelo efeito residual em humanos. Na União Européia, desde 2006 está proibido o uso de antibióticos como promotores de crescimento, particularmente pela evidência de que induzem resistência dos microrganismos (ALLOUI *et al.* 2013). Assim diversas outras substâncias tem sido estudadas como potenciais substitutivos aos antibióticos, entretanto são necessários mais estudos para elucidar o modo de ação desses compostos (SANTIN *et al.* 2001).

Prebióticos podem ser definidos como: Ingredientes não digestíveis incluídos na ração que beneficiam o animal, estimulando seletivamente o crescimento e/ou atividade de algumas espécies de bactérias já residentes no TGI, melhorando a saúde e desempenho do animal hospedeiro (SPRING *et al.* 2000).

TABELA 7 – CARACTERÍSTICAS DOS PREBIÓTICOS E SUAS PROPRIEDADES.
 FONTE: ALLOUI *ET AL.* (2013).

Propriedades	Influências positivas
Não são absorvidos ou hidrolizados.	Elevam a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC).
Estimulam e selecionam o crescimento de bactérias benéficas.	Melhora a biomassa e a composição das fezes.
Melhoram positivamente a atividade da microbiota intestinal.	Elevam a síntese de vitamina B.
Modulam o sistema imunológico do animal hospedeiro.	Altera positivamente a absorção de minerais. Decrescem níveis de colesterol no sangue. Reduz excreção de ureia e amônia.

A utilização das leveduras como prebióticos foi relatado por Santin *et al.* (2001), ao reduzir enteropatógenos e melhorar o desempenho das aves, sugerindo uma possível redução de contaminação ambiental, pela menor excreção de compostos não digeridos potencialmente poluentes.

Na medicina humana, a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, não patogênica, tem sido amplamente utilizada em combinação com antibióticos terapêuticos para evitar diarreias. Entretanto há poucos estudos ainda que confirmem esse benefício na avicultura, como melhorador de desempenho e redução de enteropatógenos (SANTIN *et al.* 2001). Dawson (2001) cita que a inclusão de derivados de parede celular de leveduras pode ser utilizada para controlar a composição da população microbiana no trato gastrintestinal, prevenir a colonização de patógenos, se ligarem a toxinas e modular o sistema imunológico.

Aves recém-eclodidas não possuem a complexa flora microintestinal formada e são propensas a serem colonizadas por microrganismos entéricos patogênicos. A colonização do trato gastrintestinal se inicia logo após a eclosão. A maioria desses microrganismos está presente nos cecos. Entretanto também há colonização no intestino delgado. A presença de microrganismos patogênicos no intestino afeta o desenvolvimento normal das aves, e em consequência a digestão e absorção de

nutrientes (SANTIN *et al.* 2001). Para minimizar esse risco pode-se fornecer via ração aditivos alimentares que promovem exclusão competitiva, limitando a ação de patógenos e beneficiando o crescimento de bactérias desejáveis (SPRING *et al.* 2000).

Além disso, após a eclosão há uma mudança abrupta na fonte de nutrientes e na colonização do trato gastrintestinal. Essas mudanças promovem a adaptação da ave ao ambiente e a sobrevivência. A ingestão rápida de ração após a eclosão promove o desenvolvimento da mucosa do trato gastrintestinal e das estruturas a ela associada para absorver os nutrientes presentes no lúmen intestinal (SANTIN *et al.* 2001). O sistema imunológico de aves recém-eclodidas também necessita de maturação, pois está preparado para combater patógenos não específicos somente por meio da imunidade inata. O contato com antígenos externos promove o desenvolvimento celular e humoral contra patógenos específicos, sendo esse contato conhecido como imunidade adquirida (SILVA *et al.* 2009).

Uma das características mais marcantes na utilização de leveduras na nutrição animal é a sua capacidade de modular o sistema imunológico. Dawson (2001) sugere que a inclusão de mananoligossacarídeos na dieta das aves modifica as funções imunológicas, indicando um aumento de células B e T no caso de uma primeira exposição a um antígeno. A saúde intestinal é fundamental para estabelecer programas de imunização. Um intestino saudável promove uma adequada absorção de nutrientes que permite ao sistema imunológico, em caso de contato com enteropatógenos, responder rapidamente e ativar células natural-killers (NK).

Santin *et al.* (2001) mostraram que a parede celular do *Saccharomyces* melhora vários aspectos da mucosa, como altura de vilos, profundidade de criptas e relação vilo:cripta. Os mesmos autores sugerem que essa pode ser a explicação do melhor desempenho de frangos alimentados com derivados dessa levedura. Reisinger *et al.* (2012), relataram que a inclusão de derivados de parede celular de levedura na ração das aves influenciou positivamente o peso final, o ganho de peso e a conversão alimentar. Além disso, observaram o aumento da densidade de células caliciformes no intestino delgado e redução do número de enterócitos apoptóticos. Os autores relatam que o aumento na densidade das células caliciformes pode estar relacionado com uma possível proteção contra infecções

primárias pela secreção de muco e pode explicar a melhora no desempenho das aves.

É possível utilizar parede celular de leveduras como base para gerenciar a saúde e o desempenho das aves (DAWSON, 2001). São potentes alternativas ao uso de suplementos antimicrobianos em diversos sistemas de produção. Aparentemente os mecanismos que explicam os seus efeitos benéficos divergem dos mecanismos utilizados para explicar os efeitos dos antibióticos como promotores de crescimento. Segundo o mesmo autor, estudos são necessários ainda para dirimir de que maneira esses compostos agem.

2.7.2 Uso de derivados de fermentação de levedura na avicultura

Culturas de leveduras possuem metabólitos como peptídeos, ácidos orgânicos, oligossacarídeos, aminoácidos e possivelmente algumas substâncias ainda não identificadas promotoras de crescimento que podem estar atribuídas a essa melhora no desempenho zootécnico das aves suplementadas com esses produtos. Gao *et al.* (2009), ao utilizarem os derivados de levedura nas rações para aves por 42 dias, observaram melhora no sistema imunológico. Esse estudo confirma que o produto modula o sistema imunológico das aves por permitir que a ave responda melhor ao estresse provocado por patógenos intestinais como a Coccidiose, por exemplo.

Price *et al.* (2010) afirmam que a inclusão desses produtos possui grande efeito melhorador de desempenho, principalmente para animais que estejam expostos a infecções. Os efeitos prebióticos podem auxiliar na recuperação dos animais após uma infecção gastrintestinal, recuperando a morfologia do epitélio e promovendo o crescimento bacteriano benéfico em leitões.

Firman *et al.* (2013), ao fornecer derivados de fermentação de levedura na dieta para perus de corte, observaram melhora na conversão alimentar e na proporção de músculo peitoral nessas aves, mas não encontrou diferenças significativas em parâmetros morfológicos do intestino. Gao *et al.* (2008), encontraram melhoria no ganho médio diário e conversão alimentar de frangos alimentados com esses produtos. Ainda, de acordo com os mesmos autores, os resultados obtidos por diferentes pesquisadores podem ser de difícil comparação, uma vez que existe uma variedade de produtos derivados de leveduras, como

levedura viva, fermentada, leveduras ativas e metabólitos da parede celular de leveduras.

A adição desses produtos à ração representa a possibilidade de melhorar o desempenho zootécnico das aves em vários aspectos, não se restringindo apenas ao TGI e sistema imunológico. Ainda são necessários diversos estudos para explicar fisiologicamente o modo de ação desses compostos no organismo das aves (SPRING *et al.* 2000; SANTIN *et al.* 2001). Entretanto, sabe-se que possuem ação semelhante no organismo das aves. Os prebióticos estudados nesse trabalho, por serem compostos oriundos da fermentação química de leveduras podem conter derivados de enzimas proteicas ou outros compostos ainda não identificados.

TABELA 8 – PRODUTOS A BASE DE FERMENTAÇÃO DE LEVEDURAS *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* UTILIZADOS. FONTE: INFORMAÇÕES DOS FABRICANTES.

Produto	Descrição
A	Levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> cultivada em substrato de milho amarelo, canjica, farelo de glúten de milho, farelo de trigo, farelo de centeio, maltose, xarope de milho e melação de cana.
B	Levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e meios de cultivo, composto por produtos de fibras, subprodutos de grãos processados e melação de cana.
C	Mistura de extratos de fermentação com atividade de enzima proteolítica a partir de leveduras.

2.8 Adaptação e aplicação de técnica para a quantificação de enzimas

2.8.1 Quantificação de proteínas

Pesquisas que trabalham com proteínas, incluindo caracterização e purificação, necessitam métodos eficientes, precisos e rápidos para quantificar esses compostos. Atualmente trabalha-se muito com técnicas espectrofotométricas para determinação de proteínas totais, sendo estes compostos de grande interesse para a indústria de alimentos e pesquisas em diversas outras áreas da ciência (ZAIA *et al.* 1998). Para esses autores, apesar da composição proteica das amostras ser

importante na pesquisa em diversas áreas, cada uma delas com um objetivo específico, todas tem um ponto em comum: a metodologia utilizada deve ser adequada à amostra e deve haver poucos interferentes que possam trazer resultados duvidosos.

Sabendo da importância do papel das proteínas nos organismos vivos, atuando na maioria dos processos biológicos como enzimas, hormônios, neurotransmissores, transportadores, entre outros, é de fundamental importância o desenvolvimento de técnicas precisas para quantificação proteica inclusive na área de nutrição animal no sentido de promover o aproveitamento racional dos nutrientes, e objetivando melhorar a eficiência e a atuação de enzimas exógenas nas dietas.

De acordo com Zaia *et al.* (1998), diversos métodos espectrofotométricos tem sido desenvolvidos para a determinação de proteínas totais nas amostras, entretanto não há um método considerado de uso universal para todos os substratos. Os autores citam as técnicas do biureto, de Lowry, de Bradford e de Smith como as mais utilizadas na determinação proteica.

Para Zaia *et al.* (1998), independente do método escolhido para determinação proteica, é necessário o conhecimento da natureza da amostra, qual a sua composição e concentração aproximada dos constituintes. Esse conhecimento pode proporcionar uma base forte para a identificação de possíveis interferentes nos resultados das análises. Obviamente, outros fatores como a concentração de proteína na amostra, o volume da amostra, a rapidez e o custo da análise são influenciadores da sensibilidade do método e confiabilidade dos resultados obtidos no momento da escolha da técnica. De acordo com os autores, geralmente escolhe-se a metodologia para determinação proteica com base na popularidade de um método, e não pelo conhecimento acerca da amostra. Esse fato acontece em parte pela escassez de trabalhos comparando diferentes técnicas na quantificação de proteínas. Muitos trabalhos ainda devem ser desenvolvidos especialmente na área de tecnologia de alimentos para consolidar a metodologia mais eficiente.

2.8.2 Método de Bradford

Uma das técnicas mais utilizadas para detecção e quantificação proteica em diversos meios é a proposta por Bradford (1976), onde um reagente denominado “Coomassie Brilliant Blue – BG-250” ou Azul Brillhante de Coomassie (Figura 3)

reage com as proteínas presentes nas amostras em uma solução ácida. Segundo Zaia *et al.* (1998), o reagente de Bradford reage com macromoléculas de proteínas que possuem aminoácidos com cadeias laterais básicas ou aromáticas. O corante interage principalmente com resíduos de arginina, mas também com resíduos de histidina, lisina, triptofano, tirosina e fenilalanina.

Para a execução do reagente de Bradford, são necessários o corante Coomassie Brilliant Blue – BG-250, álcool etílico e ácido fosfórico. O ácido fosfórico é utilizado devido a proporcionar alta solubilidade de proteínas e também porque possui capacidade de tamponamento no pH utilizado na reação (READ & NORTHCOTE, 1981).

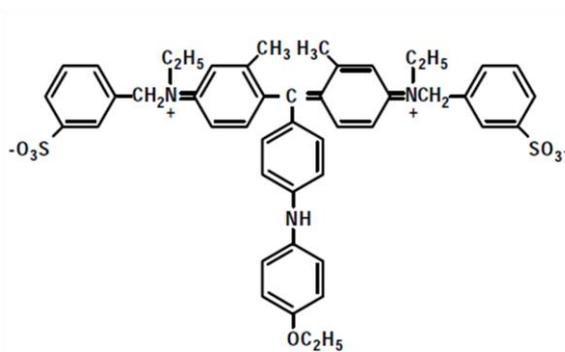


FIGURA 3 – CORANTE COOMASSIE BRILLIANT BLUE - BG-250

No pH que se desenvolve a reação ocorre uma interação entre o corante BG-250 e as proteínas de alto peso molecular, o que leva a um deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, e, quando se lê essa amostra em 595 nanômetros em espectrofotômetro, observa-se grande absorvância (BRADFORD, 1976; READ & NORTHCOTE, 1981). O mecanismo que explica a ligação entre o corante e a proteína é a atração eletrostática dos grupos derivados do ácido sulfônico presentes no corante, e também através de forças de Van der Waals e interações hidrofóbicas entre a proteína e o reagente de Bradford. O número de moléculas de corante segundo Bradford (1976); e Tal *et al.* (1980) que se liga às proteínas é dependente da quantidade de cargas positivas que ela possui, em torno de 1,5 a 3 moléculas de corante para cada carga positiva da proteína.

A interação entre o corante e a proteína promove uma alteração colorimétrica, passando da cor castanho avermelhado para a cor azul. A resposta de cor na leitura em 595 nanômetros é linear, ou seja, para cada quantidade de proteína há uma absorvância específica e uma resposta colorimétrica. Para Bradford (1976), a ligeira

não-linearidade que pode estar atrelada à técnica é devido ao próprio corante que possui duas tonalidades de cor. Essas tonalidades podem se sobrepor no espectro de 595 nm provocando uma não-linearidade da leitura. Dessa forma é necessário estabelecer uma curva-padrão para cada ensaio com uma proteína de concentração conhecida.

Para Read & Northcote (1981), a proteína da curva padrão mais utilizada é a soroalbumina bovina (do inglês BSA – bovine serum albumin). O ensaio deve ser lido o mais rápido possível a partir da colocação do reagente de Bradford sobre a amostra, porque com o passar do tempo o reagente precipita as proteínas afetando a linearidade da resposta. De acordo com Read & Northcote (1981), a reação de coloração entre o corante e a proteína da amostra leva menos de 5 minutos para aparecer, e a leitura da amostra em espectrofotômetro pode ser realizada em até 1 hora. Bradford (1976) cita que o corante reage com a proteína em menos de 2 minutos e o complexo proteína-corante permanece na solução por aproximadamente 1 hora.

Read & Northcote (1981), trabalharam com a análise de Bradford utilizando como tampão de solução o PBS (phosphate-buffered saline) e como curvas padrão as proteínas BSA e Lisozima. Na faixa de pH que se encontra o tampão PBS (~7,4), os autores citam que as proteínas encontram-se carregadas positivamente. É esperado que as proteínas se liguem menos rapidamente ao corante quando há cargas positivas nessas moléculas. Para Read & Northcote (1981), a eficiência da ligação entre o corante e a proteína na solução é dependente do valor de pH do tampão utilizado.

O método de Bradford é rápido, sensível e sujeito a poucos interferentes que eventualmente podem influenciar na quantificação proteica final das amostras (Read & Northcote, 1981). De acordo com Bradford (1976), Read & Northcote (1981), e Zaia *et al.* (1998), as desvantagens do método podem estar no fato de que algumas proteínas específicas necessitam de outros comprimentos de onda para expressar a maior absorvância devido a sua baixa solubilidade, ou ainda o resultado pode estar atrelado ao baixo peso molecular das proteínas. Os autores citam ainda que a procedência e o grau de pureza do corante BG-250 pode despadronizar a análise. Para os mesmos autores, algumas substâncias podem interferir no resultado proposto pela técnica de Bradford (1976).

Essas substâncias interferentes podem reagir com as proteínas da amostra impedindo a ação do corante, ou ainda reagir com o próprio corante, aumentando a absorvância e proporcionando resultados falsos. Para Zaia *et al.* (1998) é possível a eliminação desses interferentes através de várias práticas, entretanto a mais indicada é a precipitação das proteínas com o ácido tricloro acético (TCA). Na Tabela 9, proposto por Bradford (1976), observam-se as principais substâncias que podem influenciar os resultados obtidos por meio dessa metodologia.

TABELA 9 – PRINCIPAIS SUBSTÂNCIAS QUE INTERFEREM NA DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS PELO MÉTODO DE BRADFORD. FONTE: ADAPTADO DE: BRADFORD (1976).

Interferentes	Observações
Substâncias detergentes (SDS, Triton-X...)	Os detergentes reagem com o corante BG-250, interferindo na absorção a 595 nm, e podem levar a resultados falsos positivos.
Polifenóis	Reagem com as proteínas da amostra impedindo a ação do corante.
Lipídios	Podem provocar turbidez na amostra, interferindo na absorvância

Tal *et al.* (1980) citam que várias pesquisas tem sido publicadas utilizando a técnica de Bradford para quantificação de proteínas totais nas amostras. Uma particularidade citada por esses autores é de que há inúmeras modificações no método para adaptá-lo às diferentes amostras e necessidades de cada pesquisa. Read & Northcote (1981), adaptaram o método alterando as inclusões propostas por Bradford (1976), de corante, etanol e ácido fosfórico e reportaram diferenças na determinação proteica. As alterações metodológicas visam obter curvas padrão de resposta semelhantes à curva obtida pela proteína soro albumina bovina (BSA).

2.8.3 Atividade enzimática

A cinética enzimática é o campo dentro da Enzimologia que estuda a velocidade das reações catalisadas por enzimas e também dos fatores que afetam essa dinâmica. A manutenção da homeostase de um organismo é, em parte,

influenciada pelo equilíbrio das atividades enzimáticas, nesse sentido é importante o conhecimento acerca da cinética das enzimas para melhor compreender os processos fisiológicos dos animais (Nelson & Cox, 2011).

As proteases, ou enzimas proteolíticas, participam de diversos processos fisiológicos, incluindo a digestão, hidrólise de cadeias peptídicas, influenciam a resposta imunológica, amplificação de sinais, ativação de cascatas intracelulares (LEVY *et al.* 2004; JUNG *et al.* 2012). A análise da cinética das enzimas, e das proteases especificamente, pode trazer respostas elucidativas sobre o modo de ação dessas enzimas no trato gastrointestinal, pois segundo Doskovic *et al.* (2013), apesar do grande número de pesquisas, ainda há incerteza sobre o modo de ação desses compostos.

A transformação dos compostos por ação de enzimas vai resultar em produtos com composição química diferente dos substratos, sendo este aspecto um grande desafio a ser monitorado pelas técnicas analíticas (GRAY *et al.* 2013). Existem diversas maneiras de mensurar a atividade enzimática, por exemplo, por marcação radioativa, técnicas de fluorescência, detecção eletroquímica, espectrometria de massa, entre outros.

A avaliação da atividade enzimática por marcação de fluorescência e posterior análise por espectroscopia é uma das técnicas mais comuns atualmente. Os marcadores por fluorescência são mais baratos, e mais seguros do que os marcadores radioativos (GRAY *et al.* 2013). Os autores citam que um dos protocolos mais comuns é adicionar moléculas fluorescentes ligadas aos substratos, e após ação enzimática observar e monitorar a fluorescência fornecida em espectrofluorímetro.

Existem kits comerciais disponíveis no mercado que possuem reagentes marcados com fluorescência que permitem a detecção da presença de atividade proteolítica. Nesses kits, uma proteína conhecida, caseína, por exemplo, é marcada com uma molécula fluorescente. Esse complexo Proteína-Fluorescente é o substrato da reação, e quando a amostra potencialmente enzimática é aplicada, ocorre a dissociação desta ligação e as moléculas fluorescentes tornam-se ativas e passíveis de mensurar em espectrofluorímetro em absorvância específica (TWINING, 1984; CUPP-ENYARD, 2009). A atividade enzimática da amostra é comparada à capacidade de uma enzima conhecida, tripsina, por exemplo, em realizar a mesma clivagem da ligação Proteína-Fluorescente.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Experimento 1. Coeficiente de digestibilidade ileal de fontes proteicas

3.1.1 Local

O estudo foi conduzido nas instalações da Sala de Metabolismo do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, localizada no município de Curitiba – PR, com aprovação pelo Comitê de Ética ao Uso de Animais (CEUA) da UFPR, sob o número 815/2014.

3.1.2 Animais e alojamento

Foram utilizados 480 pintos de corte machos da linhagem comercial Cobb 500®, no período de 1 a 21 dias de idade, nas instalações da Sala de Metabolismo. As aves foram vacinadas no incubatório contra Bouda Aviária, Marek, Gumboro e Bronquite Infecciosa.

3.1.3 Instalações

As aves foram alojadas em gaiolas metabólicas de arame galvanizado de 4 andares, divididas em 4 gaiolas por andar, com dimensões de 0,90 x 0,40 x 0,30m (c x l x h), conforme figura 4. Todas as gaiolas eram equipadas com bebedouros e comedouros tipo calha. Abaixo de cada gaiola continha uma bandeja forrada com lona preta para coleta das excretas. Realizou-se o aquecimento por meio de lâmpadas incandescentes de 150 W e por aquecedores elétricos. Termômetros de máxima e mínima foram utilizados para verificar a temperatura.



FIGURA 4 – SALA DE METABOLISMO – SCA – UFPR.

3.1.4 Manejo

As aves receberam água e ração *ad libitum* e luz contínua com 24 horas de luz artificial durante todo o período experimental. A sala onde as aves foram criadas possuía temperatura controlada, mantida ao primeiro dia a temperatura de 32°C e gradativamente sendo diminuída até 22°C aproximadamente aos 21 dias de idade. Diariamente, realizou-se a verificação da temperatura, fornecimento de ração, limpeza e abastecimento dos bebedouros. As aves eram inspecionadas para remoção da mortalidade.

3.1.5 Dietas experimentais

Foi fornecida uma dieta basal de referência para todas as aves de 1 a 13 dias sem adição das fontes proteicas testadas e aditivos. A partir dos 14 dias, as dietas experimentais foram distribuídas entre os tratamentos e as aves passaram por 3 dias de adaptação à essas dietas e mais um período de 3 dias para coleta de excretas, conforme Tabela 10. A ração referência foi formulada de acordo com as recomendações de Rostagno *et al.* (2011) para a fase inicial e confeccionada na fábrica de rações da Fazenda Experimental do Canguiri da Universidade Federal do Paraná. Na ração referência foi adicionado 1,5% de Celite® (Celite Corp., Lompoc, CA, EUA) como marcador indigestível. A composição da ração referência (RR) consta na Tabela 11. Para a confecção das dietas experimentais, utilizou-se o método de substituição proposto por Matterson *et al.* (1965), no qual manteve-se 80% da ração referência e misturou-se a essa quantidade 20% do ingrediente teste, conforme Tabela 12. Os ingredientes proteicos foram analisados separadamente e a composição consta na tabela 13.

TABELA 10 – ESQUEMA DE ARRAÇOAMENTO PARA AS AVES DURANTE O PERÍODO EXPERIMENTAL.

Alojamento até 13° dia	Ração referência para todos os tratamentos
14° a 16° dia	Rações teste – período de adaptação
17° a 20° dia	Rações teste – Período de coleta de excretas na bandeja
21° dia	Abate – coleta de conteúdo ileal

TABELA 11 – INGREDIENTES E COMPOSIÇÃO QUÍMICA (COM BASE NA MATÉRIA SECA) ANALISADA E CALCULADA DA RAÇÃO REFERÊNCIA.

Ingrediente	g/kg
Milho	609,72
Farinha de Trigo	100,00
Levedura de Cana	50,00
Plasma	20,00
Protenose de milho	108,00
Farinha de vísceras	50,00
Calcário	12,63
Fosfato bicálcico	16,25
Cloreto de Potássio	2,70
Bicarbonato de sódio	3,00
Celite™	15,00
L-treonina 98,5	0,70
L-lisina 78%	6,75
DL-metionina 99%	1,25
Premix Vitamínico	2,00
Premix Mineral	2,00
Total	1000,00
Níveis Nutricionais	Valores
Energia Metabolizável (kcal/kg)	3130,00
Proteína Bruta (%)	22,07
Extrato Etéreo (%)	4,35
Fibra Bruta (%)	0,91
Matéria Mineral (%)	5,95
Cálcio (%)	1,01
Fósforo Disponível (%)	0,46
Sódio (%)	0,20
Cloro (%)	0,33
Lisina digestível (%)	1,14
Metionina + Cistina digestível (%)	0,85
Treonina digestível (%)	0,75
Triptofano digestível (%)	0,13

*Níveis de garantia por kg de produto: Vit. A 10500000 UI; Vit. D3 2600000 UI; Vit. E 20000 UI; Vit. K3 2500 mg; Vit. B1 1900 mg; Vit. B2 6500 mg; Vit. B6 2900 mg; Vit. B12 17000 mcg; Niacina 40 g; Ác. Pantotênico 12 g; Ác. Fólico 1000 mg; Biotina 65 mg; Selênio 300 mg; BHT 1000 mg; Manganês 60 g; Zinco 50 g; Ferro 40 g; Cobre 8000 mg; Iodo 800 mg.

3.1.6 Delineamento e tratamentos

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com dez tratamentos e oito repetições de 6 aves cada. Os tratamentos experimentais estão descritos na Tabela 12. O blend de proteases utilizado (TECMAX PRO®, Tectron Nutrição e Saúde Animal, Toledo, PR, Brasil), termoestáveis é composto por produto de fermentação de *Aspergillus niger* (ATCC 16888) e produto de fermentação de *Bacillus subtilis* (ATCC SD 2106).

TABELA 12 – DESCRIÇÃO DOS TRATAMENTOS EXPERIMENTAIS.

T1	100% Ração referência (RR)	Sem enzima
T2	100% RR	Com enzima (125g /ton)
T3	80% RR + 20% Farelo de soja (FS)	Sem enzima
T4	80% RR + 20% FS	Com enzima (125g /ton)
T5	80% RR + 20% Soja integral Desativada (SID)	Sem enzima
T6	80% RR + 20% SID	Com enzima (125g /ton)
T7	80% RR + 15% Soja Integral Desativada (SID) + 5% Soja Integral Crua (SIC) (SIDSIC)	Sem enzima
T8	80% RR + 15% SID + 5% SIC (SIDSIC)	Com enzima (125g /ton)
T9	80% RR + 20% Farinha de penas (FP)	Sem enzima
T10	80% RR + 20% FP	Com enzima (125g /ton)

TABELA 13 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA ANALISADA DOS INGREDIENTES PROTÉICOS

	FS	SID	SIC	FP
Umidade	11,55	8,42	13,10	10,49
Proteína Bruta	45,04	39,24	29,46	80,98
Extrato Etéreo	0,64	21,89	24,80	5,70
Proteína Solúvel em KOH	81,50	82,70	77,02	na*
Atividade ureática	0,01	0,03	0,01	na

FS: Farelo de soja; SID: Soja Integral Desativada, SIC: Soja Integral Crua, FP: Farinha de Penas. * Na = não analisado.

3.1.7 Variáveis analisadas

As dietas foram analisadas quanto ao teor de matéria seca (MS), matéria mineral (MM) e proteína bruta (PB), conforme AOAC (1995), e energia bruta (EB), realizada em bomba calorimétrica (Model 1261, Parr Instrument Co. Moline, IL). A cinza insolúvel em ácido (CIA) foi usada como indicador interno indigestível para os cálculos de digestibilidade, e determinada de acordo com técnica descrita por Scott & Boldaji (1997).

Do 17° ao 20° dia de criação, foi realizada a coleta de excretas na bandeja. Antes da primeira coleta, foi realizada uma higienização geral das lonas das bandejas. Nos dias 17, 18, 19 e 20 de idade das aves, foi realizada a coleta duas vezes por dia, as 08:30 e as 16:30 h. Eram priorizadas as excretas bem formadas, sem contaminações com ração ou penas. As excretas foram acondicionadas em sacos plásticos identificados e congelados em seguida. Posteriormente, foram descongeladas em temperatura ambiente, secas em estufa de ventilação forçada a 55°C por 72 horas, revolvidas duas vezes ao dia e moídas para realização das análises de MS, CIA e EB.

No 21° dia de criação, as 6 aves de cada unidade experimental foram abatidas por deslocamento cervical, o TGI foi exposto e houve a delimitação do segmento íleo, partindo 2 cm abaixo do divertículo de Meckel (seta escura) até 2 cm acima da junção íleocecóclica (seta clara) (conforme Figura 5), seguindo protocolo descrito por Lemme *et al.* (2004). O conteúdo ileal coletado foi homogeneizado, congelado em nitrogênio líquido imediatamente e acondicionado em freezer a -18°C. Posteriormente, este conteúdo foi seco em estufa de ventilação forçada a 55°C por 72 horas, e moído com auxílio de graal e pistilo para realização das análises de MS, PB, e CIA.



FIGURA 5 – ÁREA DELIMITADA PARA COLETA DO CONTEÚDO ILEAL DAS AVES.

Os cálculos da digestibilidade ileal dos nutrientes foram realizados de acordo com as seguintes fórmulas:

FATOR DE INDIGESTIBILIDADE NO ÍLEO (FII) =

$$\frac{CIA \text{ na dieta}}{CIA \text{ no Íleo}}$$

COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDADE APARENTE ILEAL DA MATÉRIA SECA

(CDAIMS)=

$$(1 - FII) * 100$$

COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDADE APARENTE ILEAL DA PROTEÍNA BRUTA

(CDAIPB)=

$$100 - (FII * \left(\frac{PB \text{ Íleo}}{PB \text{ ração}} \right) * 100)$$

Os valores de energia metabolizável aparente nas excretas (EMA) foram determinados por meio das fórmulas:

FATOR DE INDIGESTIBILIDADE NAS EXCRETAS (FIE) =

$$\frac{CIA \text{ na dieta}}{CIA \text{ na excreta}}$$

ENERGIA METABOLIZÁVEL APARENTE (EMA) =

$$EB \text{ da dieta} - (EB \text{ das excretas} * FIE)$$

Os resultados obtidos de digestibilidade ileal e metabolizabilidade da energia foram convertidos através das fórmulas descritas por Matterson *et al.* (1965) para a obtenção da digestibilidade dos ingredientes testados:

COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDADE DO INGREDIENTE (CDI) =

$$CDRR + \left(\frac{(CDRT - CDRR)}{\frac{\% \text{ substituição}}{100}} \right)$$

CDRR – COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDADE DA RAÇÃO REFERÊNCIA

CDRT – COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDADE DA RAÇÃO TESTE

3.1.8 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos ao teste T de Student comparando-se dentro do mesmo ingrediente os resultados sem e com a inclusão do aditivo enzimático. O software estatístico utilizado foi o GraphPad Prism® versão 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA).

3.2 Experimento 2. Técnica para quantificação de proteínas e determinação da atividade enzimática.

3.2.1 Solução padrão de BSA – Soroalbumina bovina

Para a solução de BSA que é utilizada para a curva padrão das análises de Bradford, pesou-se 10 mg de soroalbumina bovina em balança analítica de precisão (AA-200 – Denver Instrument Company) e diluiu-se em quantidade suficiente para 10 ml de água destilada, resultando numa solução de concentração de 1mg/ml.

Para verificar a concentração final da solução, a mesma foi lida em espectrofotômetro a 280 nm, obtendo-se valor de $A_{280nm}=0,67$, o que representa uma concentração de 1mg/ml. Ao final aliquotou-se em microtubos de 1,5 ml e armazenou-se em freezer a -20°C , descongelando somente no momento da análise.

3.2.2 Reagente de Bradford

A confecção do reagente de Bradford foi realizada conforme protocolo descrito por Bradford (1976), resultando nas seguintes concentrações finais dos reagentes:

TABELA 14 – REAGENTES PARA CONFECÇÃO DO REAGENTE DE BRADFORD.
FONTE: BRADFORD (1976).

Coomassie Brilliant Blue – G-250	0,01%
Etanol 95%	4,7%
Ácido fosfórico 85%	8,5%

O corante Coomassie Brilliant Blue – G-250 foi pesado em balança de precisão e diluído no volume apropriado de etanol 95% em agitador magnético por 15 minutos. Após isso adicionou-se o ácido fosfórico 85% e manteve-se em agitação. O volume final da solução foi completado com água destilada. A solução foi mantida protegida da luz por papel alumínio no momento da agitação e depois de filtrada em papel filtro foi armazenada em frasco âmbar na geladeira de 2°C a 4°C, retirando-se apenas no momento da análise.

3.2.3 Composição das amostras

Para a realização destes ensaios, foram utilizadas uma ração basal para frangos de corte na fase de crescimento (ROSTAGNO *et al.* 2011), e três aditivos alimentares com potencial enzimático derivados de fermentação de leveduras do gênero *Saccharomyces cerevisiae*, denominados aqui produtos A , B e C.

Uma amostra da ração foi coletada e enviada ao Laboratório de Nutrição Animal da Universidade Federal do Paraná – Campus Agrárias (LNA – UFPR) para a determinação da composição bromatológica, a qual segue na Tabela 15:

TABELA 15 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA ANALISADA DA RAÇÃO UTILIZADA NO ENSAIO DE QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS.

Umidade (%)	10,68
Proteína Bruta (%)	23,50
Extrato Etéreo (%)	4,30
Resíduo Mineral (%)	5,22
Fibra Bruta (%)	2,53
Cálcio (%)	0,80
Fósforo (%)	0,64

Os produtos derivados de levedura também foram submetidos à análise bromatológica de nitrogênio pelo método de Kjeldahl (1883) no LNA-UFPR, e os valores obtidos foram multiplicados por 6,25 para determinação da proteína bruta das amostras, conforme tabela abaixo:

TABELA 16 – COMPOSIÇÃO DE PROTEÍNA BRUTA (%) DOS PRODUTOS DERIVADOS DE FERMENTAÇÃO DA LEVEDURA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*.

Produto	% Proteína Bruta
A	17,38
B	20,27
C	16,64

3.2.4 Ensaio 1– Produtos na forma Natural e Moída

No primeiro momento, analisou-se a quantidade de proteína presente nos produtos na forma natural (como se apresenta para uso na indústria) e também na forma moída, sendo a moagem realizada no Laboratório de Nutrição Animal em moinho rotativo (Pulverisette 14 – Fritsch) na velocidade de 14.000 RPM e peneira com diâmetro de 0,5 mm.

Em tubos de 15 ml devidamente identificados, foram pesados 300 mg de cada amostra (natural e moída) e diluídas em 10 ml de água destilada, resultando numa solução de concentração de 30 mg/ml. As amostras foram misturadas à água

destilada através de agitador vórtex (Daigger Vórtex Gennie 2) em velocidade 2 por aproximadamente 30 segundos.

Foram mantidas em incubação 40 minutos em estufa a 37°C. As amostras foram retiradas da estufa, o conteúdo do tubo foi parcialmente transferido para microtubos de 1,5 ml e centrifugado (14000 D – Revan) a 2100 RPM por 5 minutos.

Em uma microplaca de 96 poços, pipetou-se a curva padrão de BSA em duplicata na quantidade de 0,1,2,3,4,5 µl (representando 0,1,2,3,4,5 µg de proteína). Pipetou-se em triplicata 1µl de cada amostra e após isso aplicou-se 200 µl do reagente de Bradford sobre a curva padrão de BSA e sobre as amostras. Aguardou-se aproximadamente 3 minutos e a absorbância foi lida em espectrofotômetro de placas (EL800 – Biotek) a 595 nanômetros, conforme técnica descrita por Bradford (1976).

O procedimento experimental foi repetido 4 vezes e cada análise foi realizada em triplicata, utilizando-se os 2 dados mais semelhantes para compor a média. Os dados de absorbância *versus* concentração de proteína obtidos foram plotados em gráficos, e a partir da aplicação da equação da reta com o coeficiente de correlação de Pearson - R^2 , determinou-se a concentração de proteínas presentes nas amostras (mg/ml). Os dados foram submetidos ao teste t de Student comparando a ação da granulometria natural e moída sobre a solubilização de proteínas em cada produto utilizando o software estatístico GraphPad Prism® versão 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

3.2.5 Ensaio 2 – Produtos em diferentes pHs

Foi realizado um ensaio para determinar a quantidade de proteína solúvel nos produtos enzimáticos derivados de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* em dois pHs distintos. Pesou-se 1 g de cada produto em tubos de 50 ml e completou-se com quantidade de tampão suficiente para 7,5 ml na granulometria fornecida pelo fabricante.

No intuito de observar a solubilização proteica das amostras e mimetizando o pH das diferentes porções do TGI das aves, com base nos dados de Moran (1982); Gauthier (2002), Angel *et al.* (2013), preparou-se duas soluções tampão ótimas de pHs distintos, sendo eles tampão Citrato pH 3,0 e tampão Tris pH 7,4, conforme Tabela 7. Os compostos de ambos os tampões foram pesados em balança analítica

de precisão e homogêneos com água destilada. O pH das soluções foi conferido em pHmetro (420A – Orion) e o volume de solução foi completado com água destilada.

As amostras foram misturadas por meio de agitador vórtex (Daigger Vórtex Gennie 2) em velocidade 2 por aproximadamente 30 segundos. Após isso foram mantidas em incubação por 40 a 45 minutos em estufa a 37°C. As amostras foram retiradas da estufa, o conteúdo do tubo foi parcialmente transferido para microtubos de 1,5ml e centrifugado (14000 D – Revan) a 2100 RPM por 5 minutos.

Em uma microplaca de 96 poços, pipetou-se a curva padrão de BSA em duplicata na quantidade de 0,1,2,3,4,5 µl (representando 0,1,2,3,4,5 µg de proteína). Pipetou-se em triplicata 1µl de cada amostra e após isso aplicou-se 200 µl do reagente de Bradford sobre a curva padrão de BSA e sobre as amostras. Aguardou-se aproximadamente 3 minutos e a absorbância foi lida em espectrofotômetro de placas (EL800 – Biotek) a 595 nanômetros, conforme técnica descrita por Bradford (1976).

TABELA 17 – SOLUÇÕES TAMPÃO CITRATO PH 3,0 E TAMPÃO TRIS PH 7,4.

Tampão Citrato pH 3,0	
Composição:	Concentração:
Ácido cítrico (C ₆ H ₈ O ₇)	0,1 M
Citrato trisódico (Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇)	0,1 M
Cloreto de Cálcio (CaCl ₂)	0,5 mM
Cloreto de Magnésio (MgCl ₂)	0,5 mM
Tampão Tris pH 7,4	
Composição:	Concentração:
Trisma base (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	50 mM
Cloreto de sódio (NaCl)	200 mM
Cloreto de Cálcio (CaCl ₂)	0,5 mM
Cloreto de Magnésio (MgCl ₂)	0,5 mM

O procedimento experimental foi repetido dez vezes e cada análise foi realizada em triplicata, utilizando-se os 2 dados mais semelhantes para compor a média. Os dados de absorbância *versus* concentração de proteína obtidos foram plotados em gráficos, e a partir da aplicação da equação da reta com o coeficiente de correlação de Pearson - R², determinou-se a concentração de proteínas

presentes nas amostras (mg/ml). , Os dados foram submetidos ao teste t de Student comparando a ação do pH 3,0 e 7,4 sobre a solubilização de proteínas em cada produto utilizando o software estatístico GraphPad Prism® versão 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

3.2.6 Ensaio 3 – Produtos em diferentes pHs + Ração

Foi realizado um ensaio para determinar a quantidade de proteína solúvel na ração quando adicionado a ela os produtos potencialmente enzimáticos derivados de levedura *Saccharomyces cerevisiae* em dois pHs distintos, conforme relatado anteriormente. A inclusão dos produtos foi realizada com base na inclusão usual dos fabricantes, conforme segue tabela abaixo:

TABELA 18 – NÍVEIS DE INCLUSÃO DOS PRODUTOS CONFORME RECOMENDAÇÃO DOS FABRICANTES.

Produto:	Inclusão:
A	1,2 kg/ton
B	0,75 kg/ton
C	0,25 kg/ton

Para tanto, em tubos de 50 ml foram pesados 6 g de ração e adicionados a cada um deles um dos produtos enzimáticos derivados de levedura na forma natural, respeitando o nível de inclusão referente a 1 tonelada de batida de ração. Assim para o produto A foi pesado 72mg para 6 g de ração, para o produto B: 45 mg para 6 g de ração e para o produto C: 15 mg para 6 g de ração. Assim os tratamentos experimentais foram os seguintes:

TABELA 19 – TRATAMENTOS EXPERIMENTAIS DO ENSAIO 3 DE QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS.

Tratamento:	Descrição:	pH utilizado:
T1	Produto A + Ração	pH 3,0
T2	Produto B + Ração	
T3	Produto C + Ração	
T4	Ração	
T5	Produto A + Ração	pH 7,4
T6	Produto B + Ração	
T7	Produto C + Ração	
T8	Ração	

Diluiu-se as amostras nos tampões específicos em quantidade suficiente para 15 ml em tubos 50 ml. As amostras foram misturadas aos tampões por meio de agitador vórtex (Daigger Vórtex Gennie 2) em velocidade 2 por aproximadamente 30 segundos. Após isso foram mantidas em incubação por 40 a 45 minutos em estufa a 37°C. As amostras foram retiradas da estufa, o conteúdo do tubo foi parcialmente transferido para microtubos de 1,5ml e centrifugados (14000 D – Revan) a 2100 RPM por 5 minutos.

Em uma microplaca de 96 poços, pipetou-se a curva padrão de BSA em duplicata na quantidade de 0,1,2,3,4,5 µl (representando 0,1,2,3,4,5 µg de proteína). Pipetou-se em triplicata 1µl de cada amostra e após isso aplicou-se 200 µl do reagente de Bradford sobre a curva padrão de BSA e sobre as amostras. Aguardou-se aproximadamente 3 minutos e a absorbância foi lida em espectrofotômetro de placas (EL800 – Biotek) a 595 nanômetros, conforme técnica descrita por BRADFORD (1976).

O procedimento experimental foi repetido oito vezes e cada análise foi realizada em triplicata, utilizando-se os 2 dados mais semelhantes para compor a média. Os dados de absorbância *versus* concentração de proteína obtidos foram plotados em gráficos, e a partir da aplicação da equação da reta com o coeficiente de correlação de Pearson - R², determinou-se a concentração de proteínas presentes nas amostras (mg/ml). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Dunnet a 5% de

probabilidade com os tratamentos controle (T4 e T8) como referência utilizando o software estatístico GraphPad Prism® versão 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

3.3 Determinação da atividade enzimática dos produtos utilizados nos experimentos 1 e 2.

Para a determinação da quantificação enzimática das proteases utilizadas, utilizou-se um kit fluorimétrico da empresa SIGMA® denominado *Protease Fluorescent Detection Kit* (Product Code: PF0100).

O kit relaciona a capacidade da tripsina (enzima de concentração conhecida) para catalisar a quebra da Caseína-FITC (proteína ligada a uma molécula fluorescente) com a capacidade da amostra a ser testada de realizar a mesma quebra da Caseína-FITC, conforme Figura 6.

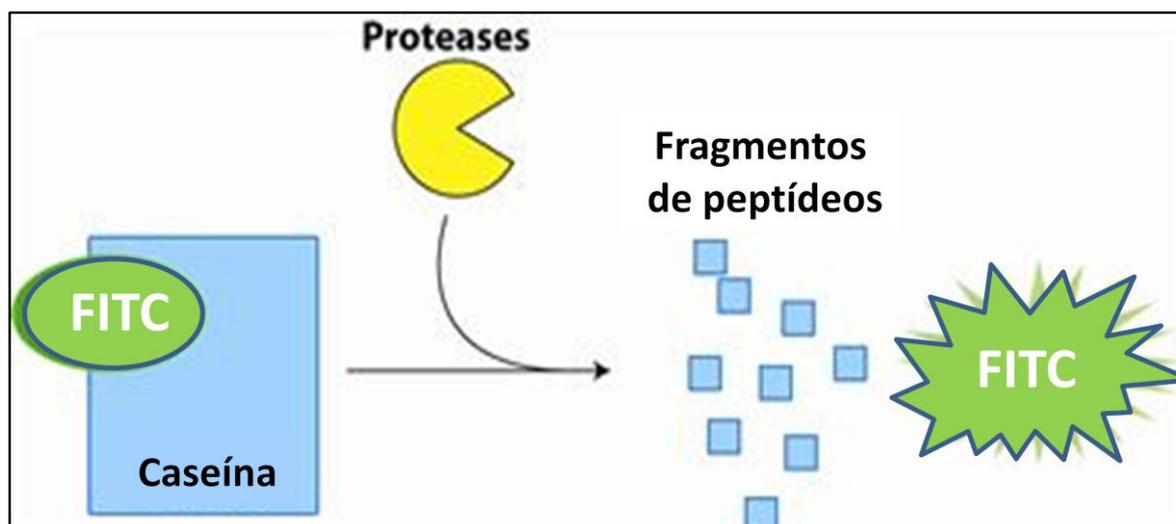


FIGURA 6 – MODO DE AÇÃO DO KIT FLUORESCENTE PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA. FONTE: TRADUZIDO DE SIGMA®.

Para a determinação da quantificação enzimática, o kit sugere que seja preparada uma curva padrão com a tripsina. A tripsina do Kit contém 10.000 Unidades de BAEE / mg. O BAEE (N-Benzoyl-L-Arginine Ethyl Ester Hydrochloride) é o substrato comum para determinação da atividade enzimática da tripsina, como descrito no kit fornecido pela SIGMA®. A curva padrão de tripsina foi composta por 8 pontos, sendo eles 0,15; 0,50; 1,15; 1,75; 2,50; 3,50; 4,50 e 6 µg/ml de tripsina.

Para as amostras de derivados de fermentação de levedura A, B e C e o blend de proteases TM pesou-se 0,1g e dissolveu-se em 250 ml de água destilada. Após aguardar alguns minutos para dissolver as amostras no volume descrito, centrifugou-se (10.000g por 10 minutos) e com o sobrenadante procedeu-se a incubação, conforme orientações do kit. Utilizando-se microtubos de 1,5 ml, pipetou-se em cada tubo: 20 µl de tampão de incubação (20mM fosfato de sódio + 150 mM de cloreto de sódio, pH 7,6), + 20µl de Caseína-FITC + 10µl de cada amostra (TM, A, B e C), água destilada para o tubo branco e as concentrações de tripsina para a curva padrão).

Os tubos relativos à curva padrão permaneceram 30 minutos no escuro em estufa a 37°C, em seguida adicionou-se 150µl de Ácido tricloroacético 0,6N em cada tubo e permaneceram por mais 30 minutos na estufa. Os tubos das amostras permaneceram 120 minutos, e mais 30 minutos após a adição do mesmo volume de Ácido tricloroacético. Após o tempo de incubação estipulado, centrifugou-se a 10.000g por 10 minutos e o sobrenadante foi coletado para leitura em espectrofluorímetro.

Em uma placa de 96 poços escura, pipetou-se 2µl de cada amostra com 200µl de tampão de ensaio (500 mM Tris, pH 8,5) em duplicata, obtendo-se a média. A intensidade da fluorescência foi mensurada com excitação de 485 nm e as ondas de emissão foram monitoradas a 535 nm. O procedimento experimental foi repetido 3 vezes e os valores de fluorescência passaram por correções para ajustes de concentração.

4 RESULTADOS

4.1 Experimento 1. Coeficiente de digestibilidade ileal de fontes proteicas

Houve aumento ($p < 0,05$) do CDAIMS (%) e da EMA (Kcal/kg) da Ração referência (RR) com protease. Porém não houve diferença ($p > 0,05$) para o CDAIPB (%) da RR. Houve aumento ($p < 0,05$) no CDAIMS (%) do Farelo de Soja com protease. Porém não houve diferença ($p > 0,05$) para o CDAIPB (%) e para a EMA (kcal/kg) do FS. Houve diferença ($p < 0,05$) no CDAIMS (%), CDAIPB (%) e para a EMA (kcal/kg) da Soja Integral Desativada (SID). Não houve diferença ($p > 0,05$) para o CDAIMS (%), CDAIPB (%) e para a EMA (kcal/kg) da mistura de 15% de SID + 5% de Soja Integral Crua (SIC) independente da inclusão da enzima. Houve diferença ($p < 0,05$) no CDAIMS (%) e para o CDAIPB (%) da farinha de penas com e sem protease. Entretanto não houve diferença ($p > 0,05$) para a EMA (kcal/kg) da FP independente da inclusão da enzima (Tabela 20).

TABELA 20 – COEFICIENTES DE DIGESTIBILIDADE APARENTE ILEAL DA MATÉRIA SECA (CDAIMS), PROTEÍNA BRUTA (CDAIPB) E ENERGIA METABOLIZÁVEL APARENTE (EMA) DA RAÇÃO REFERÊNCIA E DE INGREDIENTES PROTEICOS, COM OU SEM PROTEASES, EM FRANGOS DE CORTE.

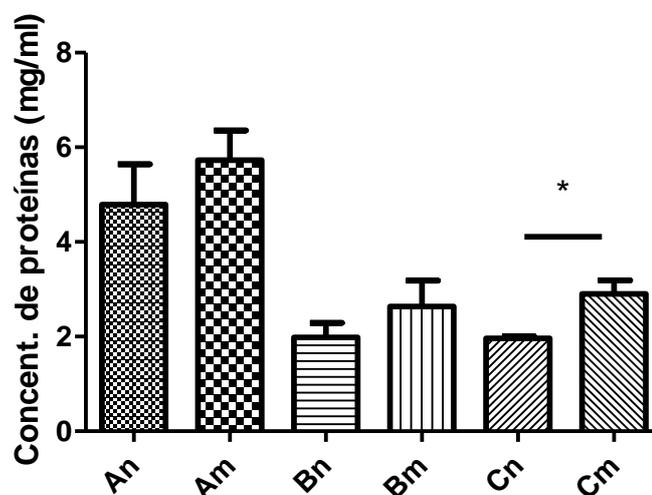
Tratamento	CDAIMS (%)	CDAIPB (%)	EMA (kcal/kg de MS)
Ração Referência			
Sem protease	77,34	80,76	3437
Com protease	79,58	83,45	3674
Probabilidade	0,0056	0,0753	0,0003
CV (%)	1,36	2,73	2,60
Farelo de Soja			
Sem protease	76,09	80,96	3425
Com protease	76,36	81,04	3438
Probabilidade	<0,0001	0,0694	0,2006
CV (%)	0,06	0,05	0,50
Soja integral Desativada			
Sem protease	76,35	80,98	3451
Com protease	76,65	81,26	3469
Probabilidade	0,0003	0,0008	0,0111
CV (%)	0,14	0,13	0,32
Soja Integral Desativada e Soja Integral Crua			
Sem protease	76,17	80,85	3447
Com protease	76,27	80,91	3446
Probabilidade	0,0689	0,1519	0,5642
CV (%)	0,12	0,08	0,14
Farinha de Penas			
Sem protease	75,80	79,84	3427
Com protease	76,25	80,35	3435
Probabilidade	0,0011	0,0020	0,0716
CV (%)	0,27	0,33	0,21

CV= Coeficiente de variação. $p < 0,05$ pelo teste t de Student entre Tratamentos Sem protease e Com protease para cada ingrediente.

4.2 Experimento 2. Técnica para quantificação de proteínas e determinação da atividade enzimática.

4.2.1 Ensaio 1– Produtos na forma natural e moída

A partir da Figura 7, nota-se que a menor granulometria das partículas dos derivados de levedura não melhorou a solubilização das proteínas, com exceção do produto C ($p < 0,05$).

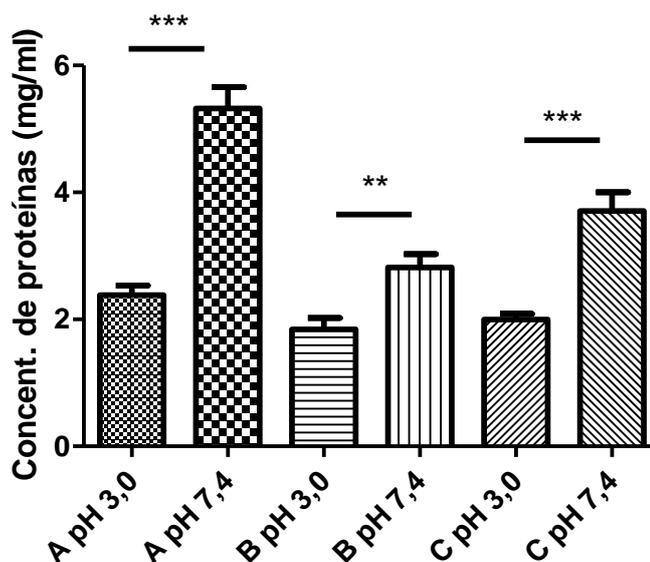


* $p < 0,05$ pelo teste t de Student

FIGURA 7 - CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS (MG/ML) EM DERIVADOS DE FERMENTAÇÃO DA LEVEDURA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* NA FORMA NATURAL (N) OU MOÍDA (M).

4.2.2 Ensaio 2 – Produtos em diferentes pHs

Observa-se na Figura 8, que o pH utilizado para solubilizar os derivados de levedura foi efetivo para o aumento da quantificação de proteínas ($p < 0,05$). Nota-se que em todos os produtos utilizados, o pH 7,4, mais próximo ao pH fisiológico, foi mais eficiente na solubilização proteica, melhorando em 2,23 vezes a solubilização do produto A, 1,53 vezes para B e 1,85 vezes para o C.

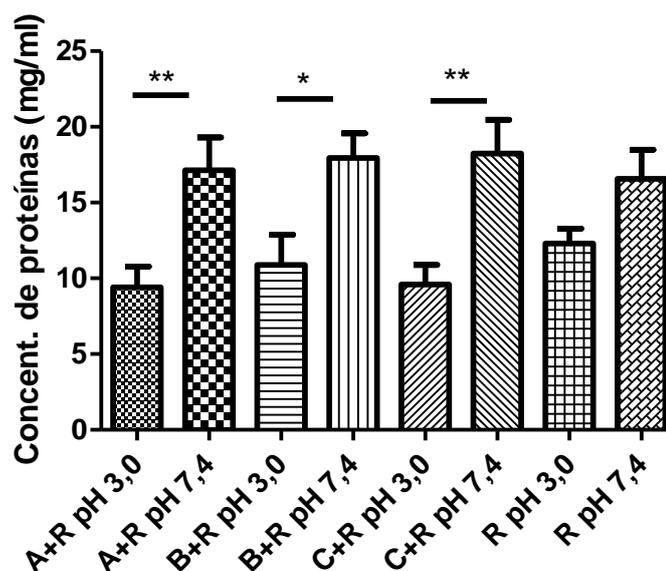


** $p < 0,01$ pelo teste t de Student; *** $p < 0,0001$ pelo teste t de Student

FIGURA 8 - CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS (MG/ML) EM DERIVADOS DE FERMENTAÇÃO DA LEVEDURA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* EM PH 3,0 E PH 7,4.

4.2.3 Ensaio 3 – Produtos em diferentes pHs + Ração

Ao comparar a ação dos produtos nos diferentes pHs combinados com a ração (Figura 9), nota-se que em todos os casos, com exceção do grupo controle, (composto somente por ração), o pH 7,4 foi mais eficiente, melhorando em 1,82; 1,64 e 1,90 vezes a solubilização de proteínas das rações com os produtos (A, B e C), respectivamente. Nota-se também que o grupo controle não diferiu entre os pHs utilizados ($p > 0,05$), sugerindo que a adição dos produtos contribuiu de alguma maneira para aumentar a quantidade de proteínas detectadas por essa técnica.



* $p < 0,05$ pelo teste t de Student; ** $p < 0,01$ pelo teste t de Student

FIGURA 9 - CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS (MG/ML) EM RAÇÃO (R) PARA FRANGOS DE CORTE ADICIONADAS COM DERIVADOS DE FERMENTAÇÃO DA LEVEDURA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* EM PH 3,0 E PH 7,4.

4.3 Determinação da atividade enzimática dos produtos utilizados no Experimento 1 e 2.

Na Tabela 21, seguem os resultados obtidos de atividade enzimática para as amostras (A, B, C, TM) a partir do **Kit SIGMA® Fluorescente (Product Code: PF0100)**.

A amostra TM foi a amostra mais concentrada, ou seja, a que obteve o maior valor de atividade enzimática (média de 5.000 U/g), seguida pelas amostras C e B, com valores próximos entre si (aprox. 1.900 U/g) e a amostra A obteve um valor aproximado de 1.385 U/g.

Pode-se afirmar, a partir dos resultados das amostras, que a amostra TM possui proteases. Ainda, embora não se tenha informações sobre a atividade dos derivados de levedura como enzimas, pode-se afirmar por essa técnica que os mesmos podem atuar como enzimas em ensaios *in vitro*, uma vez que são oriundos de fermentação, conclui-se que as enzimas também podem ser um dos compostos produzidos.

TABELA 21 – ATIVIDADE ENZIMÁTICA (U/G) DOS DERIVADOS DE FERMENTAÇÃO DE LEVEDURA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* E DO COMPLEXO DE PROTEASES.

Atividade enzimática em (U BAEE/g) ou (U/g)				
Amostras				
	Leitura 1	Leitura 2	Leitura 3	Média
<i>A</i>	1242,76	1222,80	1687,46	1384,34
<i>B</i>	1844,04	1967,31	1767,87	1859,74
<i>C</i>	1902,99	2194,94	1609,15	1902,36
<i>TM</i>	4672,29	4467,10	5867,36	5002,25

1 U corresponde à quantidade de enzima que catalisa a reação com velocidade de formação de 1 micromol de produto por minuto.

5 DISCUSSÃO

5.1 Experimento 1. Coeficiente de digestibilidade ileal de fontes proteicas

Grande parte das rações no Brasil são formuladas primariamente com ingredientes como milho e farelo de soja. Dessa maneira, a inclusão destes na dieta é geralmente alta. Zanella *et al.* (1999) conduziram um experimento com diversos tratamentos contendo farelo de soja, soja extrusada e soja tostada e avaliaram a digestibilidade ileal desses ingredientes com a inclusão ou não de um complexo enzimático contendo xilanase, amilase e protease em frangos. Os autores encontraram melhorias de até 3% na digestibilidade ileal da PB com a adição do complexo enzimático. O presente trabalho encontrou diferenças mais sutis na inclusão da protease sobre esse parâmetro, com média de 0,3% de melhoria da digestibilidade ileal da PB. Os dados discordam dos encontrados por Rostagno *et al.* (2000) e Rodrigues (2000); que encontraram melhoria de 3% e 1,9%, respectivamente, na digestibilidade da PB com inclusão de complexo enzimático contendo protease.

Angel *et al.* (2011) encontraram efeitos positivos da inclusão de proteases isoladas na dose de 200 g/ton na digestibilidade ileal da PB e de diversos aminoácidos em dietas com base em milho e farelo de soja. No presente trabalho, reportamos resultados importantes nos coeficientes de digestibilidade da MS e PB usando doses menores, de 125 g/ton. Os dados do presente trabalho discordam dos encontrados por Opalinsky *et al.* (2011), que obtiveram melhores resultados de EMA para o FS utilizando um complexo enzimático contendo protease, amilase e celulase.

Ghazi *et al.* (2002) encontraram melhoria no valor nutricional de dietas para frangos de corte utilizando proteases, mostrando que a enzima é eficiente na melhoria da digestibilidade do FS. Os resultados encontrados concordam em parte com o dos autores, uma vez que houve melhoria no CDAIMS com o uso da protease, porém não houve resultado para a CDAIPB e EMA.

De Coca-Sinova *et al.* (2008), conduziram um experimento onde foi analisado o CDAIMS, energia, nitrogênio e aminoácidos de 6 farelos de soja, sendo 4 destes de origem no Brasil, para frangos de corte aos 21 dias de idade. Com relação à digestibilidade da MS, os autores encontraram valores que variaram de 75,2 a

82,3%, com média de 78%, dados estes que concordam em parte com os encontrados no presente trabalho, no qual a CDAIMS do FS teve média de 76%, mesmo com a inclusão da protease. Os autores concluem que a composição dos grãos de diferentes origens, mesmo dentro do Brasil, é extremamente variável, e que o uso de valores médios de digestibilidade sem considerar a origem do ingrediente pode levar a super ou subestimações na formulação de rações.

Leite *et al.* (2012) reportam que o processamento térmico da soja é um fator preponderante para a melhoria da digestibilidade dos nutrientes. Cowieson *et al.* (2006) citam que as proteases são enzimas capazes de aumentar o valor nutritivo não somente do farelo de soja, mas também de outras fontes proteicas, pela quebra e redução de fatores antinutricionais presentes nos alimentos ou por hidrolisar proteínas que foram danificadas em processos térmicos mal conduzidos. Os dados do presente trabalho concordam com os obtidos pelos autores anteriormente citado, assim observa-se melhoria da digestibilidade dos parâmetros testados na soja integral desativada com a presença de protease.

Freitas *et al.* (2005) conduziram um ensaio para determinação da energia metabolizável e digestibilidade da matéria seca de diferentes grãos de soja integral, incluindo a soja desativada, pela técnica de coleta total de excretas. O experimento consistiu na substituição de 40% da ração referência pelos ingredientes teste, também utilizando o método de MATTERSON *et al.* (1965), como no presente trabalho. Os autores encontraram valores de digestibilidade da matéria seca da soja integral desativada de 52,68% para pintinhos, dados estes bem inferiores ao encontrados no presente trabalho, com média de 76%. Com relação à EMA, o valor obtido foi de 3581 kcal/kg, 3% acima do valor obtido no presente trabalho. Parte das diferenças pode ser explicada pelas diversas metodologias e condições experimentais, onde Freitas *et al.* (2005) utilizaram coleta total de excretas, a idade dos pintinhos variava de 12 a 21 dias, com substituição de 40% da dieta referência pelo ingrediente teste, sendo que nesse trabalho utilizou-se coleta parcial de excretas, aves aos 21 dias de idade, e substituição de 20%. Ainda, para auxiliar no entendimento dos dados, o processamento de desativação das sojas nos dois experimentos pode ter sofrido variações que explicam as diferenças de energia encontradas.

Como citado anteriormente, Rocha *et al.* (2014) afirmam que o grão de soja cru possui diversos fatores antinutricionais, como inibidores de tripsina, lectinas e

fatores alergênicos que prejudicam o desempenho do animal, além de impedir a ação das enzimas endógenas como a tripsina na hidrólise desse ingrediente. Esse aspecto é relevante, pois no presente trabalho a mistura de 5% de soja integral crua somado a 15% de soja integral desativada, mesmo com a inclusão de protease exógena não foi eficaz para provocar um aumento do CDAIMS e CDAIPB. Os dados do presente trabalho discordam dos encontrados por Huo *et al.* (1993), onde obtiveram, a partir da inclusão exógena de protease, uma maior desnaturação dos fatores antinutricionais da soja *in vitro*, com melhoria na digestibilidade.

Zanella *et al.* (1999) concordam com as informações citadas acima e incluem que a presença dos fatores antinutricionais da soja crua no lúmen do intestino provoca aumento da produção de mucina e maior perda endógena de aminoácidos. Nesse aspecto, a inclusão de proteases endógenas tendem a aumentar a digestibilidade da proteína pela diminuição da perda endógena, o que leva a um efeito secundário positivo sobre a energia metabolizável. Entretanto, essa informação não foi possível de ser visualizada no presente trabalho, no qual, mesmo com a inclusão de proteases, não houve melhoria sobre os parâmetros de CDAIMS, CDAIPB ou EMA.

Para Eynng *et al.* (2012), o conhecimento sobre o conteúdo energético das farinhas de origem animal (FOA), especialmente a FP é indispensável, uma vez que o uso desses coprodutos tem sido cada vez mais relevante na nutrição animal. A partir dessas informações pode-se maximizar o desempenho e melhorar o retorno econômico da atividade. Freitas *et al.* (2011) citam que a digestibilidade da proteína é maior em dietas com base em milho e farelo de soja, e que com o aumento da inclusão de FOA, esse parâmetro tende a ser menor, o que pode ser explicado pelo excessivo tratamento térmico que esses ingredientes passam ou pela sua composição nutricional específica.

Com relação à FP, Balloun & Khajareern (1974), realizaram um experimento com a inclusão em 5% ou 10% desse ingrediente em uma dieta basal de milho e farelo de soja com a inclusão de 3 níveis de levedura seca (0, 2 e 4%) e observaram parâmetros de digestibilidade para perus aos 18 dias de idade. Os autores encontraram menores valores de digestibilidade com a inclusão de 10% de farinha de penas e que a inclusão de levedura seca não melhorou a digestibilidade da proteína.

Nascimento *et al.* (2002) realizaram um experimento de digestibilidade com coleta total de excretas com 6 farinhas de penas de origens diferentes na proporção de 30% desses ingredientes e 70% de uma RR para determinar a energia metabolizável aparente corrigida para nitrogênio (EMAn). Os autores encontraram valores que variaram de 3077 a 3580 kcal/kg, sendo a média das 6 farinhas de 3345 kcal/kg, valores próximos e dentro dos encontrados no presente trabalho.

Em um ensaio conduzido por Scapim *et al.* (2003), onde avaliaram 4 processamentos diferentes para farinha de penas e sangue sobre o parâmetro de EMA, encontraram valores de 1572 a 2277 kcal/kg, valores estes que discordam dos encontrados no presente trabalho.

Mahagna *et al.* (1995) citam que a melhoria da digestibilidade da MS e da EMA com o uso de proteases pode ser explicado pelo efeito de *feedback* negativo que a enzima exógena exerce sobre as enzimas endógenas, desviando rotas metabólicas e reduzindo a produção de enzimas endógenas.

Lemme *et al.* (2004) concordam com o exposto acima e afirmam que a utilização de proteases exógenas pode elevar a disponibilidade de aminoácidos e direcioná-los para a manutenção e crescimento dos animais, principalmente pelo fato de que algumas enzimas adicionadas às rações não possuem especificidade quanto à ação como exo ou endopeptidases, assim possuindo potencial de ação sobre todas as proteínas. A maior disponibilidade de aminoácidos no lúmen do intestino contribui também para melhorar a EMA das rações, informação essa que também pode ser visualizada no presente trabalho.

Zanella *et al.* (1999) citam que é comum encontrar grandes diferenças entre trabalhos, uma vez que as condições experimentais variam muito e são dependentes da validade, acurácia e habilidade da técnica na detecção de diferenças entre a digestibilidade de ingredientes com composições proteicas diversas. Ainda, outros fatores devem ser considerados, como fatores inerentes à dieta, diferenças no processamento de grãos, condições ambientais de cada experimento, diferentes linhagens de frangos de corte utilizadas, entre outros (de Coca-Sinova *et al.* 2008; Angel *et al.* 2011; Aguilera *et al.* 2014). Aguilera *et al.* (2014) citam que para melhorar a formulação de rações tornando-as mais precisas de acordo com o requerimento dos animais em cada fase, é necessário saber o valor da digestibilidade ileal dos ingredientes utilizados.

Para Angel *et al.* (2011), alimentos proteicos são os que mais oneram o custo da formulação de rações, e grande quantidade da proteína presente na dieta passa ao longo do trato gastrintestinal sem sofrer ação de enzimas endógenas, o que pode ser explicado pela pouca quantidade de enzimas sintetizadas endogenamente. Esse aspecto representa uma oportunidade para o uso de proteases exógenas nas dietas com o objetivo de melhorar a digestibilidade da proteína.

Angel *et al.* (2011) e Freitas *et al.* (2011) citam que muitos artigos foram publicados nos últimos anos com complexos enzimáticos, também chamados de blends, que contem proteases em sua composição. Entretanto para os autores, ainda é escasso o número de trabalhos com proteases isoladas, o que dificulta a comparação dos resultados e deixa uma margem grande de dúvida sobre o modo de ação desses compostos. O presente trabalho encontrou melhorias significativas nos parâmetros de digestibilidade ileal da MS e PB e também EMA de diversos ingredientes proteicos com o uso de proteases. O mesmo foi encontrado por Ghazi *et al.* (2003), que obteve melhoria na utilização da energia e proteína com a inclusão de proteases isoladas às rações.

5.2 Experimento 2. Técnica para quantificação de proteínas e determinação da atividade enzimática.

Pode-se inferir que criar uma etapa de produção a mais, como a moagem desses ingredientes (A e B) na fábrica de rações antes da mistura às rações, além de ser um processo oneroso em termos de tempo e custo operacional, não contribui para uma melhor solubilização das proteínas. Stenzel *et al.* (2009) citam que pode-se supor que, quanto menor o tamanho das partículas, mais fácil deve ser para a atuação de enzimas, melhorando assim a extração dos compostos. Os dados do presente trabalho concordam em parte com essa afirmação, ao menos no que se refere ao produto C, porém o mesmo efeito não foi visto para os outros produtos testados. Stenzel *et al.* (2009) realizaram um experimento onde adicionaram enzimas comerciais em amostras de farelo de soja e observaram a solubilização de proteínas. Os autores notaram que houve uma tendência de aumento na solubilização das proteínas com a menor granulometria, dados que concordam com o presente trabalho. Citam ainda que, deve-se analisar a melhoria na solubilização de proteínas com critério antes de incluir mais uma etapa de moagem na obtenção

do farelo de soja a fim de justificar esse processo adicional. Angel *et al.* (2013) citam que o pH dos segmentos do TGI das aves possui efeito na digestibilidade e solubilidade dos nutrientes. Os dados do presente trabalho concordam com o dos autores acima, onde o pH mais alcalino obteve melhores resultados de solubilização de proteínas. Embora esse trabalho tenha sido realizado *in vitro*, se extrapolarmos o pH com melhor solubilidade para os segmentos do TGI, podemos observar que há uma correspondência com o pH do duodeno, jejuno e íleo nas aves, ou seja, com a porção do intestino delgado mais especificamente.

Dada a falta de informações sobre a composição específica e o modo de ação desses compostos (A, B e C), mas sabendo que ambos são oriundos de fermentação de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e que dessa maneira podem haver diferentes compostos produzidos, inclusive enzimas, pode-se inferir que há também um pH ótimo de atuação para os derivados de fermentação de levedura. Essa informação condiz com os dados de Pant *et al.* (2015), onde citam que as enzimas oriundas de fermentação de microrganismos possuem pH específico de atuação.

Souza & Bechtluft (2013), citam que a metodologia de Bradford é uma importante ferramenta nos laboratórios de pesquisa, análise e controle de alimentos para a determinação de proteínas por métodos espectrofotométricos. Para os autores, é uma maneira de se conhecer a quantidade de proteínas presentes nas amostras, com utilização de baixos volumes, com poucos agentes de interferência, sem a presença de compostos tóxicos. Pavel *et al.* (2013) reforçam essa afirmação e citam que infelizmente não há métodos que não contenham interferentes, entretanto que a mensuração do teor de proteínas das amostras é ideal para garantir a qualidade e autenticidade dos alimentos.

Por fim, a técnica de Bradford pode ser aplicada como técnica alternativa para a quantificação de proteínas em diferentes amostras, uma vez que a metodologia tradicional (proposta por KJELDAHL (1883)), possui menor seletividade para proteínas, pois mensura o teor de proteínas total com base na concentração de nitrogênio da amostra, sem distinguir o nitrogênio de origem proteica e não proteica. Pavet *et al.* (2013), citam que a técnica de Bradford ganhou muita popularidade na área de pesquisa e outras aplicações pois é simples, rápida e o complexo formado entre o corante e a proteína da amostra é relativamente estável, além de possuir a

vantagem sobre o método de Kjeldahl de mensurar efetivamente o teor de proteína da amostra.

6 CONCLUSÕES

A inclusão do blend de proteases TM aumentou o CDAIMS e EMA da RR; o CDAIMS do FS; o CDAIMS, CDAIPB e EMA da SID; e CDAIMS e CDAIPB da FP.

O pH 7,4 é melhor para solubilizar proteínas pelos derivados de levedura *Saccharomyces cerevisiae* do que o pH 3,0.

A mensuração da atividade enzimática por fluorescência detectou presença de proteases na amostra TM, e também em menor quantidade nos produtos de levedura A, B e C. Esse fato representa uma oportunidade de uso desses produtos como enzimas na nutrição de aves.

São necessários mais estudos para evidenciar os efeitos positivos obtidos no presente trabalho e aliar novas técnicas que permitam concluir e melhor caracterizar a composição química e o modo de ação zootécnico desses compostos.

7 REFERÊNCIAS

AFTAB, U. Exogenous carbohydrase in corn-soy diets for broilers. **World's Poultry Science Journal**, v. 68, p. 447-464, 2012.

AGHDAM SHAHRYAR, H.; AHMADZADEH, A.; LOFTI, A. Possibilities of inclusion of *Saccharomyces cerevisiae* as replacement for fish meal or poultry meat by-product in broiler chicken diet. **Journal of Biology Environmental Science**, v. 6, n. 18, p. 249-251, 2012.

AGUILERA, A.; REIS DE SOUZA, T. C.; MARISCAL-LANDÍN, G.; ESCOBAR, K.; MONTAÑO, S.; BERNAL, M. G. Standardized ileal digestibility of proteins and amino acids in sesame expeller and soya bean meal in weaning piglets. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, 2014. DOI: 10.1111/jpn.12278.

ALLOUI, M. N.; SZCZUREK, W.; ŚWIĄTKIEWICZ, S. The usefulness of prebiotics and probiotics in modern poultry nutrition: a review. **Annals of Animal Science**, v. 13, n. 1, p. 17-32, 2013.

AMERAH, A. M.; RAVINDRAN, V.; LENTLE, R. G. Influence of insoluble fiber and whole wheat inclusion on the performance, digestive tract development and ileal microbiota profile of broiler chickens. **British Poultry Science**, v. 50, p. 366– 375, 2009.

ANGEL, R.; HUMPHREY, B.; SAYLOR, W. **Poultry Science**, E-suppl. 1, v. 89, p. 650, 2010.

ANGEL, 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. **Poultry Science**, v. 90, p. 2281–2286, 2011. DOI: 10.3382/ps.2011-01482.

ANGEL, R.; KIM, S. W.; LI, W.; JIMENEZ-MORENO, E. **Velocidad de paso y pH intestinal en aves: implicaciones para la digestión y el uso de enzimas**. XXIX CURSO DE ESPECIALIZACION FEDNA, Madrid, 6 e 7 de novembro de 2013.

ANGEL, R.; SORBARA, J. O. B. Why is it important to understand substrates if we are to optimize exogenous enzyme efficacy? **Poultry Science**, v. 93, p. 2375–2379, 2014. [http://dx.doi.org/ 10.3382/ps.2013-03869](http://dx.doi.org/10.3382/ps.2013-03869).

AOAC International. **Official and Tentative Methods of Analysis of AOAC**. 16th ed. AOAC Int., Washington, DC, 1995.

BALLOUN, S. L.; KHAJARERN, J. K. The effects of whey and yeast on digestibility of nutrients in feather meal. **Poultry Science**, v. 53, p. 1084-1095, 1974.

BARLETA, A. Current market and expected developments. In: BEDFORD M. R.; PARTRIDGE, G. G. **Enzymes in farm animal nutrition**. 2^o ed, Londres: CAB international, p. 1-12, 2011.

BELLAVER, C. In: REGINA, R. **Nutrição animal, principais ingredientes e manejo de aves e suínos**, São Paulo, Fundação Cargill, Cap. 3, p. 127-155, 2010.

BERTECHINI, A. G. **Nutrição de monogástricos**. Lavras: Ed. UFLA, 2006. 301p.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRADLEY, O. C. **The Structure of the Fowl**, Tom Grahame ed, Oliver and Boyd, Edinburgh, UK, 1960.

BRASIL, Portaria nº 07, de 09 de novembro de 1988. Estabelece os padrões mínimos, das diversas matérias primas empregadas na alimentação animal. **Diário Oficial da União**. Brasília, p. 29-30.

CASTRO, R. J. S.; NISHIDE, T. G.; SATO, H. H. Production and biochemical properties of proteases secreted by *Aspergillus niger* under solid state fermentation in response to different agroindustrial substrates. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, p.236-245, 2014.

COWIESON, A. J.; HRUBY, M.; PIERSON, E. E. M. Evolving enzyme technology: impact on commercial poultry nutrition. **Nutrition Research Reviews**, v. 19, p. 90–103, 2006. DOI: 10.1079/NRR2006121.

CUPP-ENYARD, C. Use of the protease fluorescent detection kit to determine protease activity. **Journal of Visualized Experiments**. v. 3, e1514, 2009. DOI:10.3791/1514.

CURRY, J. **Yeast and Fermentation**. Dukes of Ale BJCP Preparation Course, 2009.

DAWSON, K. A. The application of yeast and yeast derivatives in the poultry industry. **Australian Poultry Science Symposium**, v. 13, p. 100-105, 2001.

DE COCA-SINOVA, A.; VALENCIA, D. G.; JIMÉNEZ-MORENO , E.; LÁZARO, R., MATEOS, G. G. Apparent ileal digestibility of energy, nitrogen, and amino acids of soybean meals of different origin in broilers. **Poultry Science**, v. 87, p. 2613–2623, 2008.

DHARNE, H. V. Maintaining gut integrity. **Avitech Technical Bulletin**, Jan, 2007.

DOSKOVIC, V.; BOGOSAVLJEVIC-BOSKOVIC, S.; PAVLOVSKI, Z.; MILOSEVIC, B.; SKRBIC, Z.; RAKONJAC, S.; PETRICEVIC, V. Enzymes in broiler diets with special reference to protease. **World's Poultry Science Journal**, v. 69, p. 343-360, 2013. DOI: 10.1017/S0043933913000342.

DOURADO, L. R. B.; SIQUEIRA, J. C.; SAKOMURA, N. K.; PINHEIRO, S. R. F.; MARCATO, S. M.; FERNANDES, J. B. K.; SILVA, J. H. V. Poultry feed metabolizable energy determination using total or partial excreta collection methods. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 12, n. 2, p. 129-132, 2010.

DUKES, H. H. **Fisiologia dos animais domésticos**. 12ª Ed. RJ. Guanabara Koogan, 2006.

EYNG, C.; NUNES, R. V.; ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; NUNES, C. G. V.; POZZA, P. C. Composição química e aminoacídica e coeficientes de digestibilidade verdadeira dos aminoácidos de farinhas de penas e sangue determinados em galos cecectomizados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.41, n.1, p.80-85, 2012.

FIRMAN, J. D.; MOORE, D.; BROOMHEAD, J.; MCINTYRE, D. Effects of dietary inclusion of a *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on performance and gut characteristics of male turkeys to market weight. **International Journal of Poultry Science**, v. 12, n. 3, p. 141-143, 2013.

FLICKINGER, E. A.; FAHEY JR, G. C. Pet food and feed applications of inulin, oligofructose and other oligosaccharides. **British Journal of Nutrition**. Suppl. 2, v. 87, p. 297–300, 2002.

FREITAS, E. R.; SAKOMURA, N. K.; NEME, R.; SANTOS, A. L.; FERNANDES, J. B. K. Efeito do processamento da soja integral sobre a energia metabolizável e a digestibilidade dos aminoácidos para aves. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.6, p.1938-1949, 2005.

FREITAS, D. M.; VIEIRA, S. L.; ANGEL, C. R.; FAVERO, A.; MAIORKA, A. Performance and nutrient utilization of broilers fed diets supplemented with a novel mono-component protease. **Journal Applied of Poultry Research**, v. 20, p. 322-334, 2011. DOI: 10.3382/japr.2010-00295.

GAO, J.; ZHANG, H. J.; YU, S. H.; WU, S. G.; YOON, I.; QUIGLEY, J.; GAO, Y. P.; QI, G. H. Effects of yeast culture in broiler diets on performance and immunomodulatory functions. **Poultry Science**, v. 87, p. 1377–1384, 2008.

GAO, J.; ZHANG, H. J.; WU, S. G.; YU, S. H.; YOON, I.; MOORE, D.; GAO, Y. P.; YAN, H. J.; QI, G. H. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on immune functions of broilers challenged with *Eimeria tenella*. **Poultry Science**, v. 88, p. 2141–2151, 2009.

GAUTHIER, R. The mode of action of acidifiers and the interest they generate in the growing-finishing phase. In: **CURRENT DEVELOPMENTS IN PIG PRODUCTION**, 2002, Maisons-Alfort. Anais...Maisons-Alfort, 2002.

GERBER, L. F. P.; PENZ JÚNIOR, A. M.; RIBEIRO, A. M. L. Efeito da composição do farelo de soja sobre o desempenho e o metabolismo de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.35, n.4, p.1359-1365, 2006.

GHAZI, S.; ROOKE, J. A.; GALBRAITH, H.; BEDFORD, M. R. The potential for the improvement of the nutritive value of soya-bean meal by different proteases in broiler chicks and broiler cockerels. **British Poultry Science**, v. 43, p. 70–77, 2002.

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

GRAY, C. J.; WEISSENBORN, M. J.; EYERS, C. E.; FLITSCH, S. L. Enzymatic reactions on immobilised substrates, **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 6378-6405, 2013. DOI: 10.1039/c3cs60018a.

GUERRA, J. B. **Melhoramento de *Bacillus* produtores de alfa-amilases, por fusão de protoplastos**. Dissertação (Mestrado), UFMG, Belo Horizonte, 68p., 1991.

HUO, G. C.; FOWLER, V. R.; INBORR, J.; BEDFORD, M. R. (1993) **The use of enzymes to denature antinutritive factors in soybean**. In: Proceedings of the 2nd International Workshop on ANFs in Legume Seed, Wageningen, paper 60. Wageningen, The Netherlands: European Association for Animal Production, 1993.

ISAKSEN, M. F.; COWIESON, A. J.; KRAGH, K. M. Starch and protein degrading enzymes: biochemistry, enzymology and characteristics relevant to animal feed use. In: BEDFORD M. R.; PARTRIDGE, G. G. **Enzymes in farm animal nutrition**. 2^o ed, CAB INTERNATIONAL, LONDON, p. 85-96, 2011.

JUNG, S. H.; KONG, D. H.; PARK, S. W.; KIMA, Y. M.; HA, K. S. Quantitative kinetics of proteolytic enzymes determined by a surface concentration-based assay using peptide arrays. **Analyst**, v. 137, p. 3814-3820, 2012. DOI: 10.1039/c2an35080g.

KIARIE, E.; ROMERO, L. F.; NYACHOTI, C. M. The role of added feed enzymes in promoting gut health in swine and poultry. **Nutrition Research Reviews**, v. 26, p. 71–88, 2013. DOI:10.1017/S0954422413000048.

KJELDAHL, J. Neue methode zur bestimmung des stickstoffs in organischen Körpern, **Z. Anal. Chem.** v. 22, p. 366-382, 1883.

KRABBE, E. L.; LORANDI, S. **Atualidades e tendências no uso de enzimas na nutrição de aves**. In: VI Congresso Latino-Americano de Nutrição Animal, Estância de São Pedro, SP – Brasil, 23 a 26 de Setembro de 2014.

KUNRATH, M. A. **Avaliação nutricional do farelo de arroz desengordurado em suínos nas fases de crescimento e terminação utilizando o método de substituição e a análise de regressão**. Fev, 2010. 72p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, 2010.

LEITE, P. R. S. C.; MENDES, F. R.; PEREIRA, M. L. R.; LACERDA, M. J. R. Limitações da utilização da soja integral e farelo de soja na nutrição de frangos de corte. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**, Goiânia, v. 8, n. 15; p. 1138-1157, 2012.

LEMME, A.; RAVINDRAN, V.; BRYDEN, W. L. Ileal digestibility of amino acids in feed ingredients for broilers. **World's Poultry Science Journal**, v. 60, 2004. DOI: 10.1079/WPS200426.

LEVY, F.; RABEL, D.; CHARLET, M.; BULET P.; HOFFMANN J. A.; EHRER-SABATIER, L. Peptidomic and proteomic analyses of the system immune response of drosophila. **Biochimie**, v. 86, p. 607-616, 2004.

LINGE, P. The use of probiotics and yeast derivatives in India. **World Poultry**, v. 21, n. 10, p. 12-15, 2005.

MAHAGNA, M.; NIR, I., LARBIER, M.; NITSAN, Z. Effect of age and exogenous amylase and protease on development of the digestive tract, pancreatic enzymes activities and digestibility of nutrients in young meat-type chickens. **Reproduction Nutrition Development**, v. 35, p. 201–212, 1995.

MATTERSON, L. D.; POTTER, L. M.; STUTZ, M. W. The metabolizable energy of feed ingredients for chickens. **Agricultural Experimental Station Research Report**, v.7, p.3-11, 1965.

MORAN, E. T. Comparative Nutrition of Fowl and Swine. **The Gastrointestinal Systems**. Ontario Agricultural College, University of Guelph, 1982.

MOURA, C. C. **Farinha de Penas e Sangue em Rações para Suínos em Crescimento e Terminação**. 1993. 45p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), UFV, Viçosa, 1993.

NASCIMENTO, A. H. **Determinação do valor nutritivo da farinha de vísceras e da farinha de penas para aves utilizando diferentes metodologias**. 2000. 106p. Dissertação (Doutorado em Zootecnia), UFV, Viçosa, 2000.

NASCIMENTO, A. H.; GOMES, P. C.; ALBINO, L. F. T.; ROSTAGNO, H. S.; TORRES, R. A. Composição química e valores de energia metabolizável das farinhas de penas e vísceras determinados por diferentes metodologias para aves. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.3, p.1409-1417, 2002.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

OLIVEIRA, F.; COSTA, F. G. P.; SILVA, J. H. V.; BRANDÃO, P. A.; AMARANTE JÚNIOR, V. S.; NASCIMENTO, G. A. J.; BARROS, L. R. Desempenho de frangos de corte nas fases de crescimento e final alimentados com rações contendo soja integral extrusada em diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 6, p. 1950-1955, 2005.

OPALINSKI, M.; ROCHA, C.; MAIORKA, A.; DAHLKE, F.; FISCHER DA SILVA, A. V.; BORGES, S. A. Impacto de enzimas e da granulometria sobre a digestibilidade da soja desativada para frangos de corte. **Archives of Veterinary Science**, v.16, n.2, p. 84-90, 2011.

PANT, G.; PRAKASH, A.; PAVANI, J. V. P.; BERA, S.; DEVIRAM, G. V. N. S.; KUMAR, A.; PANCHPURI, M.; PRASUNA, R. G. Production, optimization and partial

purification of protease from *Bacillus subtilis*. **Journal of Taibah University for Science**, v. 9, p. 50-55, 2015.

PAVEL, C. I.; MARGHITAS, L. AI.; BONTA, V.; MIHAI, C. M.; TOMOS, L. I. Determination of total protein content in Royal Jelly: a comparison of the Kjeldahl, the Bradford and the Lowry methods. **Lucrari Stiintifice-Seria Zootehnie**, v. 59, p. 209-212, 2013.

PRICE, K. L.; TOTTY, H. R.; LEE, H. B.; UTT, M. D.; FITZNER, G. E.; YOON, I.; PONDER, M. A.; ESCOBAR, J. Use of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on growth performance and microbiota of weaned pigs during *Salmonella* infection. **Journal of Animal Science**, v. 88, p. 3896-3908, 2010.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. **Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases**. Microbiology and Molecular Biology Reviews, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.

READ, S. M.; NORTHCOTE, D. H. Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie Blue G dye-binding assay for protein. **Analytical Biochemistry**, v. 116, p. 53-64, 1981.

REGINA, R. In: REGINA, R. **Nutrição animal, principais ingredientes e manejo de aves e suínos**, São Paulo, Fundação Cargill, Cap. 1, p. 13-85, 2010.

REISINGER, N. A.; ANJA GANNER, A.; SABINE MASCHING, B.; GERD SCHATZMAYR, A.; TODD, J.; APPLGATE, C. Efficacy of a yeast derivative on broiler performance, intestinal morphology and blood profile. **Livestock Science**, v. 143, p. 195–200, 2012.

ROCHA, C.; DURAU, J. F.; BARRILLI, L. N. E.; DAHLKE, F.; MAIORKA, P.; MAIORKA, A. The effect of raw and roasted soybeans on intestinal health, diet digestibility, and pancreas weight of broilers. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 23, p. 71-79, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.3382/japr.2013-00829>.

RODRIGUES P. B. **Digestibilidade de nutrientes e valores energéticos de rações e alguns alimentos para frangos de corte**. 2000. 204p. Tese (Doutorado em Zootecnia), UFV, Viçosa, 2000.

ROSTAGNO, H. S.; TEJEDOR, A. A.; ALBINO L. F.; SILVA, J. H. **Enzyme supplementation of corn-soybean meal diets improves nutrients ileal digestibility in broiler chicks**. Proceedings biotechnology in feed industries Alltech's 16th Annual Symposium, Nottingham Univ. Press, UK, p.101-107, 2000.

ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; DONZELE, J. L.; GOMES, P. C.; OLIVEIRA, R. F.; LOPES, D. C.; BARRETO, S. L. T.; EUCLIDES, R. F. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: Composição de alimentos e exigências nutricionais**. UFV, Viçosa, Brasil, 2011.

RUTZ, F. Proteínas: digestão e absorção. In: MACARI, M.; FURLAN, R. L.; GONZALES, E. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, Cap.10, p. 135-142, 2002.

RYNSBURGUER, J. M. **Physiological and nutritional factors affecting protein digestion in broiler chickens**. Tese (Mestrado em ciência), Departamento de ciência animal e avícola, University of Saskatchewan, Saskatoon, 2009.

RYNSBURGUER, J. M.; CLASSEN, H. L. Effect of age on intestinal pH of broiler chickens. **International Poultry Science Forum**, p. 724, 2007.

SAKOMURA, N. K.; ROSTAGNO, H. **Métodos de pesquisa em nutrição de monogástricos**. Jaboticabal: FUNEP, 2007. 283P.

SALES, J.; JANSSENS, G. P. J. The use of markers to determine energy metabolizability and nutrient digestibility in avian species. **World's Poultry Science Journal**, v.59, p.314-323, 2003.

SANTIN, E.; MAIORKA, A.; MACARI, M.; GRECCO, M. J.; SANCHEZ, C. Performance and intestinal mucosa development in broiler chickens fed ration containing *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 10, p. 236–244, 2001.

SANTOS, I. I. **Efeitos de probióticos, óleos essenciais e enzimas em parâmetros produtivos e sanitários de frangos de corte**. 2010, 198p. Tese (Doutorado em Zootecnia), Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, 2010.

SCAPIM, M. R. S.; LOURES, E. G.; ROSTAGNO, H.; 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 Scientiarum**. Animal Sciences, Maringá, v. 25, n. 1, p. 91-98, 2003.

SCOTT, T. A.; BOLDAJI, F. Comparison of inert markers [chromic oxide or insoluble ash (Celite™)] for determining apparent metabolizable energy of wheat- or barley-based broiler diets with or without enzymes. **Poultry Science**, v.76, p. 594-598, 1997.

SIALA, R.; SELLAMI-KAMOUN, A.; HAJJI, M.; ABID, I.; GHARSALLAH, N.; NASRI, M. Extracellular acid protease from *Aspergillus niger* I1: purification and characterization. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 18, p. 4582–4589, 2009.

SILVA, J. H. V.; MURAKAMI, F.; ALBINO, L. F. T., *et al.* Uso de rações à base de aminoácidos digestíveis para poedeiras. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 5, p. 1446-1451, 2000.

SILVA, V. K.; DELLA TORRE DA SILVA, J.; TORRES, K. A. A.; DE FARIA FILHO, D. E.; HIROTA HADA F.; BARBOSA DE MORAES, V. M. Humoral immune response of broilers fed diets containing yeast extract and prebiotics in the prestarter phase

and raised at different temperatures. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 18, p. 530–540, 2009.

SINDIRAÇÕES: **COMPÊNDIO BRASILEIRO DE ALIMENTAÇÃO ANIMAL**. São Paulo: Sindirações, 2009.

SKLAN, D.; SHACHAF, B.; BARON, J.; HURWITZ, S. Retrograde movement of digesta in the duodenum of the chick: extent, frequency, and nutritional implications. **The Journal of Nutrition**, p. 1485-1490, 1978.

SOUZA, T. L.; BECHTLUFFT, M. P.; Determinação de proteínas totais presentes nos ovos do carrapato *Boophilus microplus*, via espectrofotometria pelo método de Bradford. **SynThesis Revista Digital FAPAM**, v. 4, n. 4, p. 147-155, 2013.

SPRING, P.; WENK, C.; DAWSON, K. A.; NEWMAN K. E. The effects of dietary mannanoligosaccharides on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the ceca of Salmonella-challenged broiler chicks. **Poultry Science**, v. 79, p. 205–211, 2000.

STENZEL, M.; GIRATA, A. K.; PEREIRA, N. C.; ZANIN, G. M.; LIMA, O. C. M. Influência do tamanho das partículas na solubilização enzimática da proteína do farelo de soja. **Acta Scientiarum Technology**, v. 31, n. 2, p. 195-200, 2009. DOI: 10.4025/actascitechnol.v31i2.696

SVIHUS, B.; HETLAND, H.; CHOCT, M.; SUNDBY, F. Passage rate through the anterior digestive tract of broiler chickens fed on diets with ground or whole wheat. **British Poultry Science**, v. 43, p. 662–668, 2002.

SVIHUS, B.; CHOCT, M.; CLASSEN, C. L. Function and nutritional roles of the avian caeca: A review. **World's Poultry Science Journal**, v. 69, p. 249–263, 2013.

SVIHUS, B. Function of the digestive system. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 23, p. 1-9, 2014. <http://dx.doi.org/10.3382/japr.2014-009372014>.

TAL, M.; SILBERSTEIN, A.; NUSSER, E. Why does Coomassie Brilliant Blue R interact differently with different proteins? A partial answer. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 260, n. 18, p. 9976-9980, 1980.

TUOYING, A. O. **Exogenous enzymes and organic acids in the nutrition of broiler chicks: effects on growth performance and in vitro and in vivo digestion**. Tese (phD) The Graduate School University Of Kentucky, 2005.

TWINING, S. S. Fluorescein isothiocyanate-labeled casein assay for proteolytic enzymes. **Analytical Biochemistry**, v. 143, p. 30-34, 1984.

VAN DER KLIS, J. D.; VERSTEGEN, M. W. A.; DE WIT, W. Absorption of minerals and retention time of dry matter in the gastrointestinal tract of broilers. **Poultry Science**, v. 69, p. 2185–2194, 1990.

WANG, J. I.; GARLIC, J. D.; SHIH, J. C. H. Beneficial effects of Versazyme, a keratinase feed additive, on body weight, feed conversion, and breast yield of broiler chickens. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 15, p. 544-550, 2006.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, v. 21, n. 6, p. 787-793, 1998.

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