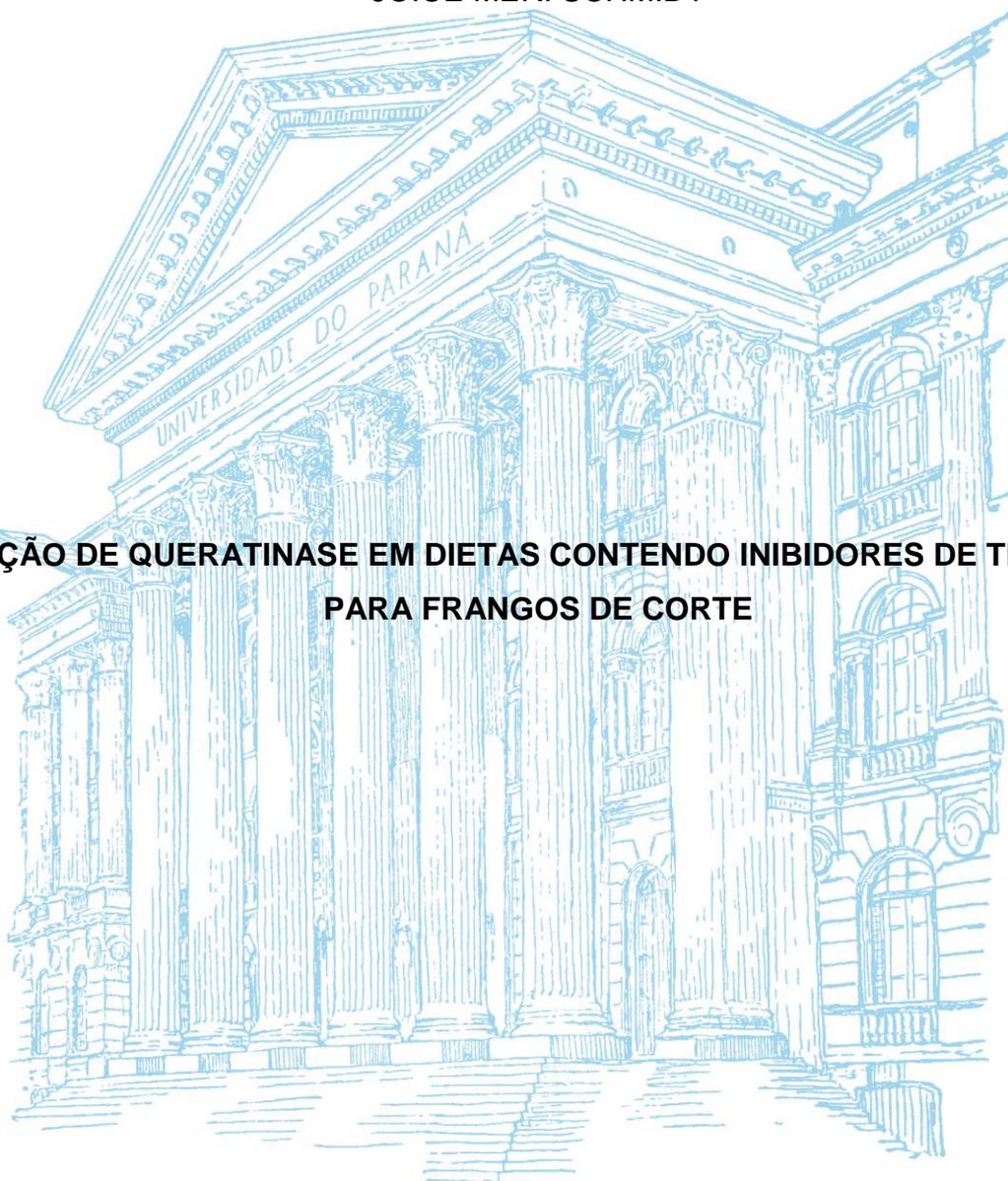


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JOICE MERI SCHMIDT

**ADIÇÃO DE QUERATINASE EM DIETAS CONTENDO INIBIDORES DE TRIPSINA
PARA FRANGOS DE CORTE**



PALOTINA-PR

2017

JOICE MERI SCHMIDT

**ADIÇÃO DE QUERATINASE EM DIETAS CONTENDO INIBIDORES DE TRIPSINA
PARA FRANGOS DE CORTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, área de concentração Produção Animal, linha de pesquisa em Nutrição e Produção Avícola, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Jovanir Inês Müller
Fernandes

PALOTINA-PR

2017

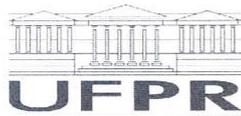
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

S348 Schmidt, Joice Meri
Adição de queratinase em dietas contendo inibidores de tripsina para frangos de corte / Joice Meri Schmidt . - Palotina, 2017.
95f.

Orientadora: Jovanir Inês Müller Fernandes.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal.

1.Desafio sanitário. 2. Globulinas. 3. Inflamação intestinal.
I. Fernandes, Jovanir Inês Müller. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDU 619

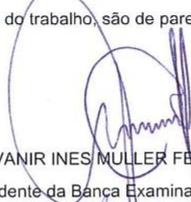


MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor PALOTINA
Programa de Pós-Graduação CIÊNCIA ANIMAL

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **JOICE MERI SCHMIDT** intitulada: **ADIÇÃO DE QUERATINASE EM DIETAS CONTENDO INIBIDORES DE TRIPSINA PARA FRANGOS DE CORTE**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovada.

Palotina, 24 de Fevereiro de 2017.


JOVANIR INES MULLER FERNANDES
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


LEANDRO PORTZ

Avaliador Externo (UFPR)


ELIS REGINA DE MORAES GARCIA

Avaliador Externo (UEMS)

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Joice Meri Schmidt, filha de Anete Terezinha Lucian e Jorge Osmar Schmidt, nasceu em Marechal Cândido Rondon, Paraná, dia 21 de Abril de 1992.

Iniciou o curso de Medicina Veterinária pela Universidade Federal do Paraná Setor Palotina em março de 2010, concluído em dezembro de 2014.

Em março de 2015 iniciou o curso de Mestrado no Programa de Pós Graduação em Ciência Animal pela Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina.

Em outubro de 2016 foi contratada pela empresa Globoaves Agroavícola Ltda, em Cascavel, Paraná, onde atua na área de Nutrição Animal.

“Se você encontrar um caminho sem obstáculos,
ele provavelmente não leva a lugar nenhum.”

Frank Clark

Aos meus pais Anete e Jorge, que dignamente
me apresentaram à importância da família e ao
caminho da honestidade e persistência.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as coisas boas e más que me aconteceram. Cada uma delas, ao seu modo, me fez chegar aonde eu cheguei, e me fizeram ser quem eu sou.

Aos meus pais, Jorge e Anete, por todo o apoio, compreensão, paciência, amor e por todos os valores que me ensinaram. Muito obrigada por me ajudar a tornar esse sonho realidade.

À profa Jovanir, mais do que uma orientadora, uma mãe. Mãe da grande família LEA. Muito obrigada por todos os ensinamentos, não só na vida acadêmica, mas pessoal também. Você nos torna pessoas melhores, por acreditar na nossa capacidade e nos forçar a superar nossos limites. Pela compreensão nos momentos difíceis, pelo incentivo nos momentos de fraqueza e pelas broncas quando necessárias. Por todo o apoio desde o período da graduação e, especialmente, durante o mestrado. Muito obrigada!

À Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina pelo acolhimento desde a graduação. E ao programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da UFPR-Setor Palotina pela oportunidade de realização deste sonho.

À CAPES e Fundação Araucária pela bolsa fornecida, que possibilitou minha dedicação exclusiva durante o período do mestrado.

À NOVUS International, empresa que possibilitou a realização deste projeto de pesquisa. Obrigada por todo apoio, especialmente Raquel Araujo, Ricardo Gonzalez Esquerre, Anderson Frizzo e Fernando Rigo.

À C-vale Cooperativa Agroindustrial, por todo auxílio durante a realização do mestrado e especialmente deste projeto de pesquisa.

À todos os integrantes do Laboratório de Experimentação Avícola – LEA. Meus amigos, sem vocês esse projeto não teria acontecido. Muito obrigada por toda ajuda em cada etapa desta caminhada. Sei que foi exaustivo, mas o esforço de cada um valeu a pena, a conquista é de todos nós! Além de toda a ajuda, agradeço pelo companheirismo e convivência, que nos torna pessoas melhores. A todos que fizeram parte deste sonho, Alexandra, Alvaro, Daiane, Daianna, Djiovane, Eliana, Elisangela, Erika, Fernanda, Heloísa, Jamile, Jean, Jonas, Luis, Lucas, Mauricio, Mayra, Regina, Sabrina e Thais, muito obrigada!

E um agradecimento especial às minhas amigas e colegas de mestrado, Adri e Anete. Sem vocês a caminhada teria sido muito árdua. Obrigada por toda a ajuda e apoio durante este período da minha vida. Especialmente, por todos os conselhos, encorajamentos, companheirismo, palavras amigas em momentos de dificuldade e parceria. Muito obrigada pela amizade, meninas!

Ao meu namorado, Lucas, por sempre estar do meu lado, me apoiando e me incentivando. Muito obrigada por toda a ajuda, amor, carinho, companheirismo, dedicação e por entender a importância desta etapa na minha vida!

Aos meus compadres Gefferson e Fabi, pelas conversas incentivadoras, descontraídas e auxílio sempre que precisei. Muito obrigado!

Estendo meus agradecimentos à todos que de alguma forma contribuíram para realização deste projeto!

RESUMO

Esse trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar o efeito da adição de queratinase em dietas contendo inibidores de tripsina sobre o desempenho produtivo, peso do pâncreas, rendimento e composição de carcaça e integridade intestinal de frangos de corte submetidos ou não a um modelo de desafio sanitário. Foram realizados dois experimentos. No experimento 1 foram alojados 1280 pintos em esquema fatorial 2 x 2 (com e sem a presença de soja x com e sem queratinase). A inclusão da queratinase foi de 250 g/tonelada. O desempenho das aves foi avaliado semanalmente até os 42 dias. Aos 21 e 42 dias de idade, o peso do pâncreas foi obtido para cálculo do peso relativo. Aos 42 dias foi determinado o rendimento de carcaça, avaliação da ocorrência de *White Striping*, resistência de pele e composição de carcaça. Aos 21 e 42 dias foram coletados segmentos intestinais para histomorfometria, contagem de caliciformes e Índice de Saúde Intestinal (ISI). No experimento 2; 640 pintos foram alojados em gaiolas experimentais e distribuídos em esquema fatorial 2 x 2 (com e sem queratinase e com e sem desafio). As rações foram formuladas com farelo de soja subprocessado. O desafio foi promovido por meio da utilização de cama descartada. Aos 21 dias foi realizado o desempenho zootécnico das aves. Aos 14 e 21 dias foram coletados segmentos intestinais para histomorfometria, contagem de caliciformes e avaliação da saúde intestinal. No experimento 1, a suplementação da queratinase resultou em maior ganho de peso e a inclusão de soja crua em pior conversão alimentar aos 7 dias. Aos 21 dias, a associação entre a queratinase e a soja crua reduziu o peso do pâncreas. Aves suplementadas com a queratinase apresentaram maior rendimento de carcaça. A inclusão de soja crua resultou em maior elasticidade de pele. Aos 21 dias, aves que consumiram dieta com soja crua apresentaram menor relação V:C e maior número de criptas por vilo. A utilização da queratinase reduziu os escores de ISI aos 21 dias. No entanto, aos 42 dias a queratinase resultou em maior inflamação intestinal. No experimento 2, o desafio resultou em maior largura de cripta e menor relação vilo:cripta, aos 14 dias. Aves que sofreram o desafio e receberam a suplementação de queratinase apresentaram maior área de absorção do jejuno. Aos 21 dias, aves suplementadas com a queratinase apresentaram maior largura de vilo e as desafiadas, em maior número de caliciformes no jejuno. Aves que receberam dietas sem a inclusão da queratinase e foram desafiadas apresentaram maior número de caliciformes no duodeno. Resultado semelhante foi observado nas aves não desafiadas e que receberam a suplementação de queratinase. Aves desafiadas apresentaram maior escore de ISI aos 14 dias. Aos 21 dias, aves suplementadas com queratinase e desafiadas apresentaram maior inflamação intestinal. Portanto, a suplementação de queratinase resultou em melhora no desempenho e integridade intestinal na fase inicial de criação. Além disso, a associação da queratinase e soja crua resultou em redução no peso do pâncreas e da inflamação intestinal no íleo.

Palavras-chave: desafio sanitário, globulinas, inflamação intestinal

ABSTRACT

The aim was to evaluate the effect of queratinase addition on diets containing trypsin inhibitors on the productive performance and intestinal health of broilers and under sanitary challenge. There were two trials; in the first one there were 1280 chicks housed in a completely randomized design in a 2 x 2 factorial scheme (with and without raw soybean replacing deactivated soybean x with and without queratinase). The queratinase was added in the diets at a dose of 250 g/ton. The performance of the birds was weekly assessed. At 21 and 42 days of age, the weight of the pancreas was obtained in order to calculate the relative weight. At 42 days, the carcass yield was performed, assessment of White Striping, skin resistance and carcass composition. At 21 and 42 days, intestine fragments were collected for histomorphometry, goblet cell counting and intestinal health evaluation, applying the morphometric index "I See Inside" (ISI). In the second trial, there were 640 chicks housed in experimental cages and placed in a completely randomized design following a 2 x 2 factorial scheme (with and without queratinase and with and without challenge). The diets were calculated with subprocessed soybean meal. The challenge was promoted through the use of discarded bedding. At 21 days, the performance of the animals was obtained. At 14 and 21 days intestine fragments were collected for histomorphometry, goblet cell counting and intestinal health evaluation. The results were submitted to analysis of variance at the 5% level of significance using SAS. In the first trial, the queratinase supplementation showed higher weight gain and raw soybean worst feed conversion ratio at 7 days of age. At 21 days, the association of queratinase and raw soybean resulted in a reduction of pancreatic weight. Birds supplemented with queratinase showed higher carcass yield. The addition of raw soybean caused higher skin elasticity. At 21 days, birds that received the diet with raw soybean showed lower V:C and higher number of crypts per villi. The use of queratinase provided a decrease of the ISI scores at 21 days. However, at 42 days, the queratinase showed higher intestinal inflammation. In the second trial, the challenge resulted in larger crypts and lower V:C at 14 days. The birds that underwent the challenge and received the queratinase supplementation had higher absorption area of jejunum. At 21 days, birds supplemented with queratinase showed higher larger villi; and the ones that were challenged higher number of goblet cells in the jejunum. Animals that received diets without queratinase and underwent the challenge had higher number of goblet cells. A similar result was noticed in birds that were not challenged and received queratinase supplementation. Challenged birds presented higher score of ISI at 14 days. At 21 days, challenged birds supplemented with queratinase had higher intestinal inflammation. The results obtained in this study indicate that the benefits of exogenous queratinase are better in the initial phase of broilers.

Key-words: globulins, intestinal inflammation, sanitary challenge

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. VISÃO GERAL DO PROCESSAMENTO DE SOJA PARA OBTENÇÃO DE FARELO DE SOJA, FARELO DE SOJA GORDO OU CONCENTRADO DE PROTEÍNA DE SOJA (ADAPTADO DE PETERSSON E PONTOPPIDIN, 2013).....	20
--	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL (UMIDADE, PROTEÍNA BRUTA, EXTRATO ETÉREO, FIBRA BRUTA E MATÉRIA MINERAL) DE FARELOS DE SOJA COM DIFERENTES PORCENTUAIS DE PROTEÍNA BRUTA.....	21
TABELA 2. PADRÃO DE ATIVIDADE UREÁTICA DO FARELO DE SOJA.....	26

CAPÍTULO I

TABELA 1. COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL (%) CONSIDERADA NA FORMULAÇÃO DA ENZIMA QUERATINASE	46
TABELA 2. COMPOSIÇÃO E NÍVEIS NUTRICIONAIS CALCULADOS DAS DIETAS EXPERIMENTAIS	47
TABELA 3. INIBIDORES DE TRIPSINA E UREASE DAS AMOSTRAS DE SOJA E FARELO DE SOJA, UTILIZADAS EM CADA FASE DE ALIMENTAÇÃO DAS AVES	48
TABELA 4. ÍNDICES ZOOTÉCNICOS DE FRANGOS DE CORTE RECEBENDO DIETAS COM INCLUSÃO DE SOJA CRUA EM SUBSTITUIÇÃO A SOJA DESATIVADA, SUPLEMENTADAS OU NÃO COM QUERATINASE	52
TABELA 5. PESOS ABSOLUTO E RELATIVO DO PÂNCREAS DE FRANGOS DE CORTE AOS 21 E 42 DIAS DE IDADE RECEBENDO DIETAS COM INCLUSÃO DE SOJA CRUA EM SUBSTITUIÇÃO A SOJA DESATIVADA, SUPLEMENTADAS OU NÃO COM QUERATINASE.....	54
TABELA 6. DESDOBRAMENTO DA INTERAÇÃO DE PESO ABSOLUTO E RELATIVO DO PÂNCREAS DE FRANGOS DE CORTE AOS 21 DIAS DE IDADE RECEBENDO DIETAS COM INCLUSÃO DE SOJA CRUA EM SUBSTITUIÇÃO A SOJA DESATIVADA, SUPLEMENTADAS OU NÃO COM QUERATINASE	55
TABELA 7. RENDIMENTO DE CARÇAÇA E CORTES COMERCIAIS DE FRANGOS DE CORTE AOS 42 DIAS DE IDADE RECEBENDO DIETAS COM INCLUSÃO DE SOJA CRUA EM SUBSTITUIÇÃO A SOJA DESATIVADA, SUPLEMENTADAS OU NÃO COM QUERATINASE.....	56
TABELA 8. ESCORE DE CLASSIFICAÇÃO DAS LESÕES MACROSCÓPICAS DE <i>WHITE STRIPING</i> EM FRANGOS DE CORTE AOS 42 DIAS DE IDADE	

RECEBENDO DIETAS COM INCLUSÃO DE SOJA CRUA EM SUBSTITUIÇÃO A SOJA DESATIVADA, SUPLEMENTADAS OU NÃO COM QUERATINASE.....	56
TABELA 9. RESISTÊNCIA DE PELE DE FRANGOS DE CORTE AOS 42 DIAS DE IDADE RECEBENDO DIETAS COM INCLUSÃO DE SOJA CRUA EM SUBSTITUIÇÃO A SOJA DESATIVADA, SUPLEMENTADAS OU NÃO COM QUERATINASE.....	57
TABELA 10. COMPOSIÇÃO DE CARCAÇA DE FRANGOS DE CORTE NA MATÉRIA SECA DE FRANGOS DE CORTE AOS 42 DIAS DE IDADE RECEBENDO DIETAS COM INCLUSÃO DE SOJA CRUA EM SUBSTITUIÇÃO A SOJA DESATIVADA, SUPLEMENTADAS OU NÃO COM QUERATINASE.....	58
TABELA 11. MEDIDAS MORFOMÉTRICAS DE FRANGOS DE CORTE AOS 21 DIAS DE IDADE RECEBENDO DIETAS COM INCLUSÃO DE SOJA CRUA EM SUBSTITUIÇÃO A SOJA DESATIVADA, SUPLEMENTADAS OU NÃO COM QUERATINASE.....	59
TABELA 12. DESDOBRAMENTO DA INTERAÇÃO DA ÁREA DE ABSORÇÃO DO DUODENO FRANGOS DE CORTE AOS 21 DIAS DE IDADE RECEBENDO DIETAS COM INCLUSÃO DE SOJA CRUA EM SUBSTITUIÇÃO A SOJA DESATIVADA, SUPLEMENTADAS OU NÃO COM QUERATINASE.....	61
TABELA 13. MEDIDAS MORFOMÉTRICAS DE FRANGOS DE CORTE AOS 42 DIAS DE IDADE RECEBENDO DIETAS COM INCLUSÃO DE SOJA CRUA EM SUBSTITUIÇÃO A SOJA DESATIVADA, SUPLEMENTADAS OU NÃO COM QUERATINASE.....	62
TABELA 14. AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DE QUALIDADE INTESTINAL DE FRANGOS DE CORTE AOS 21 E 42 DIAS DE IDADE RECEBENDO DIETAS COM INCLUSÃO DE SOJA CRUA EM SUBSTITUIÇÃO A SOJA DESATIVADA, SUPLEMENTADAS OU NÃO COM QUERATINASE.....	63
TABELA 15. ÍNDICE DE SAÚDE INTESTINAL (ISI) DE ÍLEO DE FRANGOS DE CORTE AOS 21 E 42 DIAS DE IDADE RECEBENDO DIETAS COM INCLUSÃO DE SOJA CRUA EM SUBSTITUIÇÃO A SOJA DESATIVADA, SUPLEMENTADAS OU NÃO COM QUERATINASE.....	65

CAPÍTULO II

TABELA 1. COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL (%) CONSIDERADA NA FORMULAÇÃO DA ENZIMA QUERATINASE	75
TABELA 2. COMPOSIÇÃO E NÍVEIS NUTRICIONAIS CALCULADOS DAS DIETAS EXPERIMENTAIS	76

TABELA 3. ÍNDICES ZOOTÉCNICOS DE FRANGOS DE CORTE AOS 21 DIAS DE IDADE, RECEBENDO DIETAS SUPLEMENTADAS OU NÃO COM QUERATINASE E SUBMETIDOS OU NÃO AO DESAFIO SANITÁRIO	79
TABELA 4. MEDIDAS MORFOMÉTRICAS DE FRANGOS DE CORTE AOS 14 DIAS DE IDADE, RECEBENDO DIETAS SUPLEMENTADAS OU NÃO COM QUERATINASE E SUBMETIDOS OU NÃO AO DESAFIO SANITÁRIO	81
TABELA 5. DESDOBRAMENTO DA INTERAÇÃO DA ÁREA DE ABSORÇÃO (μm^2) DO JEJUNO DE FRANGOS DE CORTE AOS 21 DIAS DE IDADE, RECEBENDO DIETAS SUPLEMENTADAS OU NÃO COM QUERATINASE E SUBMETIDOS OU NÃO AO DESAFIO SANITÁRIO.	82
TABELA 6. MEDIDAS MORFOMÉTRICAS DE FRANGOS DE CORTE AOS 21 DIAS DE IDADE, RECEBENDO DIETAS SUPLEMENTADAS OU NÃO COM QUERATINASE E SUBMETIDOS OU NÃO AO DESAFIO SANITÁRIO	83
TABELA 7. DESDOBRAMENTO DA INTERAÇÃO DA CONTAGEM DE CÉLULAS CALICIFORMES DO DUODENO E DA ÁREA DE ABSORÇÃO DO ÍLEO DE FRANGOS DE CORTE AOS 21 DIAS DE IDADE, RECEBENDO DIETAS SUPLEMENTADAS OU NÃO COM QUERATINASE E SUBMETIDOS OU NÃO AO DESAFIO SANITÁRIO	85
TABELA 8. AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DA QUALIDADE INTESTINAL DE FRANGOS DE CORTE AOS 14 E 21 DIAS DE IDADE, RECEBENDO DIETAS SUPLEMENTADAS OU NÃO COM QUERATINASE E SUBMETIDOS OU NÃO AO DESAFIO SANITÁRIO	86
TABELA 9. ÍNDICE DE SAÚDE INTESTINAL (ISI) DE ÍLEO DE FRANGOS DE CORTE AOS 14 E 21 DIAS DE IDADE, RECEBENDO DIETAS SUPLEMENTADAS OU NÃO COM QUERATINASE E SUBMETIDOS OU NÃO AO DESAFIO SANITÁRIO	89

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	18
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1. FARELO DE SOJA: PROCESSAMENTO E CARACTERÍSTICAS NUTRICIONAIS.....	19
2.2. FATORES ANTINUTRICIONAIS	21
2.3. FATORES ANTINUTRICIONAIS DA SOJA	22
2.3.1. Inibidores de protease	22
2.3.2. Proteínas alergênicas	23
2.3.3. Lectinas	24
2.3.4. Saponinas.....	25
2.4. INATIVAÇÃO DOS FATORES ANTINUTRICIONAIS DA SOJA	25
2.4.1. Teste de atividade ureática.....	25
2.4.2. Mensuração dos fatores antitripsínicos	27
2.5. ENZIMAS	27
2.5.1. Proteases	28
2.5.2. Queratinase	29
2.5.3. Enzimas proteolíticas em dietas para frangos de corte	30
2.5.4. Efeito da suplementação de proteases exógenas sobre a qualidade intestinal de frangos de corte	32
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
4. OBJETIVOS	42
4.1. GERAL	42
4.2. ESPECÍFICOS	42
CAPÍTULO I: ADIÇÃO DE QUERATINASE EM DIETAS CONTENDO INIBIDORES DE TRIPSINA PARA FRANGOS DE CORTE	43
INTRODUÇÃO	44
MATERIAL E MÉTODOS	45
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
CONCLUSÃO.....	67
REFERÊNCIAS.....	67

CAPÍTULO II: ADIÇÃO DE QUERATINASE EM DIETAS FORMULADAS COM FARELO DE SOJA SUBPROCESSADO SOBRE O DESEMPENHO PRODUTIVO E INTEGRIDADE INTESTINAL DE FRANGOS DE CORTE SUBMETIDOS AO DESAFIO SANITÁRIO	72
INTRODUÇÃO	73
MATERIAL E MÉTODOS	75
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	78
CONCLUSÃO.....	90
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	91
REFERÊNCIAS.....	92

1. INTRODUÇÃO GERAL

O farelo de soja é o principal ingrediente proteico utilizado nas dietas de frangos de corte, devido à sua adequada composição de aminoácidos. Das sementes de leguminosas, o farelo de soja tem o maior nível de proteína bruta e o melhor perfil de aminoácidos, com apenas 6% de fibra bruta (DEI, 2011). Os aminoácidos do farelo de soja são altamente digeríveis em todas as idades de frangos de corte (NEWKIRK, 2010). Embora a maioria das proteínas do farelo de soja sejam facilmente digeridas (MCDONNELL et al., 2010), algumas proteínas que constituem os fatores antinutricionais da soja, não são passíveis de digestão. Entre elas estão a glicina (cerca de 40% das proteínas totais de soja), β -conglucina (cerca de 30%), inibidores de tripsina (cerca de 6%) e lectinas (cerca de 0,5%) (SUN et al., 2007; ZHAO et al., 2008).

O valor nutritivo da soja para frangos de corte é limitado pela presença desses fatores antinutricionais que interferem no consumo de ração e na utilização dos nutrientes (FRIKHA et al., 2012). Os fatores antinutricionais podem induzir seus efeitos negativos por meio de diferentes mecanismos, incluindo a ligação a enzimas digestivas e nutrientes ou aumentando a viscosidade no trato gastrointestinal (AO, 2011).

O processamento térmico é geralmente considerado uma abordagem eficaz para inativar os fatores antinutricionais, mas alguns destes compostos podem permanecer intactos no farelo de soja, mesmo após o aquecimento (AO, 2011). Segundo Clemente et al. (2008), os Inibidores de Birk (BBI), um grupo de inibidores de tripsina, exibem uma resistência considerável ao tratamento térmico. Além disso, o processamento inadequado da soja, o subaquecimento, resulta na permanência dos fatores antinutricionais no farelo. Brito et al. (2006) relatam níveis residuais de atividade de inibidores de proteínas evidenciando subprocessamento da soja e do farelo de soja.

A utilização de enzimas exógenas pode ser uma alternativa para diminuir as diversidades dos ingredientes utilizados em dietas de frangos de corte reduzindo a variabilidade do valor dos ingredientes. A suplementação de enzima eleva o valor nutritivo dos ingredientes nutricionalmente deficientes e reduz a variação de ingredientes de boa e de má qualidade. Este efeito, por sua vez, melhora o grau de precisão da formulação de dietas (RAVINDRAN., 2013).

A adição de proteases exógenas pode representar um potencial desejável para inativação de fatores antinutritivos, tais como lectinas, proteínas antigênicas e inibidores de tripsina, presentes em determinados alimentos, particularmente em leguminosas (PETTERSSON e PONTOPPIDAN, 2013). Além disso, a suplementação de protease exógena melhora a digestibilidade da proteína bruta e aminoácidos, com conseqüente redução na excreção de nitrogênio, além de suplementar a atividade proteolítica em animais jovens, liberando peptídeos menores e facilitando a ação das enzimas endógenas (FREITAS et al., 2011; OXENBOLL et al., 2011).

O efeito da suplementação enzimática dependerá do substrato e das características dos ingredientes utilizados nas dietas, ou seja, o sítio de ação desse composto (OLUKOSI et al., 2007). Sendo as dietas brasileiras, ricas em farelo de soja como substrato proteico, e que nem sempre o tratamento térmico é adequado, as suas proteínas ainda são passíveis de digestibilidade. Segundo Yu et al. (2007), a suplementação de enzimas específicas para a hidrólise de proteínas do farelo de soja pode melhorar o desempenho de frangos de corte. Além disso, a inclusão adequada de enzima permite a formulação de dietas ecologicamente corretas devido à redução da excreção de nitrogênio, devido à diminuição dos níveis de proteína com o uso da protease.

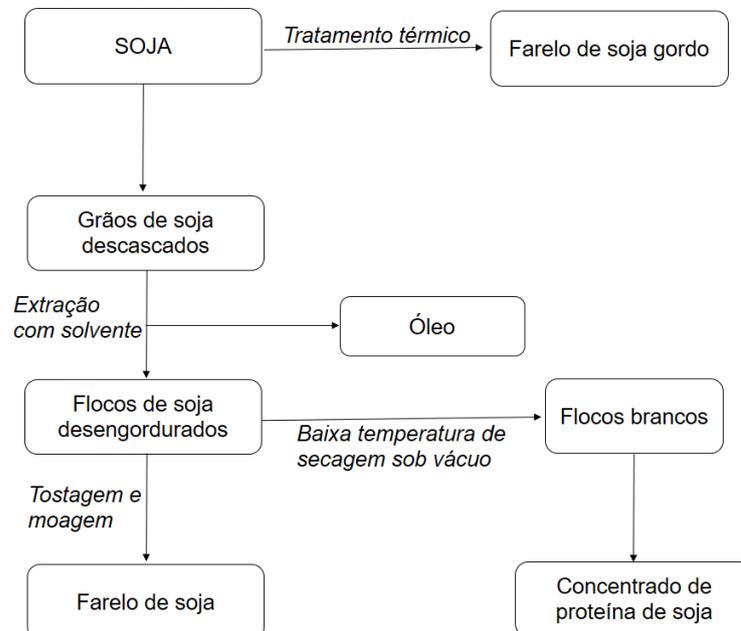
2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. FARELO DE SOJA: PROCESSAMENTO E CARACTERÍSTICAS NUTRICIONAIS

A principal fonte de proteína utilizada para frangos de corte é o farelo de soja (FS), que representa de 65% a 70% da proteína utilizada na formulação e é considerado o ingrediente proteico primário nas rações avícolas (COCA-SINOVA et al. 2008). O processamento inicial da soja inclui limpeza, secagem e quebra dos grãos para remover as cascas. A soja descascada é a matéria-prima para a produção de farelo de soja integral que pode ou não ser tratado termicamente para inativar os fatores antinutricionais. O processamento da soja (Figura 1) e, em particular, o passo final de aquecimento, a tostagem, é crítico para a qualidade do farelo de soja resultante.

Ao processar o farelo de soja, os grãos de soja descascados são condicionados a 65-70 °C, seguido de descamação, que prepara os grãos para a extração de óleo. O óleo é usualmente extraído utilizando um solvente, o hexano. Finalmente, o produto resultante é tratado para remover o solvente e aquecer o farelo suficientemente para otimizar o seu valor nutritivo. Neste processo, o controle das condições de processamento tais como temperatura, umidade, pressão e tempo de processamento é muito importante para manter uma solubilidade elevada do farelo de soja (PETTERSSON e PONTOPPIDIN, 2013).

FIGURA 1. VISÃO GERAL DO PROCESSAMENTO DE SOJA PARA OBTENÇÃO DE FARELO DE SOJA, FARELO DE SOJA GORDO OU CONCENTRADO DE PROTEÍNA DE SOJA



FONTE: adaptado de PETTERSSON E PONTOPPIDIN, 2013)

Na sua industrialização, o farelo é gerado com rendimento de 76,5%, representando dois terços dos farelos proteicos consumidos na alimentação animal (ROSTAGNO et al., 2004). A retirada ou adição de casca é que determina porcentagem de proteína bruta (entre 42 e 50%). O FS com 44% de PB é obtido pela adição de casca de soja, proveniente da fabricação do FS com 48% PB, que é descascado antes da extração do óleo. Também existe o FS com 46% PB, no qual a quantidade de casca já se encontra no grão (GERBER et al., 2006).

Das sementes de leguminosas, o farelo de soja tem o maior nível de proteína bruta (TABELA 1) e o melhor perfil de aminoácidos, com até 6% de fibra bruta, variando conforme a inclusão de casca de soja durante o processamento

(DEBASTIANI et al., 2007; DEI, 2011). Os aminoácidos do farelo de soja são altamente digeríveis, além de possuir o perfil de aminoácidos essenciais favorável para a alimentação de aves e suínos. (NEWKIRK, 2010; ROSTAGNO et al., 2011).

TABELA 1. COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL (UMIDADE, PROTEÍNA BRUTA, EXTRATO ETÉREO, FIBRA BRUTA E MATÉRIA MINERAL) DE FARELOS DE SOJA COM DIFERENTES PORCENTUAIS DE PROTEÍNA BRUTA

	Umid (Mín%)	PB (Mín%)	EE (Mín%)	FB (Máx%)	MM (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

FONTE: ROSTAGNO et al. (2011)

Quando processado de forma adequada, o farelo de soja é altamente palatável e digestível. O controle de qualidade do farelo fornece informações sobre a inativação dos fatores antinutricionais e os efeitos do aquecimento sobre a qualidade da proteína. O superaquecimento reduz a disponibilidade de lisina por meio da reação de *Maillard* e possivelmente, em menor grau, de outros aminoácidos. O subaquecimento mantém os fatores antinutricionais presentes na soja, os quais interferem no processo digestivo de aves e suínos (CAPRITA et al., 2010).

2.2. FATORES ANTINUTRICIONAIS

Os fatores antinutricionais são metabólitos secundários das plantas, capazes de transportar e armazenar nutrientes, de proteger contra os raios ultravioleta e de atrair agentes polinizadores e dispersores de sementes. No entanto, sua principal função é a defesa contra o ataque de insetos herbívoros e patógenos (CHEN, 2008; GUILLAMÓN et al., 2008).

Chubb (1982) classificou os fatores antinutricionais com base nos nutrientes que afetam, no tipo de ação e resposta produzida nos animais, em três grandes grupos: a) substâncias que prejudicam a digestibilidade ou a utilização metabólica das proteínas (inibidores de enzimas digestivas, lectinas ou hemaglutininas, saponinas e compostos fenólicos); b) substâncias que reduzem a solubilidade ou interferem na utilização dos minerais (ácido fítico, ácido oxálico, glicosinolatos e gossipol) e; c) substâncias que inativam ou aumentam as necessidades de algumas vitaminas (antivitaminas A, D, E e K, antivitaminas tiamina, ácido nicotínico, piridoxina e cianocobalamina).

Os fatores antinutricionais podem, ainda, ser classificados de acordo com sua capacidade em resistir aos processamentos térmicos, em termolábeis (inibidores de proteases, hemaglutinina e lipoxigenases) e em termorresistentes (oligossacarídeos, polissacarídeos não amiláceos, lisinoalaninas, glicinina e β -conglucina e fitato) (LIENER, 1981).

2.3. FATORES ANTINUTRICIONAIS DA SOJA

Devido a presença de fatores antinutricionais, que atuam negativamente sobre o desempenho animal, a soja *in natura* não deve ser utilizada na alimentação de animais não-ruminantes sem que seja adequadamente processada (MENDES et al., 2004). Os principais fatores antinutricionais presentes na soja são os inibidores de proteases, proteínas alergênicas, saponinas e lectinas ou hemaglutininas (LUDKE et al., 2007; NEWKIRK, 2010), que podem contribuir para a redução na utilização dos nutrientes. Os fatores antinutricionais podem induzir seus efeitos negativos por meio de diferentes mecanismos, incluindo a ligação com enzimas digestivas e nutrientes ou aumentando a viscosidade no trato gastrointestinal de frangos de corte (AO, 2011).

O tratamento térmico é considerado uma abordagem eficaz para inativar os fatores antinutricionais, mas alguns destes compostos ainda podem permanecer intactos após o aquecimento (AO, 2011). Embora Campbell e Schöne (1998) tenham sugerido que inibidores de tripsina e lectinas da soja podem ser inativado pelo calor, Clemente et al. (2008) relataram que inibidores Birk (BBI), um grupo de inibidores de tripsina, apresentam resistência considerável ao tratamento térmico.

2.3.1. Inibidores de protease

Os inibidores de protease são compostos proteicos presentes nos vegetais, capazes de se complexarem com a tripsina, quimotripsina e carboxipeptidase bloqueando a atuação das mesmas e prejudicando a digestão das proteínas alimentares (XAVIER FILHO e CAMPOS, 1989; SILVA e SILVA, 2000).

Os principais inibidores de proteases presentes na soja são o fator Kunitz (KTI) e o Bowman-Birk (BBI). O fator Kunitz é constituído de 181 resíduos de aminoácidos com duas pontes dissulfeto, possui 2% de cisteína na molécula e alto

peso molecular, aproximadamente 20.000 e seu centro de ligação com a enzima está localizado nos resíduos Arg 63 (arginina) e Ile 64 (isoleucina) (LIENER, 1994).

O fator Bowman-Birk possui peso molecular entre 6.000 e 10.000, 71 resíduos de aminoácidos e elevado número de resíduos de cisteína, formando de 8 a 9 pontes de dissulfeto por molécula de inibidor (LIENER, 1994). O que lhe confere maior resistência ao tratamento térmico.

O KTI liga-se à uma molécula de tripsina de forma estequiométrica, ou seja, uma molécula do inibidor inativa uma molécula de tripsina. Enquanto que o BBI liga simultânea e independentemente à duas moléculas, tripsina e quimotripsina, devido à presença de dois sítios reativos (Lys¹⁶-Ser¹⁷ e Leu⁴³-Ser⁴⁴, respectivamente). A soja *in natura* contém cerca de 1,67% de KTI e 0,4% de BBI; e dependendo do cultivar, o grão possui três isoformas de KTI, e de cinco a 12 de BBI (FRANCIS et al., 2001; HAQ et al., 2004).

Quando ingeridos, os inibidores ligam-se as enzimas tripsina e quimotripsina no trato gastrointestinal, formando complexos inativos, com consequente redução na digestibilidade de aminoácidos (JEZIERNY et al., 2010). A inativação destas enzimas resulta no aumento da secreção das mesmas e de colecistoquinina (CCK) por meio de um mecanismo de feedback negativo, ocasionando hipertrofia pancreática (LIENER, 1994; MORISSET, 2008).

A ingestão desses inibidores de proteases afeta principalmente o pâncreas. Promovendo hipertrofia pancreática em frangos de corte em função da compensação das perdas provocadas pelos fatores antinutricionais (BRITO et al., 2006), com consequente aumento no peso relativo do pâncreas (PACHECO et al., 2014). Além disso, a piora no desempenho das aves causada por esses inibidores, pode ser consequência da perda endógena de aminoácidos sulfurados, presentes nas enzimas pancreáticas e da inibição do consumo de ração pelo aumento da produção de CCK (RIPKEN et al. 2015).

2.3.2. Proteínas alergênicas

As proteínas alergênicas presentes na soja são representadas pela conglicinina e β -conglicinina. São as principais proteínas de armazenamento da semente de soja e sua função está relacionada ao fornecimento de nutrientes às

plântulas em germinação, no período pré-fotossintético (CARRÃO-PANIZZI et al., 2008).

A glicinina apresenta-se como hexâmero de peso molecular entre 320 a 375 kDa e pode conter até cinco subunidades. Cada subunidade é composta por um polipeptídeo ácido (~35 kDa) e um polipeptídeo básico (~20 kDa) ligados por uma ponte dissulfeto (FARIS et al., 2008). As glicinas podem ser classificadas em dois grupos segundo sua sequência aminoacídica. O grupo I contém maiores quantidades de metionina (seis a sete resíduos por subunidade) e o grupo II contém de dois a cinco resíduos de metionina. Do ponto de vista nutricional, a glicinina é a fração mais disponível e contém de três a cinco vezes mais aminoácidos em relação à β -conglucina (BRANDON e FRIEDMAN, 2002; KRISHNAN, 2005).

A β -conglucina é uma glicoproteína e contém cerca de 5% de carboidratos, principalmente manose, ligados covalentemente aos resíduos de asparagina. Possui peso molecular de aproximadamente 150 kDa e é composta por três subunidades: α , α' e β (FRIEDMAN e BRANDON, 2001; ZILIC et al., 2011).

As proteínas alergênicas causam reações de hipersensibilidade, comprometendo a integridade da mucosa intestinal e a relação entre a altura de vilosidade e profundidade de cripta, com produção de anticorpos que impedem o desenvolvimento da microbiota intestinal, afetando o desempenho dos animais. A presença destes fatores ativos na dieta resulta na redução do consumo da ração, comprometimento da digestão, da absorção de nitrogênio e da utilização dos nutrientes da dieta (FENG et al., 2007; KIM et al., 2010, LIMA et al., 2011). Segundo Mori et al. (2009), frangos alimentados com soja crua apresentaram maior profundidade de cripta no jejuno, evidenciando o processo de produção celular e restauração da vilosidade intestinal.

2.3.3. Lectinas

As lectinas são glicoproteínas de origem não imunológica, capazes de se ligarem especifica e reversivelmente a oligossacarídeos ou glicopeptídeos da superfície celular, por meio de ligações de hidrogênio e interações de Van der Waals (BRANDON e FRIEDMAN, 2002; CHAMP, 2002). São frequentemente denominadas de hemaglutininas devido a sua capacidade de provocar a aglutinação de hemácias em várias espécies animais (LIENER, 1994).

As lectinas presentes na soja são glicoproteínas tetraméricas que se acumulam durante a embriogênese. Possuem peso molecular de 120 kDa e são classificadas em cinco grupos de acordo com o monossacarídeo pelo qual exibem a maior afinidade (BARACÉ et al., 2005).

Grande parte das lectinas pode resistir à ação enzimática do trato digestivo e se ligar às células do intestino, principalmente do duodeno e jejuno, provocando desorganização e destruição das vilosidades intestinais; com consequente interferência na digestão e absorção dos nutrientes, redução na secreção de enzimas pelos enterócitos, hipersecreção de proteína endógena e aumento da secreção de muco (OLIVEIRA et al., 2000; FASINA et al., 2004).

2.3.4. Saponinas

As saponinas são glicosídeos esteroidais caracterizados por apresentarem sabor amargo e capazes de formar complexos insolúveis de difícil digestão. A soja *in natura* contém três tipos de saponinas: α g, β a e β g em concentrações que variam de 0,46 a 0,50% (CHAMP, 2002).

Seus efeitos antinutricionais estão relacionados às modificações na permeabilidade da mucosa intestinal, inibindo o transporte de alguns nutrientes (LIENER, 2000). Estas substâncias formam complexos insolúveis com 3- β -hidroxiesteróides e interferem na absorção de lipídeos, colesterol, sais biliares e vitaminas lipossolúveis presentes na dieta. Além disso, são capazes de lisar hemácias e reduzir a digestibilidade da proteína por meio da formação de complexos com proteínas da dieta (TACON, 1997; PUTSZAI et al., 2004).

2.4. INATIVAÇÃO DOS FATORES ANTINUTRICIONAIS DA SOJA

2.4.1. Teste de atividade ureática

O método para determinar o índice de atividade de urease foi desenvolvido por Caskey e Knapp (1944) com a finalidade de avaliar a qualidade do processamento térmico aplicado a soja. De acordo com Ward (1996) a análise do índice de atividade de urease baseia-se na liberação de amônia da ureia pela ação da enzima urease presente na soja. Em consequência disso, há uma mudança no

pH da solução, o qual é expresso como um índice, em que a solução branco padrão não contém ureia. Uma soja sub-processada, resultará em uma grande mudança no pH enquanto uma superprocessada, não registrará mudanças no pH.

O teste de atividade ureática baseia-se no princípio de que o tratamento térmico, quando realizado de forma adequada, desnatura a enzima urease presente no grão de soja, a qual apresenta resistência térmica semelhante aos fatores antinutricionais. Portanto, a desnaturação da urease é um indicativo de que os fatores antinutricionais também foram desnaturados, já que ambos sofrem esse processo na mesma proporção. O índice de atividade ureática está baseado na liberação de amônia da ureia pela ação da enzima urease presente na soja. Isso causa uma mudança no pH da solução o qual é expresso como um índice térmico (BORGES et al., 2003). O adequado processamento da soja pode ser avaliado a partir da variação de pH (TABELA 2). A legislação federal (portaria nº7, de 09 de novembro de 1988) estabelece valores de atividade ureática entre 0,05 e 0,30 para utilização do farelo de soja na alimentação animal.

TABELA 2. PADRÃO DE ATIVIDADE UREÁTICA DO FARELO DE SOJA

Classificação	Atividade Ureática (Δ pH)
Excelente	0,01-0,05
Adequada	0,05-0,20
Subprocessado	>0,20

FONTE: Adaptado de PALIĆ et al. (2008)

Outro método utilizado na avaliação da atividade ureática, é baseado em um ensaio colorimétrico; na qual a solução vermelho de fenol é usado como um indicador de pH. Após 5 minutos, a amostra é observada quanto à presença de partículas vermelhas. Se não houver partículas vermelhas, a mistura deve ficar mais 30 minutos, e novamente, se nenhuma cor vermelha é observada, sugere superaquecimento do produto. Se até 25% da superfície é coberta com partículas vermelhas, é indicação de atividade aceitável de urease, enquanto 25 a 50% de cobertura sugerem necessidade de uma análise mais detalhada. Mais de 50% de incidência de partículas de cor vermelha sugere subaquecimento do farelo de soja (LEESON e SUMMERS, 2008).

2.4.2. Mensuração dos fatores antitripsínicos

Os procedimentos descritos para determinar a atividade dos inibidores de tripsina baseiam-se na capacidade dos inibidores de formarem um complexo com a enzima e assim reduzir a atividade da mesma. A tripsina não inibida catalisa a hidrólise de um substrato sintético BAPNA (N-benzoil-DL-arginina p-nitroanilida), formando um produto de cor amarela e assim produzindo uma alteração na absorvância. Por razões práticas, os métodos descritos medem os inibidores totais de tripsina, refletindo, assim, a concentração e os efeitos de dois tipos diferentes de inibidores, o inibidor de tripsina de Kunitz e o de Bowman-Birk (KAKADE et al., 1969, 1974).

A soja crua possui, normalmente, atividade inibidora de tripsina entre 20 e 35 mg/g. O nível de fatores antitripsínicos assumido para ter mínimos efeitos adversos em frangos de corte é de 4mg/g. No entanto, existem níveis variáveis (04-68 mg/g) de fatores antitripsínicos nos farelos de soja comercialmente disponíveis (PROBERT, 2004). Perilla et al. (1997) mostraram que o nível de 28 mg/kg de fatores antitripsínicos na dieta está associado ao pior desempenho em frangos de corte.

2.5. ENZIMAS

As enzimas são compostos protéicos capazes de atuar em substratos específicos com o objetivo de aumentar a velocidade de uma reação. Essa atuação é influenciada por algumas condições encontradas no trato digestório como, por exemplo, as condições de temperatura, umidade, pH, além de possuírem substratos específicos para atuação (DOSKOVIC et al. 2013; ANGEL e SORBARA, 2014). De acordo com Fireman e Fireman (1998), as enzimas são proteínas globulares de estrutura terciária ou quaternária que agem como catalisadores biológicos e que podem conter outras substâncias tais como vitaminas e minerais como cofatores. As reações bioquímicas que acontecem nos organismos vivos, sem exceção são catalisadas por enzimas específicas (LECZNIESKI, 2006).

As enzimas exógenas utilizadas na alimentação animal são produzidas industrialmente em laboratórios especializados por meio de culturas aeróbias, e derivadas principalmente da fermentação bacteriana, fúngica e de leveduras

destacando-se bactérias do gênero *Bacillus* e fungos do gênero *Aspergillus* como principais produtores de enzimas exógenas (KHATTAK et al., 2006).

As enzimas endógenas são sintetizadas pelo próprio animal ou pela microbiota naturalmente presente no trato intestinal. No entanto, o processo digestivo não é totalmente eficiente. Segundo Barletta (2011), cerca de 15% a 25% do que é consumido pelos animais não é passível de digestão, seja pela presença de fatores antinutricionais que indisponibilizam os nutrientes, ou porque o animal não sintetiza determinadas enzimas necessárias à quebra das ligações, ou ainda o animal sintetiza a enzima, porém não em quantidade suficiente para digerir o ingrediente presente na ração, principalmente no caso de aves jovens.

A suplementação de enzimas exógenas permite a melhor utilização de matérias primas com menor valor nutritivo o que, conseqüentemente, reduz os efeitos dos fatores antinutricionais (PALOHEIMO et al., 2010). Além disso, a suplementação enzimática proporciona maior flexibilidade, precisão e economia nas formulações das dietas, melhora a textura das excretas e a qualidade da cama, além de proporcionar melhor digestibilidade dos nutrientes, com conseqüente redução da poluição ambiental causada pela excreção de nutrientes não digeridos, resultando em melhores índices zootécnicos (CHOCT, 2006; COSTA et al., 2010; LELIS et al., 2010).

2.5.1. Proteases

As enzimas proteolíticas ou proteases são caracterizadas por sua capacidade de hidrolisar ligações peptídicas antes ou depois de aminoácidos específicos. As atividades de proteases endógenas são cuidadosamente reguladas, pois a atividade delas em um local inadequado pode levar a digestão dos próprios tecidos do animal e/ou ativar vias inflamatórias (ISAKSEN et al., 2010).

Conforme a nomenclatura da “International Union of Biochemistry and Molecular Biology” (1992), as proteases são enzimas da classe 3, as hidrolases, e subclasse 3.4, as peptídeo-hidrolases ou peptidases. Estas enzimas constituem uma grande família, dividida em endopeptidases ou proteinases e exopeptidases, de acordo com a posição da ligação peptídica a ser clivada na cadeia peptídica. Exopeptidases clivam as ligações peptídicas próximas ao grupo amino ou carboxi-terminal do substrato (classificadas como amino e carboxipeptidases,

respectivamente), enquanto as endopeptidases clivam as ligações peptídicas distantes do grupo terminal do substrato. As endopeptidases podem ser ainda subdivididas de acordo com o grupo reativo no sítio ativo envolvido com a catálise em: serina proteases, cisteína proteases, aspártico-proteases ou aspártico-endopeptidases e metaloproteases ou metaloendopeptidases (RAO et al., 1998).

Quatro classes de enzimas proteolíticas são reconhecidas pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular, as quais compreendem seis famílias de acordo com a massa molecular, propriedades elétricas e especificidade ao substrato. São elas: serino protease I (elastase e tripsina), serino protease II (subtilisina), cisteíno proteases (actinidina), aspártico proteases (renina), metalo proteases I (carboxipeptidase bovina) e metalo protease II (termolisina). Cada família de protease apresenta resíduos de aminoácidos funcionais, característicos no seu sítio ativo (BEYNON, 1996).

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 (CRURGER e CRUEGER, 1993), 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).

2.5.2. Queratinase

Queratinases são produzidas, principalmente, por bactérias do gênero *Bacillus* spp. Espécies desse gênero possuem alta capacidade de produção de queratinases alcalinas, que são amplamente utilizadas nas indústrias e possuem alta atividade catalítica (JOO e CHANG, 2005). Diversas cepas de *Bacillus licheniformis* e *B. subtilis* são descritas como queratinolíticas (ZHANG et al., 2009; ZAGHLOUL et al., 2011). Segundo Brandelli (2008), as queratinases microbianas são um grupo de enzimas proteolíticas com a capacidade de degradar proteínas resistentes.

As queratinases são, em sua maioria, serino proteases, moderadamente termofílicas (suportando temperaturas entre 45°C e 90°C) e alcalinas (apresentando

boa atividade entre pH 7,5 a 10,0). Microrganismos produtores de queratinases, são encontrados em diversos locais com ou sem histórico de materiais queratinosos, incluindo ambiente aeróbios e anaeróbios (BERNAL et al., 2006).

A queratinase foi descoberta e isolada a partir do meio de cultura de *Bacillus licheniformis* PWD-1 (WILLIAMS et al., 1990; LIN et al., 1992). Entre os diversos substratos proteicos que a PWD-1-queratinase hidrolisa está a caseína, colágeno, elastina e queratina (ODETALLAH et al., 2005) e possui alta atividade proteolítica sobre as proteínas animais e vegetais exibindo atividade ótima de queratinase em 50-60°C e pH 7,5-8,0 (SHIH; WANG, 2006).

A capacidade da queratinase de hidrolisar caseína, colágeno, elastina, queratina e outras proteínas de origem animal ou vegetal já foi demonstrada *in vitro* (YU et al., 1972, GRADIŠAR et al., 2005). Uma das possíveis explicações bioquímicas que permite que a queratinase desempenhe esta função foi proposta por Tu et al. (1998), que especificaram que a queratinase é composta por proteína dissulfeto redutase e peptídeo hidrolase. A proteína-dissulfeto redutase rompe as ligações dissulfeto de cisteína presentes em algumas proteínas não digeríveis e depois a peptídeo hidrolase hidrolisa a proteína em peptídeos e aminoácidos (TU et al., 1998; GUPTA e RAMNANI, 2006).

2.5.3. Enzimas proteolíticas em dietas para frangos de corte

A utilização de protease em dietas para frangos de corte vem sendo estudada com o objetivo de melhorar o aproveitamento dos ingredientes, com conseqüente melhora no desempenho e redução dos custos de produção avícola. A suplementação de proteases exógenas nas dietas para animais monogástricos visa quebrar as proteínas pouco disponíveis, designadas de proteínas de armazenamento, presentes nos ingredientes vegetais, as quais são geradas, principalmente, no desenvolvimento das sementes, e possuem enorme afinidade de se ligar ao amido, não conseguindo ser digeridas pelo animal por formar complexos insolúveis na forma de quelato (BARLETTA, 2011).

Um dos grandes benefícios da inclusão de protease nas dietas de frangos de corte é a melhora na digestibilidade da proteína de uma vasta gama de ingredientes naturais. Com o aumento da utilização da proteína da alimentação, a adição da enzima oferece a possibilidade de reduzir a quantidade de proteína

incluída na dieta, e, assim, favorecer a economia de matérias-primas dispendiosas, tais como o farelo de soja (GLITSØ et al. 2012). Fru-nji et al. (2011) sugeriram que as proteases monocomponentes podem aumentar o grau de hidrólise das proteínas e, conseqüentemente, aumentar a proporção de proteínas solúveis de baixo peso molecular, tornando assim a proteína melhor disponível para absorção pelos frangos de corte.

A suplementação de enzimas específicas para a hidrólise de farelo de soja pode melhorar o desempenho de frangos de corte. A inclusão de enzimas exógenas reduz a síntese das endógenas deixando para o organismo uma maior quantidade de aminoácidos para a síntese proteica (YU et al., 2007). Angel et al. (2011), estudando o efeito da suplementação de protease em dietas à base de milho e farelo de soja para frangos de corte de 7 a 22 dias de idade, verificaram que a adição da protease em quantidades iguais ou superiores a 200 mg/Kg de ração aumentaram a digestibilidade de aminoácidos. No entanto, o grau de melhoria era dependente do aminoácido específico, tendo menores ganhos com isoleucina (3,2%), e maiores respostas com a treonina (7,8%).

Avaliando os efeitos da adição de protease exógena em dietas a base de milho, farelo de soja e farinha de carne e ossos para frangos de corte, Freitas et al. (2011) concluíram que a protease utilizada teve efeito benéfico sobre a conversão alimentar, além de melhorar a digestibilidade da proteína. Além disso, aves suplementadas com protease apresentaram melhor desempenho zootécnico, maior rendimento de carcaça e menor deposição de gordura abdominal (MAYORGA et al., 2011; RADA et al., 2014)

Segundo Yan et al. (2012), a adição de protease exógena, em dietas à base de milho e farelo de soja, melhorou a conversão alimentar em frangos de corte aos 35 e 46 dias de idade. Estes autores afirmam que a suplementação de protease pode poupar aproximadamente 7,5% de proteína bruta em dietas à base de milho e farelo de soja, sem impacto negativo sobre o desempenho das aves. O uso de uma protease produzida pelo *Bacillus licheniformis* PWD-1, naturalmente termofílico e com uma elevada atividade queratinolítica, proporcionou melhoras na conversão alimentar e na integridade intestinal das aves, indicando significantes benefícios na morfologia intestinal dos animais aos 42 dias de idade (WANG et al., 2006).

2.5.4. Efeito da suplementação de proteases exógenas sobre a qualidade intestinal de frangos de corte

A origem do efeito de promoção da saúde da protease exógena no intestino de frangos de corte ainda não é clara, mas pode ser uma combinação de vários fatores. Tais fatores incluem a redução na putrefação no trato gastrointestinal distal (WINDEY et al., 2012), a hidrólise de fatores antinutricionais proteicos e proteínas antigênicas (GHAZI. et al, 2002; COWIESON et al, 2016), redução da viscosidade do conteúdo no lúmen intestinal (ODETALLAH et al., 2003; BAREKATAIN et al., 2013), melhor disponibilidade de aminoácidos para a síntese de mucina (COWIESON e ROOS, 2014), *turnover* dos enterócitos e a integridade das *tight junction* (COWIESON et al., 2016).

Segundo Zuo et al. (2015) a adição de protease exógena na dieta à base de milho e farelo de soja para leitões recém-desmamados resultou em uma redução significativa no índice de diarreia (3,37% no controle e 1,84% com 200 mg de protease/kg de ração). Uma correlação estatisticamente significativa entre o efeito de protease sobre a digestibilidade dos aminoácidos e o perfil dos aminoácidos da mucina intestinal foi observado por Cowieson e Roos (2014). A partir desta relação é plausível afirmar que uma parte do efeito benéfico da protease sobre a digestibilidade dos aminoácidos é devido a redução na perda de mucoproteína no intestino, com consequente melhora na saúde intestinal.

Em estudo realizado por Peek et al. (2009), foi avaliado a suplementação de uma protease em dietas à base de milho, farelo de soja e trigo de frangos de corte submetidos ao desafio entérico com coccidiose (*E. acervulina*, *E. maxima*, *E. tenella*). Esses autores verificaram aumento no ganho de peso nas aves infectadas. Além disso, as aves que receberam a dieta suplementada com protease exógena apresentaram uma camada mais grossa de muco aderente no duodeno, jejuno e ceco, comparado com as aves que receberam a dieta controle, aliviando os efeitos do desafio entérico.

Wang et al. (2008) e Zuo et al. (2015) observaram aumento na altura das vilosidades e diminuição na profundidade das criptas quando uma protease exógena foi adicionado em dietas à base de milho e farelo de soja para leitões recém-desmamados e frangos de corte. Yan et al. (2016), avaliaram o efeito do nível de proteína na dieta e a suplementação de protease sobre saúde intestinal. Estes

autores verificaram que a protease estava associada ao maior desenvolvimento intestinal e a inflamação sistêmica reduzida, devido a melhor relação vilo:cripta.

A utilização de uma protease exógena monocomponente em uma dieta livre de farelo de soja (baseada em milho, farinha de canola e DDGS) ou uma dieta baseada em farelo de soja foi testada por Cowieson et al., 2016. O desempenho das aves foi melhor na dieta contendo farelo de soja e além disso, a suplementação com a protease resultou na regulação positiva de claudina e em várias proteínas transportadoras de aminoácidos no jejuno de frangos de corte aos 21 dias de idade. Segundo esses autores, esses resultados são sugestivos de melhora na integridade das *tight junction* no intestino e, conseqüentemente na capacidade absorptiva do intestino.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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, n. 9, p. 2375–2379, 2014.
- AO, T. Using exogenous enzymes to increase the nutritional value of soybean meal in poultry diet, in: EL-SHEMY, H. (Ed) **Soybean and nutrition**. Rijeka: InTech, 2011, p. 201-214.
- BARAĆ, M. B.; STANOJEVIĆ, S. P.; PEŠIĆ, M. B. Biologically active components of soybeans and soy protein products: a review. **Acta Periodica Technologica**, Novi Sad, v. 36, n. 1, p. 155-168, 2005.
- BAREKATAIN, M. R.; ANTIPATIS, C.; CHOCT, M.; IJI, P. A. Interaction between protease and xylanase in broiler chicken diets containing sorghum distillers dried grains with solubles. **Animal Feed Science and Technology**, v. 182, n. 1-4, p. 71–81, 2013.
- BARLETTA, A. Introduction: Current market and expected developments. In: BEDFORD, M. R.; PARTRIDGE, G. G. **Enzymes in farm animal nutrition**. 2nd. London: Cab International, 2011. p. 1-11.
- BERNAL, C.; CAIRO, J.; COELLO, N. Purification and characterization of a novel exocellular keratinase from *Kocuria rosea*. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 38, n. 1-2, p. 59-54, 2006.
- BEYNON, R. J. Proteolytic enzymes: a practical approach. New York: Oxford University. Press, 1996. p. 257.
- BORGES, S. A; SALVADOR, D.; IVANOVSKI, R. A. Utilização da soja desativada na dieta de monogástricos. In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE AVES E SUÍNOS, Cascavel, PR. **Anais...CBNA**, 2003, p. 21-66.

- BRANDELLI, A. Bacterial keratinases: useful enzymes for bioprocessing agroindustrial wastes and beyond. **Food Bioprocess Technology**, v. 1, n. 2, p. 105–116, 2008.
- BRANDON, D. L.; FRIEDMAN, M. Immunoassays of soy proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 22, p. 6635-6642, 2002.
- BRITO, C. O.; ALBINO, L. F. T.; ROSTAGNO, H. S.; GOMES, P. C.; DIONÍZIO, M. A.; CARVALHO, D. C. O. Adição de complexo multienzimático em dietas à base de soja extrusada e desempenho de pintos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 2, p. 457-461, 2006.
- ANGEL, C. R.; SAYLOR, W.; VIEIRA, S.L.; WARD, N. Effects of a monocomponent protease on performance and protein utilization in 7 to 22-day-old broiler chickens. **Poultry Science**, v. 90, n. 10, p. 2281–2286, 2011.
- CAMPBELL, L.; SCHÖNE, F. Effects of antinutritional factors in rapeseed. **Publication-European Association for Animal Production**, v. 93, n. 1, p. 185-198, 1998.
- CĂPRIȚĂ, R.; CĂPRIȚĂ, A.; CREȚESCU, I. Protein Solubility as Quality Index for Processed Soybean. **Animal Science and Biotechnologies**, v. 43, n. 1, p. 375-378, 2010.
- CARRAO-PANIZZI, M. C.; KWANYUEN, P.; ERHAN, S. Z.; LOPES, I. O. N. Genetic variation and environmental effects on beta- conglycinin and glycinin content in Brazilian soybean cultivars. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 9, p. 1105-1114, 2008.
- CASKEY, C. D. JR.; KNAPP, FRANCES C. Method for Detecting Inadequately Heated Soybean Oil Meal. **Industrial and Engineering Chemistry, Analytical Edition**, v. 16, n. 10, p. 640-641, 1944.
- CHAMP, M. M. J. Non-nutrient bioactive substances of pulses. **British Journal of Nutrition**, v. 88, n. 3, p. 307-319, 2002.
- CHEN, M. Inducible direct plant defense against insect herbivores: A review. **Insect Science**, v. 15, n. 2, p. 101-114, 2008.
- CHOCT, M. Enzymes for the feed industry: past, present and future. **World's Poultry Science Journal**, v. 62, n. 1, p. 5-16, 2006.
- CHUBB, L. G. Anti-nutritive factors in animal feedstuffs. In: HARESTING, W. **Studies in agricultural and food science butterworths. Recent advances in animal nutrition**. Butterworths: London, 1982. p. 21- 37.
- CLEMENTE, A.; JIMENEZ, E.; MARIN-MANZANO, M. C.; RUBIO, L.A. Active Bowman-Birk inhibitors survive gastrointestinal digestion at the terminal ileum of pigs fed chickpea-based diets. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v. 88, n. 3, p. 513-521, 2008.
- COCA-SINOVA A.; VALENCIA D. G.; JIMEZ-MORENO E.; LAZARO 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, n. 12, p. 2613–2623, 2008.
- COSTA, F. G. P.; SILVA, J. H. V.; LIMA, R. C.; OLIVEIRA, C. F. S.; RODRIGUES, V. P.; PINHEIRO, S. G. Scientific progress in the production of monogastric in the first

decade of the twenty-first century. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n. 1, p.288-302, 2010.

COWIESON, A. J.; LU, H.; AJUWON, K.; KNAP, I.; ADEOLA, O. Interactive effects of dietary protein source and exogenous protease on growth performance, immune competence and jejunal health of broiler chickens. **Animal Production Science**, v. 56, n. 12, p. 2014-2022, 2016.

COWIESON, A. J.; ROOS, F. F. Bioefficacy of a mono-component protease in the diets of pigs and poultry: a meta-analysis of effect on ileal amino acid digestibility. **Journal Applied Animal Nutrition**, v. 2, n. 1, p. 13–21, 2014.

CRUEGER, W.; CRUEGER, A. Biotecnologia; manual de microbiologia industrial. Zaragoza: Acribia. 1993. p.413.

DEBASTIANI, M.; NUNES, R. V.; POZZA, P. C.; POZZA, M. S. S.; SILVA, J. D.; NUNES, C. G. V.; OELKE, C. A.; VENTURI, I. Valores energéticos do farelo de soja para galinhas poedeiras em função dos níveis de inclusão e de proteína brita na ração referência. **Archives of Veterinary Science**, v. 12, n. 2, p. 40-45, 2007.

DEI, H. K. Soybean as a feed ingredient for livestock and poultry, in: DORA KREZHOVA (Ed) Recent trends for enhancing the diversity and quality of soybean products. Rijeka: InTech, 2011. p. 215-216.

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, n. 2, p. 343-360, 2013.

FARIS, R. J.; WANG, H.; WANG, T. Improving digestibility of soy flour by reducing disulfide bonds with Thioredoxin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 16, p. 7146-7150, 2008.

FASINA, Y. O.; GARLICH, J. D.; CLASSEN, H. L.; FERKET, P. R.; HAVENSTEIN, G. B.; GRIMES, J. L.; QURESHI, M. A.; CHRISTENSEN, V. L. Response of turkey poults to soybean lectin levels typically encountered in commercial diets. effect on growth and nutrient digestibility. **Poultry Science**, v. 83, n. 9, p. 1559–1571, 2004.

FENG, J.; LIU, X.; XU, Z. R.; LU, Y. P.; LIU, Y. Y. Effect of fermented soybean meal on intestinal morphology and digestive enzyme activities in weaned piglets. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 52, n. 8, p. 1845-1850, 2007.

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

FRANCIS, G.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Antinutritional factors presente in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. **Aquaculture**, v. 199, n. 3-4, p.197-227, 2001.

FREITAS, S.; VIEIRA, C.; ANGEL, A.; FAVERO A.; MAIORKA, A. Performance and nutrient utilisation of broilers fed diets supplemented with a novel mono-component protease. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 20, n. 3, p. 322-334, 2011.

FRIEDMAN, M.; BRANDON, D. L. Nutritional and health benefits of soy proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 3, p. 425-430, 2001.

FRIKHA, M., SERRANO, M. P., VALENCIA, D. G., REBOLLAR, P. G., FICKLER, J., MATEOS, G. G. Correlation between ileal digestibility of amino acids and chemical

composition of soybean meals in 21-d old broilers. **Animal Feed Science and Technology**, v. 178, n. 1, p. 103–114, 2012.

FRU-NJI, F.; KLUENTER, A.M.; FISCHER, M.; PONTOPPIDAN, K. A feed serine protease improves broiler Performance and energy digestibility. **The Journal of Poultry Science**, v. 48, n. 10, p. 239–246, 2011.

GERBER, L. F. P.; PENZ JUNIOR, 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**, 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, n. 1, p. 70–77, 2002.

GLITSØ, V.; PONTOPPIDAN, K.; KNAP, I.; WARD, N. Catalyzing Innovation Development of a Feed Protease. **Industrial Biotechnology**, v. 8, n. 4, p. 172-175, 2012.

GRADIŠAR, H.; FRIEDRICH, J.; KRIŽAJ, I.; JERALA, R. Similarities and specificities of fungal keratinolytic proteases: Comparison of keratinases of *Paecilomyces marquandii* and *Doratomyces microsporus* to some known proteases. **Applied Environmental Microbiology**, v. 71, n. 7, p. 3420-3426, 2005.

GUILLAMÓN, E.; PEDROSA, M. M.; BURBANO, C.; CUADRADO, C.; SÁNCHEZ, M. CORTES.; MUZQUIZ, M. The trypsin inhibitors present in seed of different grain legume species and cultivar. **Food Chemistry**, v. 107, n. 1, p. 68-74, 2008.

GUPTA, R.; RAMNANI, P. Microbial keratinases and their prospective applications: An overview. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, n. 1, p. 21-33, 2006.

HAQ, S. K.; ATIF, S. M.; KHAN, R. H. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotections. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 431, n. 1, p. 145-159, 2004.

International Union of Biochemistry and Molecular Biology. Enzyme Nomenclature, Academic Press, Orlando, 1992.

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. (Eds). **Enzymes in farm animal nutrition**. 2nd ed. Wallingford: Cabi, 2010, p. 85-95.

JEZIERNY, D.; MOSENTHIN, R.; BAUER, E. The use of grain legumes as a protein source in pig nutrition: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v.157, n. 3-4, p.111–128, 2010.

JOO, H. S.; CHACG, C. S. Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grown on soybean meal: optimization and some properties. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 3, p. 1263-1270, 2005.

KAKADE, M. L., SIMONS, N., LIENER, I.E. An evaluation of natural versus synthetic substrates for measuring the antitryptic activity of soyabeans samples. **Cereal Chemistry Journal**, v. 46, p. 518-526, 1969.

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

- KHATTAK, F. M.; PASHA, T. N.; HAYAT, Z.; MAHMUD, A. Enzymes in poultry nutrition. **Journal of Animal Poultry Science**, v. 16, n. 1-2, p. 1-2, 2006.
- KIM, S. W.; VAN HEUGTEN, E.; JI, F.; LEE, C. H.; MATEO, R. D. Fermented soybean meal as a vegetable protein source of nursery pigs. I. Effects on growth performance of nursery pigs. **Journal of Animal Science**, v. 88, n. 1, p. 214-224, 2010.
- KRISHNAN, H. B. Engineering soybean for enhanced sulfur amino acid content. **Crop Science**, Madison, v. 45, n. 2, p. 454-461, 2005.
- LECZNIESKI, J. L. Considerações práticas do uso de enzimas. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE AVES E SUÍNOS, 5., 2006, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: AveSui, 2006.
- LEESON, S.; SUMMERS, J. D. Comercial Poultry Nutrition. Ontario: Nottingham University Pres., 2008, p. 413.
- LELIS, G. R.; ALBINO, L. F. T.; TAVERNARI, F. C.; SILVA, C. R.; ROSTAGNO, H. S.; GOMES, P. C.; BORSATTO, C. G. Suplementação dietética de fitase sobre o metabolismo de nutrientes de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 8, p. 1768-1773, 2010.
- LIENER, I. E. Factors affecting the nutritional quality of soya products, **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 58, n. 3, p. 406-415, 1981.
- LIENER, I. E. Implications of antinutritional components in soybean foods: Critical Reviews. **Food Science and Nutrition**, v. 34, n. 1, p. 31-67, 1994.
- LIENER, I. E. Non-nutritive factors and bioactive compounds in soy. In: Liener, I. E. **Soy in Animal Nutrition**. Savoy: Fed Animal Science Society. 2000, p.13-45.
- LIMA JÚNIOR, D. M.; MONTEIRO, P. B. S.; RANGEL, A. H. N.; MACIEL, M. V.; OLIVEIRA, S. E. O.; FREIRE, D. A. Fatores anti-nutricionais para ruminantes. **Acta veterinaria Brasilica**, v. 3, n. 4, p. 132-143, 2010.
- LIN, X.; LEE, C. G.; CASALE, E. S.; SHIH, J. C. H. Purification and characterization of a keratinase from a feather-degrading *Bacillus licheniformis* strain. **Applied Environmental Microbiology**, v. 58, n. 10, p. 3271-3275, 1992.
- LUDKE, M. C. M. M.; LIMA, G. J. M. M.; LANZMASTER, M.; ARDIGÓ, R. Soja integral processada de diferentes formas para uso em dietas para suínos em crescimento e terminação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 5, p. 1566-1572, 2007.
- MAYORGA, M. E.; VIEIRA, S. L.; KINDLEIN, L.; FURTADO, F. V. F.; MEIRA, J. A.; SORBARA, J. O. B. Efeitos de uma protease monocomponente em dietas de frangos de corte com níveis crescentes de inibidores da tripsina. **Anais...Prêmio Lamas**, 2011.
- MCDONNELL, P.; O'SHEA, C.; FIGAT, S.; O'DOHERTY, J. V. Influence of incrementally substituting dietary soya bean meal for rapeseed meal on nutrient digestibility, nitrogen excretion, growth performance and ammonia emissions from growing-finishing pigs. **Archives of Animal Nutrition**, V. 64, N. 5, P. 412-424, 2010.
- MENDES, W. S.; SILVA, I. J.; FONTES, D.O.; RODRIGUEZ, N. M.; MARINHO, P. C.; SILVA, F. O.; AROUCA, C. L. C.; SILVA, F. C. O. Composição química e valor nutritivo da soja crua e submetida a diferentes processamentos térmicos para suínos

em crescimento. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, v. 56, n. 2, p. 207-213, 2004.

MORI, A.; CAFÉ, M. B.; STRINGHINI, J. H.; LEANDRO, N. S. M.; ANDRADE, M. A. Utilização do ensaio fisiológico metabólico de digestibilidade do extrato etéreo como indicador da saúde intestinal de frangos de corte. In: Conferência Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2009, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: FACTA, 2009.

MORISSET, J. Negative control of human pancreatic secretion: physiological mechanisms and factors. **Pancreas**, v. 37, n. 1, p. 1–12, 2008.

NEWKIRK, R. Soybean. Feed industry guide, 1st edition Canadian International Grains Institute. 2010, p.48.

ODETALLAH, N. H.; WANG, J. J.; GARLICH, J. D.; SHIH, J. C. Keratinase in starter diets improves growth of broiler chicks. **Poultry Science**, v. 82, n. 4, p. 664–670, 2003.

ODETALLAH, N. H.; WANG, J. J.; GARLICH, J. D.; SHIH, J. C. H. Versazyme supplementation of broiler diets improves market growth performance. **Poultry Science**, v. 84, n. 6, p. 858-864, 2005.

OLIVEIRA, P. B.; MURAKAMI, A. E.; GARCIA, E. R.; MORAES, MACARI, M.; SCAPINELLO C. Influência de fatores antinutricionais da leucena (*Leucaena leucocephala* e *Leucaena cunningan*) e do Feijão Guandu (*Cajanus cajan*) sobre o epitélio intestinal e o desempenho de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 6, p. 1759-1769, 2000.

OLUKOSI, O. A.; COWIESON, A. J.; ADEOLA, O. Age-related influence of a cocktail of xylanase, amylase, and protease or phytase individually or in combination in broilers. **Poultry Science**, v. 86, n. 1, p. 77-86, 2007.

OXENBOLL, K.; PONTOPPIDAN, K.; FRU-NJI, F. Use of a protease in poultry feed offers promising environmental benefits. **International Journal of Poultry Science**, v. 10, n. 11, p. 842-848, 2011.

PACHECO, W. J.; STARK, C. R.; FERKET, P. R.; BRAKE, J. Effects of trypsin inhibitor and particle size of expeller-extracted soybean meal on broiler live performance and weight of gizzard and pancreas. **Poultry Science**, v. 93, n. 9, p. 2245–2252, 2014.

PALIĆ, D. V.; LEVIĆ, J. D.; SREDANOVIĆ, S. A.; ĐURAGIĆ, O. M. Quality control of fullfat soybean using urease activity: critical assessment of the method. **Acta Periodica Technologica**. v. 39, n. 1, p. 47-53, 2008.

PALOHEIMO, M.; PIIRONEN, J.; VEHEMAANPERA J. Xilanases and Cellulases as Feed Aditives. in Enzymes. In: BEDFORD, M. R.; PARTRIDGE, G.G. (Eds.), **Enzymes in farm animal nutrition** (2nd ed.). Wallingford: CABI. 2010, p. 12-53.

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, n. 1, p. 50-55, 2015.

PEEK, H. W.; VAN DER KLIS, J. D.; VERMEULEN, B.; LANDMAN, W. J. M. Dietary protease can alleviate negative effects of a coccidiosis infection on production performance in broiler chickens. **Animal Feed Science and Technology**, v. 150, n.1-2, p. 151–159, 2009.

- PERILLA, N. S.; CRUZ, M. P.; DE BELALCAZAR, F.; DIAZ, G. J. Effect of temperature of wet extrusion on the nutritional value of full-fat soya beans for broiler chickens. **British Poultry Science**, v. 38, n. 4, p. 412–416, 1997.
- PETTERSSON, D.; PONTOPPIDIN, K. Soybean meal and the potential for upgrading its feeding value by enzyme supplementation. In: PETTERSSON, D.; PONTOPPIDIN, K., **Soybean — BioActive Compounds**. Chapter 13, 2013, p. 287-307.
- PROBERT, L. Role of enzymes in increasing protein digestibility in soya bean and other oil seeds. Proceedings of AFMA Symposium, Pretoria pp.1-12, 2004.
- PUTSZAI, A.; BARDOCZ, S.; MARTÍN-CABREJAS, M. A. The mode of action of ANFs on the gastrointestinal tract and its microflora. In: MUZQUIZ, M.; HILL, G. D.; BURBANO, C. (Ed.). **Recent advances of research in antinutritional factors in legume seeds and oilseeds**. Wageningen: Academic Publishers, 2004. p. 87-100.
- RADA, V.; LICHOVNIKOVA, M.; FOLTYN, M. The effect of serine protease on broiler growth and carcass quality. **Acta fytotechnica zootechnica**, v. 7, n. 3, p. 87–89, 2014.
- RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHOPANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology and Reviews**, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.
- Ravindran, V. Feed enzymes: The science, practice, and metabolic realities. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 22, n. 3, p. 628–636, 2013.
- RIPKEN, D.; VAN DER WIELEN, N.; VAN DER MEULEN, J.; SCHUURMAN, T., WITKAMP, R. F.; HENDRIKS, H. F. J.; KOOPMANS, S. J. Cholecystokinin regulates satiation independently of the abdominal vagal nerve in a pig model of total subdiaphragmatic vagotomy. **Physiology and Behavior**, v. 139, n. 1, p.167–176, 2015.
- 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.
- ROSTAGNO, H. S.; DIONIZIO, M. A.; ALBINO, L. F. T. Perspectivas da nutrição de frangos de corte. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41., 2004, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2004. 17p.
- SHIH, J. C. H.; WANG, J. J. Keratinase technology: from feather degradation and feed additive, to prion destruction. **CAB-Reviews: Perspectives Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, v. 1, n. 42, p. 1-6, 2006..
- SILVA, M. R.; SILVA, M. A. A. P. Fatores antinutricionais: inibidores de proteases electinas. **Revista de Nutrição**, v. 13, n. 1, p. 3-9, 2000.
- SUN, P.; LI, D. F.; LI, Z. J.; DONG, B.; WANG, F.L. Effects of glycinin on IgE-mediated increase of mast cell numbers and histamine release in the small intestine. **The Journal Nutritional Biochemistry**, v. 19, n. 9, p. 627–633, 2007.
- TACON A. G. J. Fishmeal replacers: review of antinutrients within oilseeds and pulses - a limiting factor for the aquafeed green revolution? In: TACON, A. G. J.;

BASURCO B. (Ed.). **Feeding tomorrow's fish**. Zaragoza: CIHEAM-IAMZ, 1997. p. 153-182.

TU, G. Q.; YE, Y. J.; ZHANG, B.; GUO, M. J.; SUN, Y. H. Studies on the biomechanism of keratin decomposed by streptomyces. **Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis**, v. 20, n. 1, p. 1-5, 1998.

WANG, J. J.; GARLICH, J. D.; SHIH, J. C. H. Beneficial effects of versazyme, a keratinase **feed additive, on body weight, feed conversion, and breast yield of broiler chickens**. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 15, n.4 , p. 544-550, 2006.

WANG, H.; GUO, Y.; SHIH, J. C. H. Effects of dietary supplementation of keratinase on growth performance, nitrogen retention and intestinal morphology of broiler chickens fed diets with soybean and cottonseed meals. **Animal Feed Science and Technology**, v.140, n. 3-4, p. 376–384, 2008.

WARD, N. E. Quality considerations for soybean meal. American Soybean Association. Blairstown. v. 1-1996.

WILLIAMS, D. M.; RICHTER, D. S.; JUNIOR MACKENZIE, J. M.; SHIH, J. C. H. Isolation, identification and characterization of a feather-degrading bacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1509-1515, 1990.

WINDEY, K.; DE PRETER, V.; VERBEKE, K. Relevance of protein fermentation to gut health. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 56, n. 1, p. 184–196, 2012.

XAVIER-FILHO, J.; CAMPOS, F. A. P. Proteinase inhibitors. *In*: CHEEK, P. R. **Toxicants of plant origin**. Boca Raton: CRC Press, 1989. p.1-27.

YAN, F.; GARRIBAY, L.; ARCE, J.; LOPEZ-COELLO, C.; CAMACHO, D.; DISBENNET, P.; VAZQUEZ-ANON, M.; MANANGI, M.; ODETALLAH, N. H.; CARTER, S. Effects of protease supplementation on broiler performance and in vitro protein digestibility. Australian Poultry Science Symposium, p. 134-137, 2012.

YAN, F.; DIBNER, J. J.; KNIGHT, C. D.; VAZQUEZ-ANON, M. Effect of carbohydrase and protease on growth performance and gut health of young broilers fed diets containing rye, wheat, and feather meal. **Poultry Science**, v. 00, n. 00, p.1–12, 2016.

YU, B.; WU, S.T.; LIU, C.C.; GAUTHIER, R.; CHIOU, P. W. S. Effects of enzyme inclusion in a maize-soybean diet on broiler performance. **Animal Feed Science and Technology**, v. 134, n, 3-4, p. 14-16, 2007.

YU, R. J.; RAGOT, J.; BLANK, F. Keratinases: Hydrolysis of keratinous substrates by three enzymes of Trichophyton mentagrophytes. **Experimentia**, v, 28, n. 12, p. 1512-1513, 1972.

ZAGHLOUL, T. I; EMBABY, A. M.; ELMAHDY, A. R. Biodegradation of chicken feathers waste directed by *Bacillus subtilis* recombinant cells: Scaling up in a laboratory scale fermentor. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 2387-239, 2011.

ZHANG, B.; JIANG, D.D.; ZHOU, W.W.; HAO, H.K.; NIU, T.G. Isolation and characterization of a new *Bacillus* sp. 50-3 with highly alkaline keratinase activity from *Calotes versicolor* faeces. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 25, n. 4, p. 583-590, 2009.

ZHAO, Y.; QIN, G.; SUN, Z.; ZHANG, X.; BAO, N.; WANG, T.; ZHANG, B.; ZHANG, B. L.; ZHU, D.; SUN, L. Disappearance of immunoreactive glycinin and b-conglycinin in the digestive tract of piglets. **Archives of Animal Nutrition**, v. 62, n. 4, p. 322–330, 2008.

ZUO, J.; LING, B.; LONG, L.; LI, T.; LAHAYE, L.; YANG, C.; FENG, D. Effect of dietary supplementation with protease on growth performance, nutrient digestibility, intestinal morphology, digestive enzymes and gene expression of weaned piglets. **Animal Nutrition**, v. 1, n. 4, p. 276-282, 2015.

4. OBJETIVOS

4.1. GERAL

Avaliar o efeito da adição de queratinase em dietas contendo inibidores de tripsina sobre o desempenho produtivo, peso do pâncreas, rendimento e composição de carcaça e integridade intestinal de frangos de corte submetidos ou não à um modelo de desafio sanitário.

4.2. ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito da adição de queratinase em dietas contendo inibidores de tripsina sobre o desempenho produtivo, peso do pâncreas, rendimento e composição de carcaça e integridade intestinal de frangos de corte;

Avaliar o efeito da adição de queratinase em dietas contendo fatores antinutricionais sobre o desempenho produtivo, histomorfometria e integridade intestinal de frangos de corte submetidos ao desafio sanitário.

CAPÍTULO I: ADIÇÃO DE QUERATINASE EM DIETAS CONTENDO INIBIDORES DE TRIPSINA PARA FRANGOS DE CORTE

RESUMO: O trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar o efeito da adição de queratinase em dietas contendo inibidores de tripsina sobre o desempenho produtivo, peso do pâncreas, rendimento e composição de carcaça e integridade intestinal de frangos de corte. Foram alojados 1280 pintinhos machos em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 2 (com e sem a presença de soja crua em substituição a soja desativada x com e sem queratinase). A queratinase utilizada, foi incluída nas dietas específicas na dose de 250 g/tonelada. Para avaliação do desempenho zootécnico as aves e as sobras de ração foram pesadas semanalmente. Aos 21 e 42 dias de idade, o peso do pâncreas foi obtido para cálculo do peso relativo. Aos 42 dias foi realizado o rendimento de carcaça e cortes comerciais, avaliação da ocorrência de *White Striping*, resistência e elasticidade de pele e composição de carcaça. Foram coletados segmentos de duodeno, jejuno e íleo para histomorfometria e contagem de células caliciformes aos 21 e 42 dias. E nestas mesmas idades, foi realizada a avaliação macroscópica e microscópica da qualidade intestinal do íleo, através do Índice de Saúde Intestinal (ISI). Os resultados foram submetidos à análise de variância ao nível de 5% de significância utilizando-se o SAS. Na primeira semana, a suplementação da queratinase resultou em maior ganho de peso e a inclusão de soja crua em pior conversão alimentar. Aos 21 dias, a associação entre a queratinase e a soja crua, proporcionou redução no peso do pâncreas. Aves que receberam dietas contendo a queratinase apresentaram maior rendimento de carcaça. A inclusão de soja crua resultou em maior elasticidade de pele. Aos 21 dias, aves que consumiram dieta com soja crua apresentaram menor relação V:C e maior número de criptas por vilão. Além disso, a associação de soja desativada e queratinase resultou em menor área de absorção. Na avaliação da qualidade intestinal a inclusão de soja crua resultou em maior inflamação intestinal no íleo. No entanto, a utilização da queratinase proporcionou redução nos escores de ISI, indicando melhora na qualidade intestinal aos 21 dias de idade. No entanto, aos 42 dias a inclusão de queratinase resultou em maior inflamação intestinal. A enzima melhorou o desempenho zootécnico aos 7 dias e melhorou a integridade intestinal da fase inicial de criação das aves. A associação da queratinase e da soja crua resultou em redução no peso do pâncreas e menos índices de ISIS no íleo de frangos de corte.

Palavras-chave: globulinas, inflamação intestinal, pâncreas, soja crua.

ABSTRACT: The aim of this study was to assess the effect of queratinase addition in diets with trypsin inhibitors on the performance, pancreas weight, carcass yield and composition and intestinal health of broilers. 1280 male chicks were housed in a completely randomized design following a 2 x 2 factorial scheme (with and without raw soybean replacing deactivated soybean X with and without queratinase). The queratinase was added in the diets at a dose of 250 g/ton. In order to assess the performance, the birds and leftovers were weekly weighed. At 21 and 42 days of age, the pancreatic weight was obtained in order to calculate the relative weight. At 42 days, the carcass yield was performed, assessment of White Striping, skin resistance and carcass composition. Fragments of duodenum, jejunum and ileum were

collected for histomorphometry and goblet cell counting at 21 and 42 days. At these same ages, it was performed the macroscopic and microscopic evaluation of ileum, applying the morphometric index "I See Inside" (ISI). The results were submitted to analysis of variance at the 5% level of significance using SAS. In the first week, the queratinase supplementation showed higher weight gain and the raw soybean addition worst feed conversion ratio. At 21 days, the association of queratinase and raw soybean resulted in a reduction of pancreatic weight. Birds supplemented with queratinase showed higher carcass yield. The addition of raw soybean caused higher skin elasticity. At 21 days, birds that received the diet with raw soybean showed lower V:C and higher number of crypts per villi. Besides, the association of deactivated soybean and the queratinase resulted in a lower absorption area. For intestinal evaluation, the inclusion of raw soybean showed higher inflammation of the ileum. However, the use of queratinase provided a decrease of the ISI scores at 21 days, improving intestinal quality. At 42 days, the queratinase addition showed higher intestinal inflammation. The results obtained in this study indicate that the benefits of exogenous queratinase are better in the initial phase of broilers.

Key-words: globulins, intestinal inflammation, raw soybean

INTRODUÇÃO

O farelo de soja é uma fonte valiosa de proteína em dietas de frangos de corte, devido ao adequado perfil de aminoácidos e alto conteúdo de proteína bruta. Os aminoácidos do farelo de soja são altamente digeríveis, além de possuir quase todos os aminoácidos essenciais e não essenciais em boa proporção, exceto os aminoácidos sulfurados (SONG et al., 2008). No entanto, o valor nutricional do farelo de soja pode variar dependendo da presença de fatores antinutricionais, como inibidores de tripsina, proteínas alergênicas e saponinas, que interferem no consumo de ração e utilização de nutrientes (FRIKHA et al., 2012).

A glicinina e a β -conglucina são as principais globulinas da soja, que representam até 70% das globulinas totais, das quais a glicina e a β -conglucina representam aproximadamente 40% e 30%, respectivamente. Tanto a glicinina como a β -conglucina contêm ligações dissulfeto de cisteína que podem dificultar a digestão do farelo de soja (WANG et al., 2011). Mesmo após o processamento térmico, alguns desses fatores antinutricionais podem continuar presentes no farelo de soja (CLEMENTE et al., 2008).

Sendo as dietas para frangos de corte ricas em farelo de soja como substrato proteico, e que muitas vezes não sofre um tratamento térmico adequado, o conteúdo proteico é ainda passível de aumento na digestibilidade. Dessa forma, o

uso de uma queratinase pode trazer benefícios adicionais na utilização do farelo de soja pelas aves.

A adição de proteases exógenas pode representar uma ferramenta com potencial para inativação de fatores antinutricionais presentes no farelo de soja (YU et al., 2007). Além disso, a suplementação de protease exógena melhora a digestibilidade da proteína bruta e aminoácidos, com consequente redução na excreção de nitrogênio e também pode suplementar a atividade proteolítica em animais jovens, liberando peptídeos menores e facilitando a ação das enzimas endógenas (FREITAS et al., 2011; OXENBOLL et al., 2011). Não só as enzimas alimentares reduzem os custos da dieta, mas também podem melhorar o desempenho zootécnico, a integridade intestinal e as condições ambientais, com consequente melhora na capacidade digestiva e redução na umidade das excretas, que afeta negativamente a qualidade da cama (DOSKOVIĆ et al., 2013).

As queratinases são proteases robustas com ação em uma ampla gama de temperatura e de atividade de pH e são constituídas em grande parte por serino queratinases (GUPTA e RAMNANI, 2006). Segundo Brandelli (2008), as queratinases microbianas compreendem um grupo de enzimas proteolíticas com a capacidade de degradar proteínas resistentes, e que possuem ligações dissulfeto de cisteína. Dada a estrutura química da glicinina e da β -conglucina, cujas ligações são dissulfeto de cisteína, é razoável supor que a suplementação dietética com queratinase poderia melhorar a digestibilidade da proteína, com consequente melhora no desempenho zootécnico e integridade intestinal de frangos de corte. Portanto, o objetivo foi avaliar o efeito da adição de queratinase em dietas contendo inibidores de tripsina sobre o desempenho produtivo, peso do pâncreas, rendimento e composição de carcaça e integridade intestinal de frangos de corte.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Aviário Experimental da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina. Todos os procedimentos de criação dos animais e de coleta de material biológico foram aprovados pelo Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação sob o protocolo nº 28/2015. Foram utilizados 1280 pintos de corte, machos da linhagem Cobb, provenientes de matrizes de 37 semanas de idade. As aves foram distribuídas aleatoriamente em um delineamento

inteiramente ao acaso, em esquema fatorial 2 x 2 (com e sem a presença de soja crua em substituição a soja desativada x com e sem queratinase), obtendo-se 4 tratamentos com 8 repetições e 40 aves cada (11,36 aves/m²). As rações foram formuladas com a inclusão de 2% de soja integral crua em substituição a soja desativada para obter um nível elevado de fatores antinutricionais na dieta. As dietas experimentais foram compostas por:

-Dieta experimental 1: Dieta com farelo de soja (FS) + soja desativada sem inclusão de queratinase;

-Dieta experimental 2: Dieta com farelo de soja (FS) + soja crua sem inclusão de queratinase;

-Dieta experimental 3: Dieta com farelo de soja (FS) + soja desativada com inclusão de queratinase;

-Dieta experimental 4: Dieta com farelo de soja (FS) + soja crua com inclusão de queratinase;

A queratinase utilizada foi a CIBENZA® DP100 (Novus International), produzida pelo *Bacillus licheniformis*. A enzima foi incluída nas dietas específicas na dose de 250 g/tonelada. Todas as dietas foram formuladas considerando a contribuição nutricional (matriz) da queratinase (TABELA 1).

TABELA 1. COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL (%) CONSIDERADA NA FORMULAÇÃO DA ENZIMA QUERATINASE

	Inicial	Crescimento	Abate
Proteína	0,858	0,775	0,718
Energia met. (kcal/kg)	31,02	28,11	26,00
Lisina	0,043	0,038	0,035
Metionina	0,011	0,010	0,010
Met + Cys	0,027	0,025	0,023
Treonina	0,036	0,033	0,031
Arginina	0,060	0,053	0,049
Valina	0,033	0,030	0,028
Triptofano	0,013	0,011	0,010
Isoleucina	0,033	0,029	0,027
Leucina	0,068	0,062	0,058

FONTE: a autora (2017).

O programa nutricional foi dividido em três fases: inicial (1 – 21 dias de idade), crescimento (22 – 35 dias idade) e abate (35 – 42 dias de idade). As rações experimentais, a base de milho, farelo de soja e farinha de origem animal, foram

formuladas visando atender as exigências nutricionais das diferentes fases de acordo com as recomendações das agroindústrias locais (TABELA 2). As rações também foram elaboradas com pacotes enzimáticos (exceção de queratinase), melhorador do desempenho zootécnico e anticoccidiano.

TABELA 2. COMPOSIÇÃO E NÍVEIS NUTRICIONAIS CALCULADOS DAS DIETAS EXPERIMENTAIS

Ingredientes, %	Inicial	Crescimento	Abate
	(1-21 dias)	(22-35 dias)	(36-42 dias)
Milho	58,30	64,63	66,90
Farelo de soja	34,30	28,5	25,8
Óleo de soja	0,00	0,00	0,37
Farinha de carne	3,60	3,40	2,90
Soja integral	2,00	2,00	2,00
Calcário	0,45	0,34	0,37
Sal	0,35	0,37	0,38
Metionina (DL, 98%)	0,29	0,22	0,20
Lisina (L, 70%)	0,03	0,02	0,06
Treonina (L, 98%)	0,04	0,06	0,03
Bicarbonato de sódio	0,20	0,00	0,00
Cloreto de colina	0,03	0,05	0,04
Nicarbazina	0,05	0,00	0,00
Salinomicina	0,00	0,05	0,00
Enramicina	0,01	0,01	0,00
Suplemento ¹	0,30	0,30	0,30
Inerte ²	0,025	0,025	0,025
Fitase	0,01	0,01	0,01
Xilanase	0,005	0,005	0,005
α -Amilase	0,013	0,013	0,013
Total	100,00	100,00	100,00
Níveis nutricionais			
EM (Kcal/Kg)	2962,58	3054,32	3149,27
PB (%)	23,66	21,24	19,83
Cálcio (%)	0,95	0,86	0,79
Fósforo Disponível (%)	0,45	0,43	0,40
Sódio	0,24	0,19	0,18
Cloro	0,28	0,29	0,28
Potássio	0,93	0,83	0,78
Balanço eletr.	266	215	200
Lisina dig. (%)	1,15	1,00	0,94
Metionina dig. (%)	0,606	0,511	0,476
Metionina+Cistina dig (%)	0,92	0,80	0,75
Treonina dig. (%)	0,817	0,751	0,680
Triptofano dig. (%)	0,247	0,216	0,200
Leucina dig. (%)	1,781	1,639	1,555
Valina dig. (%)	0,990	0,888	0,829
Arginina dig (%)	1,46	1,29	1,19
Arginina:Lisina	1,27	1,29	1,26

FONTE: a autora (2017).

¹Vitamina A 2.750.000UI/kg; vitamina D3 700.000UI/kg; vitamina E 10.500UI/kg; vitamina K3 550mg/kg; vitamina B1 750mg/kg; vitamina B2 1.850mg/kg; vitamina B6 1.030mg/kg; vitamina B12 4,35mg/kg; niacina 11.000mg/kg; ácido pantotênico 3.670mg/kg, ácido fólico 260mg/kg; biotina 25,66mg/kg; manganês 25.670mg/kg; zinco 28.850mg/kg; ferro 18.340mg/kg; cobre 3.670mg/kg; iodo 370mg/kg; selênio 110mg/kg.

²Inerte substituído por queratinase.

Amostras de soja desativada e crua e de farelo de soja utilizadas em cada fase de alimentação foram analisadas quanto ao conteúdo de inibidores de tripsina e urease (TABELA 3). Os valores calculados de inibidores de tripsina e urease, considerando a mistura de soja (farelo de soja + soja desativada para T1 e T3 ou farelo de soja + soja crua para T2 e T4) foram, em média, 4,29 vs 5,39 mg/g de inibidor de tripsina e 0,02 vs 0,15 de urease para T1 e T3 vs T2 e T4, respectivamente.

TABELA 3. INIBIDORES DE TRIPSINA E UREASE DAS AMOSTRAS DE SOJA E FARELO DE SOJA, UTILIZADAS EM CADA FASE DE ALIMENTAÇÃO DAS AVES

	Inibidor de tripsina (mg/g)	Urease (pH)
Soja desativada - fase Inicial	2,98	0,023
Soja desativada - fase Crescimento	3,09	0,025
Soja desativada - fase Abate	3,19	0,027
Soja crua - fase Inicial	20,48	2,047
Soja crua - fase Crescimento	20,03	2,042
Soja crua - fase Abate	20,06	2,045
Farelo de soja - fase Inicial	4,33	0,014
Farelo de soja - fase Crescimento	4,51	0,016
Farelo de soja - fase Abate	4,28	0,017

FONTE: a autora (2017).

As aves foram alojadas em galpão climatizado (exaustores, placas evaporativas e aquecimento por meio de campânulas elétricas), dividido em 32 boxes, cobertos com maravalha reutilizada sobre o piso. A temperatura de conforto térmico foi mantida de acordo com a idade. O programa vacinal foi realizado no incubatório (Marek, Gumboro e Bronquite Infecciosa) e não foram repetidas estas vacinações no campo.

Semanalmente as aves foram pesadas, assim como a sobra de ração fornecida, para a avaliação do desempenho zootécnico (peso médio, ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar). A conversão alimentar foi corrigida pela mortalidade semanal das aves conforme metodologia de Sakomura e Rostagno (2007). Para análise do pâncreas, aos 21 e 42 dias de idade, 8 aves/tratamento foram pesadas e abatidas. O pâncreas foi removido e o seu peso foi expresso em relação ao peso vivo da ave.

O rendimento de carcaça e de cortes comerciais foi determinado aos 42 dias de idade das aves. Previamente, as aves foram identificadas e submetidas ao jejum

alimentar por seis horas e abatidas por atordoamento com eletricidade e posterior sangria. Foram abatidas 5 aves/unidade experimental (40 aves por tratamento, com peso vivo $\pm 2\%$ da média de peso do box) para o cálculo de rendimento de carcaça, peito, coxas, asas e gordura abdominal.

Para o cálculo de rendimento de carcaça, foi considerado o peso da carcaça eviscerada quente, sem os pés, cabeça e gordura abdominal, em relação ao peso vivo que foi obtido individualmente antes do abate das aves. Para o rendimento dos cortes nobres, foi considerado o rendimento do peito inteiro com pele e ossos, das pernas (coxa e sobrecoxa com ossos e pele), dorso e asas com pele que foi calculado em relação ao peso da carcaça eviscerada. A gordura abdominal presente ao redor da cloaca, da bolsa cloacal, moela, proventrículo e dos músculos abdominais adjacentes foi retirada conforme descrito por Smith (1993). Em seguida, foi pesada e também calculada em relação ao peso da carcaça eviscerada.

Para avaliação da ocorrência de *White Striping* (40 aves/tratamento) foi realizada primeiramente a classificação de severidade da lesão, segundo a metodologia de Kuttappan et al., (2012). Em que foram considerados sem alteração (normal), os peitos que não apresentaram estrias brancas visíveis; ocorrência moderada para peitos com estrias com espessura $<1\text{mm}$, porém visíveis na superfície muscular; e severa quando as estrias se apresentaram esbranquiçadas, paralelas à fibra muscular, com espessura $> 1\text{mm}$ e facilmente visíveis na superfície muscular.

A resistência e elasticidade de pele foram mensuradas a partir de amostras da pele da sobrecoxa de 24 aves/tratamento medindo de 4cm x 4cm (largura e comprimento). As amostras foram submetidas ao ensaio de flexão à taxa de deformação constante para material visco-elástico com auxílio de um dispositivo de fixação para teste de perfuração adaptada ao texturômetro (Modelo CT3 Texture Analyzer, Brookfield). Foi obtida a força de ruptura (kg) da pele e a elasticidade da pele (mm) que correspondeu à distância que a ponta de probe percorreu antes de atingir o pico. Os parâmetros utilizados foram: velocidade de 1 mm/s, força do disparo de 10 g e tensão de 15 mm.

Para análise de composição da carcaça, foram selecionadas 2 aves de cada repetição (16 aves/tratamento com peso vivo $\pm 2\%$ da média de peso do box), as quais foram submetidas ao jejum alimentar de 24 horas. Após o abate sem o procedimento da sangria, as aves foram depenadas e congeladas. Posteriormente, a

carcaça inteira foi moída individualmente em um moedor de carne (ECCEL-MCIE98) e realizada a homogeneização para retirada de amostras para secagem em estufa a 55°C por 72 horas. Então as amostras foram finalmente trituradas em moinho tipo faca para análise de teor de proteína, umidade e extrato etéreo.

Aos 21 e 42 dias de idade, 1 ave/repetição (8 aves/tratamento) foram sacrificadas e obtidos fragmentos de, aproximadamente, 5 cm de comprimento do duodeno, jejuno e íleo, os quais foram presos abertos longitudinalmente em placas de isopor, e lavados com soro fisiológico. As amostras foram fixadas em solução de formol tamponado e após foram emblocadas em parafina. Cada fragmento foi submetido à cortes semi-seriados de 5 µm de espessura e corados por PAS.

Para o estudo morfométrico, as imagens foram capturadas por meio da microscopia de luz (objetiva 10x), utilizando-se o sistema analisador de imagens computadorizado (ImagePro-Plus - Versão 5.2 – Média Cibernética). Neste estudo foram mensurados o comprimento e largura de 20 vilos e a profundidade e largura de 20 criptas de cada lâmina. Estas medidas morfométricas foram utilizadas para o cálculo da área da superfície de absorção da mucosa intestinal, através da fórmula proposta por Kisielinski et al. (2002).

$$\text{Área de absorção: } \frac{(LV \times AV) + (LV/2 + LC/2)^2 - (LV/2)^2}{(LV/2 + LC/2)^2}$$

Onde: LV: largura de vilo, AV: altura de vilo, LC: largura de cripta.

As mesmas lâminas foram capturadas em objetiva 40x para contagem de células caliciformes. Para a análise macroscópica do íleo foi utilizada a metodologia de Bracarense et al. (2012) modificada. No momento da coleta foi realizada a avaliação macroscópica. Para cada alteração macroscópica observada na mucosa intestinal das aves, foi atribuído um grau de severidade (GS) entre 0 e 3, sendo grau 0: sem alteração, grau 1: alteração leve, grau 2: alteração moderada e grau 3: alteração severa, de acordo com a sua importância em reduzir a capacidade funcional do órgão, ou seja, digestão e absorção de alimentos. Para cada alteração observada foram atribuídos escores de 0 a 3 conforme a intensidade da lesão, escore 0 sem lesão, escore 1 é baixa extensão (25%), escore 2 é média extensão (50%), e escore 3 é grande extensão (75%). Os valores de escores de intensidade

foram multiplicados pelo GS, estabelecendo um valor total de alterações visualizadas na mucosa de cada segmento intestinal.

Para a análise microscópica do íleo novas lâminas foram confeccionadas e corados com hematoxilina e eosina e adicionado *Alcian Blue*. Para a avaliação de intestino foi realiza a leitura em objetiva de 40 vezes em 10 vilosidades por ave, utilizando a metodologia de Kraieski et al. (2016). A análise consistiu na avaliação do ISI (Índice de Saúde Intestinal), que expressa as alterações de necropsia ou histológicas em um valor numérico a partir da fórmula $ISI = \sum (EL * FI)$, onde: \sum somatória, EL é o escore de lesão (0-3, sendo 3 o mais severo) atribuído às alterações macroscópicas e microscópicas observadas nos diferentes órgãos e FI é o Fator de Impacto pré-estabelecido (que varia de 1-3, sendo 3 o mais severo) que é atribuído a alteração de acordo com quanto ela afeta a função do órgão avaliado.

Os dados foram submetidos à análise de variância através do procedimento GLM do programa SAS (SAS Institute, 2002), ao nível de 5% de significância. Para os resultados obtidos nas análises do escore de ocorrência para *White Striping*, avaliação macroscópica e microscópica do íleo foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis ao nível de 5% de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na primeira semana de idade das aves, houve efeito ($P < 0,05$) da suplementação da queratinase sobre o ganho de peso e inclusão de soja integral sobre a conversão alimentar (TABELA 4). A suplementação da queratinase nas dietas resultou em maior ($P < 0,05$) ganho de peso de 1 a 7 dias. Segundo Fru-Nji et al. (2011), as proteases podem aumentar o grau de hidrólise das proteínas e assim aumentar a proporção de proteínas solúveis de baixo peso molecular, tornando a proteína mais disponível para absorção pelos frangos de corte. Além disso, a suplementação de proteases possibilita maior degradação de fatores antinutricionais e maior disponibilidade de aminoácidos para o crescimento e deposição muscular, proporcionando maior ganho de peso das aves.

Por outro lado, aves que receberam dietas formuladas com a soja crua apresentaram pior conversão alimentar. Tanto a glicinina como a β -conglucina, presente em elevadas proporções na soja, contêm ligações dissulfeto de cisteína que podem dificultar a digestão da proteína do farelo de soja (WANG et al., 2011).

Uma vez que este ingrediente é incluído em nível elevado nas dietas de frangos de corte, os efeitos dos fatores antinutricionais são multiplicados, resultando numa redução significativa no desempenho das aves.

TABELA 4. ÍNDICES ZOOTÉCNICOS DE FRANGOS DE CORTE RECEBENDO DIETAS COM INCLUSÃO DE SOJA CRUA EM SUBSTITUIÇÃO A SOJA DESATIVADA, SUPLEMENTADAS OU NÃO COM QUERATINASE

	PM, g	GP, g	CR, g	CA, g:g
1 – 7 dias				
FS + soja desativada	184,92	138,84	163,96	1,176 ^b
FS + soja crua	183,95	138,75	170,57	1,230 ^a
Sem queratinase	182,86	136,94 ^b	166,98	1,216
Com queratinase	186,01	140,65 ^a	167,73	1,193
CV, %	2,44	3,54	5,56	5,47
Soja (S)	0,5512	0,9552	0,0532	0,0298
Queratinase (Q)	0,0581	0,0419	0,7448	0,4092
S x Q	0,8885	0,8656	0,2499	0,1511
1 – 21 dias				
FS + soja desativada	893,59	843,33	1207,93	1,433
FS + soja crua	897,06	849,50	1213,35	1,428
Sem queratinase	893,53	843,38	1204,12	1,428
Com queratinase	897,12	849,45	1217,16	1,433
CV, %	3,23	3,39	3,13	2,41
Soja (S)	0,7367	0,5485	0,6899	0,7359
Queratinase (Q)	0,7286	0,5554	0,3398	0,6471
S x Q	0,0679	0,1142	0,7431	0,0755
1 – 42 dias				
FS + soja desativada	2753,08	2701,35	4465,77	1,671
FS + soja crua	2706,14	2655,70	4454,61	1,671
Sem queratinase	2726,78	2673,15	4447,40	1,673
Com queratinase	2732,44	2683,90	4473,49	1,668
CV, %	3,56	3,61	2,70	1,13
Soja (S)	0,1834	0,1936	0,7747	0,8435
Queratinase (Q)	0,8706	0,7561	0,5324	0,3696
S x Q	0,1572	0,1797	0,0753	0,5123

FONTE: a autora (2017). FS: Farelo de soja; PM: peso médio; GP: ganho de peso; CR: consumo de ração; CA: conversão alimentar

Apesar da influência tanto da inclusão de soja integral como da suplementação da queratinase até os 7 dias de idade das aves, nos demais períodos avaliados não houve diferença estatística ($P > 0,05$) entre os tratamentos. Durante as primeiras três semanas de idade, demonstrou-se que as atividades de

lipase, amilase e tripsina são deficientes no trato gastrointestinal de frangos imaturos. O principal fator limitante da diminuição da utilização de nutrientes durante este período foi demonstrado ser a digestão de nutrientes, em vez da absorção de nutrientes (KACZMAREK et al., 2014). Segundo Yan et al. (2012), o benefício da protease é maior na fase inicial comparado com a fase de acabamento de frangos de corte, o que sugere que o animal jovem pode ser mais responsivo a tais produtos.

Além disso, em condições de criação comercial os desafios ambientais, imunológicos e de manejo são mais intensos e frequentes em relação às condições experimentais. A suplementação de enzimas específicas como no caso da queratinase pode não ter o mesmo impacto quanto o observado em condições experimentais. Considerando que “o intestino é um órgão em estado constante de inflamação controlada”, a qualidade ambiental desfavorável, sem os recursos de manejos de limpeza e desinfecção rigorosos, e as altas densidades de criação, entre outros, representam maiores desafios e mais comumente alguns agentes patogênicos oportunamente se estabelecem e geram enfermidades gastrintestinais determinando perdas econômicas importantes.

Aos 21 dias, houve interação ($P < 0,05$) entre a inclusão de soja integral e a suplementação da queratinase para peso absoluto e relativo do pâncreas (TABELA 5). Ao desdobrar a interação (TABELA 6), pode-se observar que dietas formuladas sem a inclusão da queratinase e com a soja crua resultaram em maior peso absoluto e relativo do pâncreas. No entanto, quando utilizada a soja crua na dieta, acrescida da queratinase, o peso do pâncreas reduziu.

Este aumento no peso do pâncreas em frangos de corte alimentados sem a inclusão de queratinase e com a soja crua pode ser explicado pela presença de inibidores de protease na dieta. De acordo com Leeson e Summers (2001), a presença de inibidores de protease provoca hipertrofia pancreática e hiperplasia devido à estimulação da secreção pancreática, bem como deprime a atividade proteolítica do intestino delgado, resultando em redução da liberação de aminoácidos livres.

TABELA 5. PESOS ABSOLUTO E RELATIVO DO PÂNCREAS DE FRANGOS DE CORTE AOS 21 E 42 DIAS DE IDADE RECEBENDO DIETAS COM INCLUSÃO DE SOJA CRUA EM SUBSTITUIÇÃO A SOJA DESATIVADA, SUPLEMENTADAS OU NÃO COM QUERATINASE

	Pâncreas, g	Pâncreas, %
	21 dias	
FS + soja desativada	3,305	0,347
FS + soja crua	3,476	0,358
Sem queratinase	3,437	0,358
Com queratinase	3,335	0,346
CV, %	10,09	10,42
Soja (S)	0,2129	0,4540
Queratinase (Q)	0,3891	0,3446
S x Q	0,0184	0,0145
	42 dias	
FS + soja desativada	4,993 ^b	0,178 ^b
FS + soja crua	5,523 ^a	0,201 ^a
Sem queratinase	5,273	0,188
Com queratinase	5,243	0,191
CV, %	12,79	14,55
Soja (S)	0,0340	0,0252
Queratinase (Q)	0,9002	0,7477
S x Q	0,0663	0,3417

FONTE: a autora (2017). FS: Farelo de soja.

A redução no peso do pâncreas ($P < 0,05$) observada quando houve a suplementação de queratinase em dietas formuladas com a soja crua. A queratinase é uma protease utilizada em dietas a base de milho e farelo de soja para hidrolisar proteínas que contêm ligações de dissulfeto de cisteína, como da glicina e da β -conglucina (WANG et al., 2011), permitindo assim que os fatores antinutricionais sejam utilizados no trato gastrointestinal.

A capacidade da queratinase de hidrolisar caseína, colágeno, elastina, queratina e outras proteínas de origem animal ou vegetal já foi demonstrada *in vitro* (YU et al., 1972, GRADIŠAR et al., 2005). Uma das possíveis explicações bioquímicas que permite que a queratinase desempenhe esta função foi proposta por Tu et al. (1998). Esses autores demonstraram que a queratinase é composta por proteína dissulfeto redutase e peptídeo hidrolase. A proteína-dissulfeto redutase rompe as ligações dissulfeto de cistina presentes em algumas proteínas não digeríveis e depois a peptídeo hidrolase hidrolisa a proteína em peptídeos e aminoácidos (TU et al., 1998; GUPTA e RAMNANI, 2006).

TABELA 6. DESDOBRAMENTO DA INTERAÇÃO DE PESO ABSOLUTO E RELATIVO DO PÂNCREAS DE FRANGOS DE CORTE AOS 21 DIAS DE IDADE RECEBENDO DIETAS COM INCLUSÃO DE SOJA CRUA EM SUBSTITUIÇÃO A SOJA DESATIVADA, SUPLEMENTADAS OU NÃO COM QUERATINASE

	FS + soja desativada	FS + soja crua	Valor de P
Pâncreas, g			
Sem queratinase	3,204 ^B	3,670 ^{aA}	0,0071
Com queratinase	3,406	3,254 ^b	0,4602
Valor de P	0,2905	0,0236	
Pâncreas, %			
Sem queratinase	0,338 ^B	0,380 ^{aA}	0,0380
Com queratinase	0,358	0,333 ^b	0,1896
Valor de P	0,2919	0,0161	

FONTE: a autora (2017). FS: Farelo de soja; Médias seguidas de letras distintas maiúsculas na linha diferem entre si. Médias seguidas de letras minúsculas distintas na coluna diferem entre si.

Aos 42 dias houve efeito ($P < 0,05$) da inclusão de soja integral sobre o peso do pâncreas, independente da suplementação da queratinase (TABELA 5). Aves que receberam dietas formuladas com a soja crua apresentaram maior peso absoluto e relativo de pâncreas. Este resultado pode ser interpretado como uma resposta fisiológica aos fatores antinutricionais encontrados no conteúdo intestinal que estimulam o pâncreas a aumentar a produção de enzimas de forma compensatória.

Os inibidores de protease atuam ligando e bloqueando a atividade das enzimas proteolíticas segregadas pelo pâncreas (JEZIERNY et al., 2010). A secreção pancreática de tripsina é controlada por *feedback* negativo, isto é, quando os níveis de tripsina no intestino delgado são baixos, como é o caso da formação de um complexo entre tripsina e seu inibidor, o pâncreas é estimulado pelo hormônio colecistoquinina para produzir mais tripsina, com consequente hipertrofia do pâncreas. Além disso, o aumento da síntese de tripsina e quimotripsina aumenta a utilização de aminoácidos sulfurados, nos quais estas enzimas são baseadas (SGARBIERI, 1996).

Houve efeito ($P < 0,05$) da suplementação da queratinase sobre o rendimento de carcaça aos 42 dias de idade (TABELA 7). Aves que receberam a suplementação de queratinase apresentaram maior rendimento de carcaça, independente da inclusão da soja integral. Mesmo não apresentando efeito sobre o desempenho zootécnico na idade de abate das aves, a suplementação de queratinase pode ter proporcionado um melhor equilíbrio de disponibilidade de aminoácidos, o que resultou em maior rendimento de carcaça. Segundo Freitas et al., 2011, o melhor equilíbrio de aminoácidos digestíveis resulta em maior deposição de músculo na carcaça e em alterações na composição da mesma.

TABELA 7. RENDIMENTO DE CARÇA E CORTES COMERCIAIS DE FRANGOS DE CORTE AOS 42 DIAS DE IDADE RECEBENDO DIETAS COM INCLUSÃO DE SOJA CRUA EM SUBSTITUIÇÃO A SOJA DESATIVADA, SUPLEMENTADAS OU NÃO COM QUERATINASE

	Carça, %	Peito, %	Coxas, %	Asas, %	Gordura abdominal, %
FS + soja desativada	76,91	39,28	30,95	9,54	1,73
FS + soja crua	76,78	39,54	30,89	9,55	1,77
Sem queratinase	76,60 ^b	39,27	30,91	9,62	1,74
Com queratinase	77,09 ^a	39,53	30,93	9,46	1,75
CV, %	1,92	5,26	4,55	5,61	28,15
Soja (S)	0,5833	0,4280	0,7608	0,9262	0,6649
Queratinase (Q)	0,0405	0,4045	0,9258	0,0590	0,9122
S x Q	0,7124	0,2747	0,4356	0,7496	0,6603

FONTE: a autora (2017). FS: Farelo de soja.

Para a classificação da ocorrência de *White Striping* não houve interação ($P > 0,05$) entre a inclusão de soja crua em substituição a soja desativada e a suplementação ou não de queratinase nas dietas (TABELA 8). *White Striping* se distingue pelo aparecimento de estrias brancas paralelas às fibras musculares na superfície do músculo peitoral maior (PETRACCI e CAVANI, 2012).

A etiologia do *White Striping* é desconhecida, porém vários são os fatores que podem afetar a taxa de incidência dessa miopatia, entre eles estão o alto rendimento de peito e o maior peso das aves ao abate (KUTTAPPAN et al., 2013; PETRACCI et al., 2013). A utilização de soja desativada nas dietas para frangos de corte proporciona maior disponibilidade de proteínas e aminoácidos. No entanto, este fato não afetou o rendimento de peito, assim como a ocorrência de *White Striping*, principalmente de lesões severas.

TABELA 8. ESCORE DE CLASSIFICAÇÃO DAS LESÕES MACROSCÓPICAS DE *WHITE STRIPING* EM FRANGOS DE CORTE AOS 42 DIAS DE IDADE RECEBENDO DIETAS COM INCLUSÃO DE SOJA CRUA EM SUBSTITUIÇÃO A SOJA DESATIVADA, SUPLEMENTADAS OU NÃO COM QUERATINASE

	Normal, %	Moderada, %	Severa, %
FS + soja desativada	15,79	63,16	21,05
FS + soja crua	17,72	72,15	10,13
Sem queratinase	20,78	66,23	12,99
Com queratinase	12,82	69,23	17,95
FS + soja desativada	18,42	63,16	18,42
FS + soja crua	23,08	69,23	7,69
FS + soja desativada + Queratinase	13,16	63,16	23,68
FS + soja crua + Queratinase	12,50	75,00	12,50
CV, %	37,36	46,79	35,90
Soja (S)	0,7484	0,2326	0,0610
Queratinase (Q)	0,1863	0,6908	0,3948
S x Q	0,5622	0,6317	0,2350

FONTE: a autora (2017). FS: Farelo de soja.

Houve diferença ($P < 0,05$) entre a adição de soja desativada e crua para a elasticidade na avaliação de resistência de pele (TABELA 9). Aves que receberam dietas formuladas com a adição de soja crua em substituição a soja desativada apresentaram maior elasticidade da pele. A elastina é o principal componente de fibras elásticas encontradas principalmente no tecido conjuntivo em conjunto com colágeno e polissacarídeos. A elastina proporciona elasticidade e recuo a estes tecidos submetidos a estiramento repetido (DAAMEN et al., 2001).

A subunidade polipeptídica das fibrilas de elastina é a tropoelastina, contendo perto de 800 resíduos de aminoácidos. A tropoelastina consiste de porções de hélices ricas em resíduos de glicina separadas por regiões curtas, contendo resíduos de lisina e alanina. Esses aminoácidos são capazes de reunir as cadeias de tropoelastina em arranjos que podem ser esticados em todas as direções (DEBELLE e TAMBURRO, 1999; FAUVEL-LEFEVE, 1999). Devido a isso, era esperado maior elasticidade da pele quando se utiliza a soja desativa em relação à soja crua, devido a maior disponibilidade de proteínas e aminoácidos. No entanto, a utilização de soja crua pode ter proporcionado um balanço de aminoácidos diferente, de forma que este beneficiou a elasticidade da pele de frangos de corte.

TABELA 9. RESISTÊNCIA DE PELE DE FRANGOS DE CORTE AOS 42 DIAS DE IDADE RECEBENDO DIETAS COM INCLUSÃO DE SOJA CRUA EM SUBSTITUIÇÃO A SOJA DESATIVADA, SUPLEMENTADAS OU NÃO COM QUERATINASE

	Ruptura de pele, Kg	Elasticidade, mm
FS + soja desativada	5,16	7,17 ^b
FS + soja crua	5,68	8,02 ^a
Sem queratinase	5,24	7,68
Com queratinase	5,64	7,55
CV, %	59,44	21,55
Soja (S)	0,4502	0,0138
Queratinase (Q)	0,5574	0,6537
S x Q	0,8141	0,9209

FONTE: a autora (2017). FS: Farelo de soja.

Para composição de carcaça aos 42 dias de idade não houve diferença ($P > 0,05$) entre a adição de soja crua em substituição a soja desativada e a suplementação de queratinase nas dietas (TABELA 10). De acordo com Smith (2011), a suplementação de rações para frangos de corte com protease exógena complementa a ação de enzimas endógenas, tais como pepsina e proteases pancreáticas, aumentando a solubilidade das proteínas dos vários ingredientes alimentares.

TABELA 10. COMPOSIÇÃO DE CARÇA DE FRANGOS DE CORTE NA MATÉRIA SECA DE FRANGOS DE CORTE AOS 42 DIAS DE IDADE RECEBENDO DIETAS COM INCLUSÃO DE SOJA CRUA EM SUBSTITUIÇÃO A SOJA DESATIVADA, SUPLEMENTADAS OU NÃO COM QUERATINASE

	MS, %	PB, %	EE, %	MM, %
FS + soja desativada	29,85	54,73	30,64	8,19
FS + soja crua	29,74	54,59	30,93	8,55
Sem queratinase	29,70	55,12	30,28	8,47
Com queratinase	29,89	54,17	31,31	8,25
CV, %	3,57	6,55	10,39	9,66
Soja (S)	0,6808	0,9228	0,7333	0,0915
Queratinase (Q)	0,4742	0,3301	0,2172	0,2774
S x Q	0,3800	0,5389	0,2825	0,6060

FONTE: a autora (2017). FS: Farelo de soja; MS: matéria seca; PB: proteína bruta; EE: extrato etéreo; MM: matéria mineral.

Além disso, a suplementação de queratinase possibilita a maior degradação de fatores antinutricionais da dieta, com conseqüente aumento na disponibilidade de aminoácidos para as aves. Portanto, era esperado que a suplementação de queratinase nas dietas, além de resultar em maior rendimento de carcaça, alterasse a composição da mesma, devido a maior disponibilidade de aminoácidos.

TABELA 11. MEDIDAS MORFOMÉTRICAS DE FRANGOS DE CORTE AOS 21 DIAS DE IDADE RECEBENDO DIETAS COM INCLUSÃO DE SOJA CRUA EM SUBSTITUIÇÃO A SOJA DESATIVADA, SUPLEMENTADAS OU NÃO COM QUERATINASE

	CV, μm	LV, μm	PC, μm	LC, μm	V:C	N° C:V	Área, μm^2	Calic./mm ²
Duodeno								
FS + soja desativada	1417,0	172,52	99,84	52,96	14,17 ^a	1,44	19,99	0,73
FS + soja crua	1276,8	153,52	107,31	54,97	11,91 ^b	1,43	18,67	0,74
Sem queratinase	1301,0	146,66	105,62	53,67	12,40	1,45	19,58	0,69
Com queratinase	1403,3	181,74	101,01	54,19	13,85	1,42	19,12	0,78
CV, %	21,86	36,31	15,80	13,07	15,21	18,36	17,90	39,74
Soja (S)	0,3533	0,5698	0,3725	0,5564	0,0344	0,7733	0,4992	0,9581
Queratinase (Q)	0,5433	0,2590	0,6238	0,8461	0,2159	0,6804	0,7564	0,3900
S x Q	0,7100	0,1149	0,4386	0,0581	0,1389	0,3283	0,0062	0,9581
Jejuno								
FS + soja desativada	822,13	104,97	88,043	46,22	9,54	1,22 ^b	4,14	1,68
FS + soja crua	803,88	111,19	93,62	47,66	8,76	1,34 ^a	4,28	1,80
Sem queratinase	816,56	104,83	90,11	46,51	9,21	1,26	4,23	1,28
Com queratinase	811,14	110,48	91,08	47,22	9,16	1,30	4,21	1,08
CV, %	18,63	27,60	20,51	21,25	20,74	10,56	22,38	31,54
Soja (S)	0,7962	0,6101	0,3667	0,6990	0,2655	0,0333	0,7386	0,5415
Queratinase (Q)	0,8838	0,6025	0,9978	0,8622	0,9972	0,4866	0,9160	0,3054
S x Q	0,4522	0,6726	0,0818	0,8738	0,3732	0,6418	0,4563	0,9587
Íleo								
FS + soja desativada	509,36	120,35	85,13	47,98	6,00	1,22	9,25	1,10
FS + soja crua	467,47	118,85	85,41	46,46	5,47	1,24	8,57	1,21
Sem queratinase	521,91	116,27	85,69	46,57	6,10	1,27	9,62	1,18
Com queratinase	458,32	122,77	84,86	47,88	5,41	1,19	8,27	1,13
CV, %	22,63	15,92	18,63	13,07	16,77	9,17	20,89	25,91
Soja (S)	0,3009	0,7730	0,9719	0,4939	0,1433	0,6150	0,3263	0,3192
Queratinase (Q)	0,1431	0,3282	0,8892	0,5514	0,0699	0,0542	0,0624	0,6243
S x Q	0,1218	0,2518	0,5882	0,7766	0,1650	0,4781	0,2401	0,8244

FONTE: a autora (2017). FS: Farelo de soja; CV: comprimento de vilos; LV: largura de vilos; PC: profundidade de cripta; LC: largura de cripta; V:C relação vilos:cripta; N° C:V: relação do número de criptas por vilos; Calic: células caliciformes.

Aos 21 dias de idade, houve efeito ($P < 0,05$) da inclusão de soja integral sobre a relação vilosidade:cripta no duodeno e na relação de número de criptas por vilosidades no jejuno, independente da suplementação de queratinase (TABELA 11). A utilização de soja crua resultou em menor relação vilosidade:cripta no duodeno e maior número de criptas por vilosidade no jejuno. Este resultado é devido, provavelmente, à presença de fatores antinutricionais na dieta. De acordo com Bedford (2000), o intestino responde às mudanças e desafios colocados pela dieta alterando seu peso, comprimento, área de absorção e taxa de rotatividade celular.

As proteínas alergênicas presentes na soja são responsáveis por uma reação de hipersensibilidade que resulta na produção indesejável de anticorpos contra a soja antes que o sistema imune alcance a tolerância imunológica (FENG et al., 2007; KIM et al., 2010). Elas reduzem a absorção de nutrientes e causam efeitos deletérios sobre as vilosidades do intestino delgado, podendo provocar encurtamento das vilosidades e aumento da profundidade da cripta, evidenciando o processo de produção celular e restauração da vilosidade intestinal que indicam o comprometimento da integridade da mucosa. Além disso, as lectinas têm a capacidade de ligação a moléculas específicas na superfície da borda escova da mucosa intestinal. Isso interrompe o epitélio intestinal, reduz a altura das vilosidades, altera a atividade das enzimas da borda da escova, provoca a hipersecreção da proteína endógena e danifica os microvilos (FASINA et al., 2006).

O aumento do número de criptas por vilosidade pode ser uma resposta à agressão causada pelos fatores antinutricionais, na tentativa de restaurar rapidamente a integridade da camada epitelial. A regeneração epitelial começa a partir das criptas, de modo que uma cripta profunda é indicação de um rápido *turnover* de enterócitos e um aumento das necessidades de manutenção do tecido mucoso. A proliferação rápida de enterócitos e a taxa de renovação das células epiteliais tem grande impacto nos requerimentos de proteína e energia da mucosa do intestino delgado (PAULUS, POTTEN e LOEFFLER, 1992). A composição da dieta pode produzir alterações microscópicas na mucosa intestinal, e é possível que a alteração na morfologia do trato gastrointestinal possa estar associada aos níveis de fatores antinutricionais presentes na soja crua.

Ainda aos 21 dias, houve interação ($P < 0,05$) entre a adição de soja integral e a suplementação de queratinase sobre a área de absorção do duodeno. Desdobrando a interação (TABELA 12), pode-se observar que quando utilizada a

soja desativada nas dietas, a suplementação com queratinase resultou em menor área de absorção. Resultado semelhante foi encontrado quando as dietas foram formuladas sem a suplementação de queratinase e com a soja crua em substituição a soja desativada.

É possível que a suplementação de enzimas exógenas, particularmente em níveis elevados, interfira no desenvolvimento de órgãos digestivos e metabolismo em frangos de corte ao interagir com o trato gastrointestinal ou com o sistema enzimático digestivo (COWIESON et al., 2006). Os seus efeitos dependem de muitos fatores, tais como a idade da ave, o tipo de dieta e a relação enzima-substrato (COWIESON, 2005).

TABELA 12. DESDOBRAMENTO DA INTERAÇÃO DA ÁREA DE ABSORÇÃO DO DUODENO FRANGOS DE CORTE AOS 21 DIAS DE IDADE RECEBENDO DIETAS COM INCLUSÃO DE SOJA CRUA EM SUBSTITUIÇÃO A SOJA DESATIVADA, SUPLEMENTADAS OU NÃO COM QUERATINASE

	FS + soja desativada	FS + soja crua	Valor de P
Sem Queratinase	22,93 ^{aA}	17,18 ^B	0,0148
Com Queratinase	17,889 ^b	21,29	0,1657
Valor de P	0,0068	0,1589	

FONTE: a autora (2017). FS: Farelo de soja; Médias seguidas de letras distintas maiúsculas na linha diferem entre si. Médias seguidas de letras minúsculas distintas na coluna diferem entre si.

Outra hipótese para explicar este resultado, é devido ao fato da enzima utilizada ser uma queratinase. Esta enzima possui amplo espectro de ação. Entre os diversos substratos proteicos que a queratinase hidrolisa está a caseína, colágeno, elastina e queratina (ODETALLAH et al., 2005) e possui alta atividade proteolítica sobre as proteínas animais e vegetais (SHIH e WANG, 2006). Portanto, pode-se supor que na ausência de substrato, no caso os fatores antinutricionais da soja, a queratinase pode agir sobre o epitélio intestinal, causando encurtamento das vilosidades e aumento de profundidade de cripta, com conseqüente redução da área de absorção. Esse resultado deve ser melhor estudado e compreendido.

Aos 42 dias de idade não houve efeito ($P > 0,05$) da inclusão de soja crua em substituição a soja desativada e a suplementação de queratinase sobre as medidas morfométricas e contagem de células caliciformes dos segmentos avaliados (TABELA 13).

TABELA 13. MEDIDAS MORFOMÉTRICAS DE FRANGOS DE CORTE AOS 42 DIAS DE IDADE RECEBENDO DIETAS COM INCLUSÃO DE SOJA CRUA EM SUBSTITUIÇÃO A SOJA DESATIVADA, SUPLEMENTADAS OU NÃO COM QUERATINASE

	CV, μm	LV, μm	PC, μm	LC, μm	V:C	N° C:V	Área, μm^2	Calic., mm^2
Duodeno								
FS + soja desativada	1498,6	132,15	101,51	53,36	14,88	1,47	23,51	0,89
FS + soja crua	1447,5	125,82	105,53	55,18	13,90	1,53	22,62	0,99
Sem queratinase	1617,1	142,81	107,55	53,74	15326	1,45	24,45	0,99
Com queratinase	1425,7	124,73	101,10	54,11	14,24	1,50	22,69	0,90
CV, %	13,98	16,80	15,30	7,60	15,67	18,38	12,81	38,84
Soja (S)	0,6513	0,4031	0,8913	0,7212	0,7887	0,5193	0,2992	0,4653
Queratinase (Q)	0,2752	0,0569	0,8570	0,7829	0,4256	0,3148	0,8552	0,4637
S x Q	0,6125	0,0528	0,2655	0,5829	0,5803	0,0944	0,1777	0,8745
Jejuno								
FS + soja desativada	994,69	113,58	93,60	51,71	11,04	1,14	17,64	0,98
FS + soja crua	857,71	102,95	85,07	47,22	10,39	1,23	16,28	1,11
Sem queratinase	913,51	95,06	85,08	50,33	11,02	1,10	17,50	1,03
Com queratinase	923,25	116,19	91,47	48,51	10,45	1,25	16,48	1,06
CV, %	15,70	25,16	20,63	14,46	24,90	18,75	24,05	23,35
Soja (S)	0,0868	0,5004	0,5426	0,2447	0,4511	0,3919	0,4552	0,1748
Queratinase (Q)	0,9685	0,1368	0,4171	0,5752	0,5244	0,1480	0,5447	0,7470
S x Q	0,3390	0,8644	0,2112	0,3225	0,4404	0,5414	0,8868	0,5652
Íleo								
FS + soja desativada	483,47	106,50	80,84	48,40	6,04	1,17	9,08	1,01
FS + soja crua	483,69	103,27	85,16	46,40	5,59	1,21	9,33	0,99
Sem queratinase	532,53	112,64	88,42	50,66	6,06	1,23	9,52	1,10
Com queratinase	447,93	99,98	78,08	45,49	5,47	1,15	8,92	0,98
CV, %	25,47	14,01	18,62	13,55	18,33	18,16	19,58	28,07
Soja (S)	0,9558	0,7166	0,4829	0,6618	0,3591	0,4768	0,8391	0,8451
Queratinase (Q)	0,1592	0,0672	0,1194	0,0592	0,6281	0,2569	0,5853	0,1889
S x Q	0,8392	0,4905	0,3367	0,1743	0,6221	0,0815	0,6267	0,6115

FONTE: a autora (2017). FS: Farelo de soja; CV: comprimento de vilos; LV: largura de vilos; PC: profundidade de cripta; LC: largura de cripta; V:C: relação vilos:cripta; N° C:V: relação do número de criptas por vilos; Calic: células caliciformes.

Na avaliação macroscópica da qualidade intestinal aos 21 dias de idade, houve diferença ($P < 0,05$) para a presença de material mucoso entre os tratamentos (TABELA 14). Aves que receberam dietas formuladas com a adição de soja crua em substituição a soja desativada apresentaram maior ($P > 0,05$) escore de material mucoso em relação aos demais tratamentos. Essa alteração patológica evidencia os efeitos negativos dos fatores antinutricionais da soja crua sobre a qualidade intestinal de frangos de corte.

TABELA 14. AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DE QUALIDADE INTESTINAL DE FRANGOS DE CORTE AOS 21 E 42 DIAS DE IDADE RECEBENDO DIETAS COM INCLUSÃO DE SOJA CRUA EM SUBSTITUIÇÃO A SOJA DESATIVADA, SUPLEMENTADAS OU NÃO COM QUERATINASE

	Material Mucoso	Congestão	Petéquias
FS + soja desativada	0,00 ^b	0,69	0,50
FS + soja crua	0,44 ^a	0,69	0,75
Sem queratinase	0,44 ^a	0,75	0,87
Com queratinase	0,00 ^b	0,62	0,37
FS + soja desativada	0,00 ^b	0,62	0,50
FS + soja crua	0,87 ^a	0,87	1,25
FS + soja desativada + queratinase	0,00 ^b	0,75	0,50
FS + soja crua+ queratinase	0,00 ^b	0,50	0,25
CV, %	25,99	51,30	50,03
Soja (S)	0,0356	0,6675	0,2453
Queratinase (Q)	0,0356	0,8299	0,8633
S x Q	0,0041	0,7093	0,4352
	42 dias		
FS + soja desativada	0,25	0,19	0,56
FS + soja crua	0,12	0,25	0,94
Sem queratinase	0,25	0,19	0,75
Com queratinase	0,12	0,25	0,75
FS + soja desativada	0,00	0,25	0,25
FS + soja crua	0,50	0,12	0,87
FS + soja desativada + queratinase	0,00	0,25	0,62
FS + soja crua+ queratinase	0,25	0,25	1,25
CV, %	28,24	40,17	51,09
Soja (S)	0,5506	0,4367	0,3451
Queratinase (Q)	0,5506	0,9336	0,6815
S x Q	0,2703	0,8921	0,2432

FONTE: a autora (2017). FS: Farelo de soja. Médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis.

Ao avaliar o efeito dos fatores isoladamente, pode-se observar resultado semelhante ao anterior. Aos 21 dias de idade quando a dieta foi formulada com adição de soja crua resultou ($P < 0,05$) em maior escore de material mucoso no lúmen intestinal em relação à dieta controle. Por outro lado, a suplementação de queratinase na dieta reduziu ($P < 0,05$) escore de material mucoso na mesma idade.

Estes resultados demonstram a melhora na qualidade intestinal de aves que receberam a suplementação de queratinase.

A inflamação entérica, ocasionada pelos efeitos adversos dos fatores antinutricionais, está associada à ativação do sistema imune inato das aves, que está diretamente associada à estimulação da secreção de mucina (AYOOLA, et al., 2015). A mucina, que é secretada pelas células caliciformes, é um componente rico em proteínas da mucosa. Portanto, a utilização de queratinase com capacidade de hidrolisar os fatores antinutricionais presentes na soja, proporciona redução dos efeitos deletérios causados por estes fatores. Aos 42 dias, não foi observada interação entre os fatores, assim como efeito dos fatores isolados ($P>0,05$) sobre a avaliação macroscópica da qualidade intestinal do íleo

Na avaliação microscópica, aos 21 dias de idade houve interação ($P<0,05$) entre os fatores queratinase e a inclusão de soja integral para o valor de ISI do íleo (TABELA 15). A suplementação de queratinase em dietas formuladas com soja crua resultou em menor escore total de ISI, associado a menor infiltração inflamatória epitelial e de lâmina própria, congestão e necrose, indicando menores alterações histológicas. Este resultado demonstra a capacidade da queratinase em hidrolisar os fatores antinutricionais da soja, reduzindo os efeitos deletérios sobre a mucosa intestinal das aves. Apesar da melhora na saúde intestinal resultante da suplementação da queratinase quando as dietas foram formuladas com soja crua, o mesmo resultado não pode ser observado na morfometria do íleo aos 21 dias de idade das mesmas aves.

O trato gastrointestinal de frangos de corte saudáveis serve como uma barreira funcional para impedir a entrada de substâncias antigênicas, incluindo microrganismos, antígenos alimentares e toxinas (NISHIO e HONDA, 2012). Portanto, a avaliação do ISI mostra que a reduzida inflamação intestinal, resultante da suplementação da queratinase, está associada à melhora na integridade intestinal das aves, com consequente manutenção da função da barreira intestinal. Estes resultados concordaram com os de Yan et al. (2016), que estudaram o efeito do nível de proteína na dieta e suplementação de protease na saúde intestinal. Esses autores verificaram que a protease estava associada com uma maior eficiência de crescimento no intestino e uma inflamação sistêmica reduzida.

TABELA 15. ÍNDICE DE SAÚDE INTESTINAL (ISI) DE ÍLEO DE FRANGOS DE CORTE AOS 21 E 42 DIAS DE IDADE RECEBENDO DIETAS COM INCLUSÃO DE SOJA CRUA EM SUBSTITUIÇÃO A SOJA DESATIVADA, SUPLEMENTADAS OU NÃO COM QUERATINASE

	ELP	EE	PE	IIE	IIMLP	Calic.	Congestão	Necrose	Oocisto	Total
21 dias										
FS + soja desativada	2,25	1,08	1,05	1,19	2,25	2,03	0,91b	1,48	0	12,24
FS + soja crua	2,20	1,09	1,09	1,04	1,95	2,01	1,25a	1,18	0	11,81
Sem queratinase	2,33a	1,09	1,07	1,13	2,40a	2,03	1,57a	1,59a	0	13,20a
Com queratinase	2,13b	1,08	1,07	1,11	1,80b	2,01	0,58b	1,07b	0	10,85b
FS + soja desativada	2,30a	1,08	1,04	1,10a	2,32a	2,03	1,22b	1,69a	0	12,77a
FS + soja crua	2,35a	1,11	1,10	1,15a	2,47a	2,03	1,92a	1,50a	0	13,63a
FS + soja desativada + queratinase	2,20ab	1,09	1,06	1,29a	2,17a	2,03	0,60c	1,28ab	0	11,71b
FS + soja crua+ queratinase	2,05b	1,08	1,08	0,93b	1,42b	2,00	0,57c	0,86b	0	9,98c
CV, %	30,84	28,30	25,28	44,30	44,95	9,65	46,27	48,99	0	53,08
Soja (S)	0,3834	0,6928	0,1857	0,0321	0,0536	0,5625	0,0319	0,0883	-	0,1735
Queratinase (Q)	0,0071	0,6928	0,9900	0,5055	0,0002	0,5625	<,0001	0,0037	-	<,0001
S x Q	0,0221	0,8166	0,4699	0,0022	<,0001	0,7997	<,0001	0,0085	-	<,0001
42 dias										
FS + soja desativada	0,49	0,38	0,28	0,03	0,34	1,85	0,01	1,13	0	4,48
FS + soja crua	0,26	0,27	0,26	0,03	0,23	1,95	0,05	1,16	0	4,20
Sem queratinase	0,30	0,24b	0,20b	0,02	0,26	1,66b	0,00b	0,84b	0	3,53b
Com queratinase	0,45	0,40a	0,33a	0,04	0,30	2,13a	0,06a	1,44a	0	5,16a
FS + soja desativada	0,33	0,25b	0,18	0,00	0,41	1,35b	0,00b	0,75b	0	3,26b
FS + soja crua	0,28	0,24b	0,23	0,04	0,11	1,97ab	0,00b	0,94ab	0	3,80b
FS + soja desativada + queratinase	0,66	0,50a	0,38	0,05	0,26	2,35a	0,03ab	1,50a	0	5,71a
FS + soja crua+ queratinase	0,25	0,30b	0,29	0,03	0,34	1,92ab	0,10a	1,39a	0	4,61ab
CV, %	36,24	44,62	41,86	15,58	27,21	48,79	12,27	47,09	0	54,88
Soja (S)	0,0956	0,0827	0,7200	0,4816	0,1691	0,3916	0,1770	0,6594	-	0,6587
Queratinase (Q)	0,4420	0,0119	0,0233	0,4705	0,8292	0,0015	0,0244	0,0035	-	<,0001
S x Q	0,1617	0,0135	0,1000	0,3804	0,2594	<,0001	0,0334	0,0245	-	<,0001

FONTE: a autora (2017). FS: Farelo de soja. ELP: Espessura de lâmina própria; EE: Espessura Epitelial; PE: Proliferação de enterócitos; IIE: Infiltração inflamatória epitelial; IIMLP: Infiltração inflamatória mista de lâmina própria; Calic.: Caliciformes. Médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis.

Aos 42 dias de idade também foi possível observar interação ($P < 0,05$) entre a queratinase e a inclusão de soja integral para o valor de ISI do íleo. Aves que receberam dietas com a soja desativada e suplementadas com a queratinase apresentaram maior escore total de ISI, quando comparado aos grupos não suplementados com a queratinase. Além disso, este resultado está associado a maior espessura epitelial, quantidade de células caliciformes e necrose apical, indicando maior inflamação intestinal.

Estes resultados, relacionados aos de 21 dias de idade e ao desempenho, demonstra que a suplementação da queratinase proporciona maiores benefícios na fase inicial de criação de frangos de corte comparada à fase final. Zhao e Wang (2008) relataram que uma dieta a base de milho e farelo de soja adequadamente formulada e suplementada com um complexo enzimático melhorou o desempenho e a utilização de nutrientes em frangos de corte até certo ponto.

As enzimas exógenas, como a protease e a amilase, afetam principalmente o crescimento e a utilização de nutrientes por meio da digestão em frangos de corte jovens na fase inicial, mas esta é muito reduzida na fase de crescimento. Isto pode ser devido ao fato de que o intestino subdesenvolvido de frangos de corte jovens não podem produzir quantidades suficientes de secreções digestivas. Na fase de crescimento, no entanto, o trato digestório maduro do frango de corte pode produzir enzimas endógenas suficientes e um suprimento exógeno (por meio da alimentação) não é mais necessário.

A compreensão do modo de ação das proteases no trato gastrointestinal de aves ainda é limitada. Embora a ligação entre a atividade de protease exógena e a digestão de proteínas dietéticas seja óbvia, o sistema intestinal é complexo e os efeitos das proteases não podem ser limitados, apenas, à hidrólise de proteínas. São possíveis interações entre a digestão de outros nutrientes da dieta, bem como mudanças nas comunidades microbianas, devido a modificações na disponibilidade de proteínas facilmente acessíveis em diferentes partes do lúmen intestinal (SCOTT et al., 2013).

Os efeitos das proteases exógenas adicionadas às dietas de frangos de corte são frequentemente inconsistentes. As diferenças no tipo de proteases testadas, bem como no desenho experimental, especificamente os nutrientes da dieta de controlo negativo e a utilização de complexos enzimáticos em vez de preparações enzimáticas monocomponentes, podem explicar parcialmente os

resultados conflitantes e altamente variáveis, relatados não somente neste trabalho como na literatura (OLUKOSI, COWIESON e ADEOLA, 2007, COWIESON e RAVINDRAN, 2008, WALK et al., 2011).

CONCLUSÃO

A enzima proporcionou melhor desempenho zootécnico aos 7 dias e menor inflamação no íleo aos 21 dias, indicando melhor integridade intestinal. Portanto, a suplementação de queratinase resultou em maiores benefícios, somente, na fase inicial de criação das aves.

Dietas formuladas com a inclusão de soja crua em substituição a soja desativada, resultaram em maior peso de pâncreas, menor relação vilos:cripta e maior número de criptas por vilos e maior inflamação intestinal aos 21 dias.

A associação da queratinase e soja crua resultou em redução no peso do pâncreas e menores índices de ISI no íleo, indicando redução da inflamação intestinal. Este resultado demonstra a capacidade da queratinase em hidrolisar os fatores antinutricionais da soja, reduzindo seus efeitos deletérios sobre a mucosa intestinal das aves.

Além disso, a suplementação de queratinase resultou em maior rendimento de carcaça aos 42 dias de idade. E a adição de soja crua nas dietas em maior elasticidade de pele de frangos de corte.

REFERÊNCIAS

AYOOLA, A. A.; MALHEIROS, R. D.; GRIMES, J. L.; FERKET, P. R. Effect of dietary exogenous enzyme supplementation on enteric mucosal morphological development and adherent mucin thickness in turkeys. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 2, n. 45, p. 124-130, 2015.

BEDFORD, M. R. Exogenous enzymes in monogastric nutrition-their current value and future benefits. **Animal Feed Science and Technology**, v. 86, n. 1-2, p. 1-13, 2000.

BRACARENSE, A. P.; LUCIOLI, J.; GRENIER, B.; DROCIUNAS PACHECO, G.; MOLL, W. D.; SCHATZMAYR, G.; OSWALD, I. P. Chronic ingestion of deoxynivalenol and fumonisin, alone or in interaction, induces morphological and immunological changes in the intestine of piglets. **British Journal of Nutrition**, v. 107, n. 12, p. 1776-1786, 2012.

- BRANDELLI, A. Bacterial keratinases: useful enzymes for bioprocessing agroindustrial wastes and beyond. **Food Bioprocess Technology**, v. 1, n. 2, p. 105–116, 2008.
- CLEMENTE, A.; JIMENEZ, E.; MARIN-MANZANO, M. C.; RUBIO, L.A. Active Bowman-Birk inhibitors survive gastrointestinal digestion at the terminal ileum of pigs fed chickpea-based diets. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v. 88, n. 3, p. 513-521, 2008.
- COWIESON, A. J. Factors that affect the nutritive value of maize for broilers. **Animal Feed Science and Technology**, v. 119, n. 3-4, p. 293-305, 2005.
- COWIESON, A. J.; ACAMOVIC, T.; BERFORD, M. R. Using the precision-feeding bioassay to determine the efficacy of exogenous enzymes - a new perspective. **Animal Feed Science and Technology**, v. 129, n. 1-2, p. 149-158, 2006.
- COWIESON, A. J.; RAVINDRAN, V. Effect of exogenous enzymes in maize-based diets varying in nutrient density for young broilers: Growth performance and digestibility of energy, minerals and amino acids. **British Poultry Science**, v. 49, n. 1 p. 37–44, 2008.
- DAAMEN, W. F.; HAFMANS, T.; VEERKAMP, J. H.; KUPPEVELT, T. H. Comparison of five procedures for the purification of insoluble elastin. **Journal of Biomaterials**, v. 22, n. 14, p. 1997-2005, 2001.
- DEBELLE L.; TAMBURRO A. M. Elastin: molecular description and function. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 31, n. 2, p. 261-272, 1999.
- 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, n. 2, p. 343-360, 2013.
- FASINA, Y. O.; CLASSEN, H. L.; GARLICH, J. D.; BLACK, B. L.; FERKET, P. R.; UNI, Z.; OLKOWSKI, A. A. Response of turkey poults to soybean lectin levels typically encountered in commercial diets. 2. Effects on intestinal development and lymphoid organs. **Poultry Science**, v. 85, n. 5, p. 870–877, 2006.
- FAUVEL-LAFEVE F. Microfibrils from the arterial subendothelium. **International Review of Cytology**, v. 188, p. 1-40, 1999.
- FENG, J.; LIU, X.; XU, Z. R.; LU, Y. P.; LIU, Y. Y. Effect of fermented soybean meal on intestinal morphology and digestive enzyme activities in weaned piglets. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 52, n. 8, p. 1845-1850, 2007.
- FREITAS, S.; VIEIRA, C.; ANGEL, A.; FAVERO A.; MAIORKA, A. Performance and nutrient utilization of broilers fed diets supplemented with a novel mono-component protease. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 20, n. 3, p. 322-334, 2011.
- FRIKHA, M., SERRANO, M. P., VALENCIA, D. G., REBOLLAR, P. G., FICKLER, J., MATEOS, G. G. Correlation between ileal digestibility of amino acids and chemical composition of soybean meals in 21-d old broilers. **Animal Feed Science and Technology**, v. 178, n. 1, p. 103–114, 2012.

FRU-NJI, F.; KLUENTER, A.M.; FISCHER, M.; PONTOPPIDAN, K. A feed serine protease improves broiler Performance and energy digestibility. **The Journal of Poultry Science**, v. 48, n. 10, p. 239–246, 2011.

GRADIŠAR, H.; FRIEDRICH, J.; KRIŽAJ, I.; JERALA, R. Similarities and specificities of fungal keratinolytic proteases: Comparison of keratinases of *Paecilomyces marquandii* and *Doratomyces microsporus* to some known proteases. **Applied Environmental Microbiology**, v. 71, n. 7, p. 3420-3426, 2005.

GUPTA, R.; RAMNANI, P. Microbial keratinases and their prospective applications: An overview. **Applied Microbiololy and Biotechnology**, v. 70, n. 1, p. 21-33, 2006.

JEZIERNY, D.; MOSENTHIN, R.; BAUER, E. The use of grain legumes as a protein source in pig nutrition: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v.157, n. 3-4, p.111–128, 2010.

KACZMAREK, S. A.; ROGIEWICZ, A.; MOGIELNICKA, M.; RUTKOWSKI, A.; JONES, R. O.; SLOMINSKI, B. A. The effect of protease, amylase, and non-starch polysaccharide-degrading enzyme supplementation on nutrient utilization and growth performance of broiler chickens fed corn-soybean meal-based diets. **Poultry Science**, v. 93, n. 7, p. 1745–1753, 2014.

KIM, S. W.; VAN HEUGTEN, E.; JI, F.; LEE, C. H.; MATEO, R. D. Fermented soybean meal as a vegetable protein source of nursery pigs. I. Effects on growth performance of nursery pigs. **Journal of Animal Science**, v. 88, n. 1, p. 214-224, 2010.

KISIELINSKI, K.; WILLIS, S.; PRESCHER, A.; KLOSTERHALFEN, B.; SCHUMPELICK, V. A simple new method to calculate small intestine absorptive surface in the rat. **Clinical and Experimental Medicine**, v. 2, n. 3, p. 131-135, 2002.

KRAIESKI, A. L.; HAYASHI, R. M.; SANCHES, A.; ALMEIDA, G. C.; SANTIN, E. Effect of aflatoxin experimental ingestion and *Eimeria* vaccine challenges on intestinal histopathology and immune cellular dynamic of broilers: applying an Intestinal Health Index. *Poultry Science*. doi: 10.3382/ps/pew397. 2016.

KUTTAPPAN, V. A.; BREWER, V. B.; MAUROMOUSTAKOS, A.; MCKEE, S. R.; EMMERT, J. L.; MEULLENET, J. F.; OWENS, C. M. Estimation of factors associated with the occurrence of white striping in broiler breast fillets. **Poultry Science**, v. 92, n. 3, p. 811–819, 2013

LEESON, S., AND J. D. SUMMERS. 2001. Naturally occurring toxins relevant to poultry nutrition. Pages 544–586 in *Scott's Nutrition of the Chicken*, 4th ed. University Books, Guelph, Canada.

NISHIO, J.; HONDA, K. Immunoregulation by the gut microbiota. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 69, n. 21, p. 3635–3650, 2012.

ODETALLAH, N. H.; WANG, J. J.; GARLICH, J. D.; SHIH, J. C. H. Versazyme supplementation of broiler diets improves market growth performance. **Poultry Science**, v. 84, n. 6, p. 858-864, 2005.

OLUKOSI, O. A.; COWIESON, A. J.; ADEOLA, O. Age-related influence of a cocktail of xylanase, amylase, and protease or phytase individually and in combination in broilers. **Poultry Science**, v. 86, n. 1, p. 77–86, 2007.

- OXENBOLL, K.; PONTOPPIDAN, K.; FRU-NJI, F. Use of a protease in poultry feed offers promising environmental benefits. **International Journal of Poultry Science**, v. 10, n. 11, p. 842-848, 2011.
- PAULUS, U.; POTTEN, C. S.; LOEFFLER M. A model of the control of cellular regeneration in the intestinal crypt after perturbation based solely on local stem cell regulation. **Cell Proliferation**, v. 25, n. 6, p. :559–578, 1992.
- PETRACCI, M.; Cavani, C. Muscle growth and poultry meat quality issues. **Nutrients**, v. 4, n. 1, p. 1-12, 2012.
- PETRACCI, M.; MUDALAL, S.; BONFIGLIO, A.; CAVANI, C. Occurrence of white striping and its impact on breast meat quality in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 92, n. 6, p. 1670–1675, 2013.
- SAKOMURA, N. K.; ROSTAGNO, H. S. Métodos de pesquisa em nutrição de monogástricos. Jaboticabal: Funep, 2007, p.283.
- Science**, v. 72, n. 6, p. 1146-1150, 1993.
- SCOTT, K. P.; GRATZ, S. W.; SHERIDAN, P. O.; FLINT, H. J.; DUNCAN, S. H. The influence of diet on the gut microbiota. **Pharmacological Research**. V. 69, n. 1, p. 52–60, 2013.
- SGARBIERI, V. C. 1996. Proteínas em Alimentos Proteicos: Propriedades, Degradações, Modificações. 1ª ed. Varela: São Paulo, 1996, p. 517
- SHIH J. C. H., WANG J. J. Keratinase technology: from feather degradation and feed additive, to prion destruction. **CAB-Reviews: Perspectives Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, v. 1, n. 42, p. 1-6, 2006.
- SMITH, A. Using proteases in broiler diets: careful selection is key. **International Poultry Production**, v. 19, n. 7 p. 15-17, 2011.
- SMITH, M. O. Parts yield of broilers reared under cycling high temperatures. **Poultry**
- SONG, Y. S.; FRIAS, J.; MARTINEZ-VILLALUENGA, C.; VIDAL-VALDEVERDE, C.; DE MEJIA, E. G. Immunoreactivity reduction of soybean meal by fermentation, effect on amino acid composition and antigenicity of commercial soy products. **Food Chemistry**, v. 108, n. 2, p. 571-581, 2008.
- TU, G. Q.; YE, Y. J.; ZHANG, B.; GUO, M. J.; SUN, Y. H. Studies on the biomechanism of keratin decomposed by streptomyces. **Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis**, v. 20, n. 1, p. 1-5, 1998.
- WALK, C. L.; COWIESON, A. J.; REMUS, J. C.; NOVAK, C. L.; MCELROY, A. P. Effects of dietary enzymes on performance and intestinal goblet cell number of broilers exposed to a live coccidian oocyst vaccine. **Poultry Science**, v. 90, n. 1, p. 91–98, 2011.
- WANG, D.; PIAO, X.; ZENG, Z.; LU, T.; ZHANG, Q.; LI, P.; XUE, L.; KIM, S. Effects of keratinase on growth performance, nutrient utilization, intestinal morphology, intestinal ecology and inflammatory response of weaned piglets fed diets with different levels of crude protein. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 24, n. 12, p. 1718–1728, 2011.
- YAN, F.; DIBNER, J. J.; KNIGHT, C. D.; VAZQUEZ-ANON, M. Effect of carbohydrase and protease on growth performance and gut health of young broilers

fed diets containing rye, wheat, and feather meal. **Poultry Science**, v. 00, n. 00, p.1–12, 2016.

YAN, F.; GARRIBAY, L.; ARCE, J.; LOPEZ-COELLO, C.; CAMACHO, D.; DISBENNET, P.; VAZQUEZ-ANON, M.; MANANGI, M.; ODETALLAH, N. H.;

YU, B.; WU, S.T.; LIU, C.C.; GAUTHIER, R.; CHIOU, P. W. S. Effects of enzyme inclusion in a maize-soybean diet on broiler performance. **Animal Feed Science and Technology**, v. 134, n, 3-4, p. 14-16, 2007.

YU, R. J.; RAGOT, J.; BLANK, F. Keratinases: Hydrolysis of keratinous substrates by three enzymes of *Trichophyton mentagrophytes*. **Experimentia**, v, 28, n. 12, p. 1512-1513, 1972.

ZHAO, H., WANG, K. N. Effects of different enzyme complex supplements in corn-soybean feedstuff on growth performance and nutrient utilization of broilers. **Journal of Chongqing University**, v. 7, n. 2, p. 158-164, 2008.

CAPÍTULO II: ADIÇÃO DE QUERATINASE EM DIETAS FORMULADAS COM FARELO DE SOJA SUBPROCESSADO SOBRE O DESEMPENHO PRODUTIVO E INTEGRIDADE INTESTINAL DE FRANGOS DE CORTE SUBMETIDOS AO DESAFIO SANITÁRIO

RESUMO: Objetivou-se avaliar o efeito da adição de queratinase em dietas formuladas com farelo de soja subprocessado sobre o desempenho produtivo e integridade intestinal de frangos de corte submetidos ao desafio sanitário. 640 pintos foram alojados em gaiolas experimentais e distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 2 (com e sem queratinase e com e sem desafio experimental). As rações foram formuladas com farelo de soja subprocessado. A queratinase foi utilizada na dose de 250g/tonelada. O desafio experimental foi promovido por meio da utilização de cama descartada, associada com ocorrência de enterites inespecíficas. Ao final do período experimental (21 dias de idade) foi realizado o desempenho zootécnico das aves. Foram coletados segmentos de duodeno, jejuno e íleo para histomorfometria e contagem de células caliciformes aos 14 e 21 dias. Nestas mesmas idades, foi realizada a avaliação macroscópica e microscópica da qualidade intestinal do íleo, através do Índice de Saúde Intestinal (ISI). Os resultados foram submetidos à análise de variância ao nível de 5% de significância utilizando-se o SAS. A suplementação de queratinase e o desafio sanitário não influenciaram o desempenho das aves. Aos 14 dias de idade, aves submetidas ao desafio apresentaram maior largura de cripta e menor relação vilo:cripta. No entanto, aves que sofreram o desafio e receberam a suplementação de queratinase apresentaram maior área de absorção do jejuno. Aos 21 dias, aves que receberam dietas com a inclusão de queratinase apresentaram maior largura de vilo do jejuno. Por outro lado, o desafio sanitário resultou em maior número de células caliciformes no jejuno. Além disso, aves que receberam dietas sem a inclusão da queratinase e foram submetidas ao desafio apresentaram maior número de células caliciformes. Resultado semelhante foi observado nas aves que não foram desafiadas e receberam a suplementação de queratinase. Por outro lado, as aves receberam dietas contendo a queratinase e não sofreram o desafio apresentaram maior área de absorção. Na avaliação macroscópica da qualidade intestinal aos 14 dias, aves dos grupos submetidos ao desafio sanitário apresentaram maiores escores de alterações macroscópicas, indicando maior inflamação intestinal em relação ao grupo controle. No entanto, aos 21 dias de idade, as aves que receberam a dieta com a inclusão da queratinase e foram desafiadas apresentaram menor escore de congestão e petéquias. Na avaliação microscópica da integridade intestinal, aos 14 dias, aves dos grupos desafiados apresentaram maior escore total de ISI de íleo. Aos 21 dias, aves que receberam dietas formuladas com a queratinase e sofreram o desafio, apresentaram maior infiltração plasmática epitelial e infiltração inflamatória mista da lamina própria. No entanto, ao avaliar os grupos não desafiados, a suplementação com a queratinase resultou em menor espessura epitelial e infiltração inflamatória epitelial, indicando benefícios da queratinase sobre a qualidade intestinal de frangos de corte aos 21 dias de idade que não foram desafiados. Portanto, pode se concluir que a suplementação de queratinase e o desafio não influenciam no desempenho zootécnico. Além disso, a adição de queratinase melhora a integridade intestinal, somente, em aves que não foram desafiadas.

Palavras-chave: inflamação intestinal, microbiota, proteínas alergênicas

ABSTRACT: The aim was to evaluate the addition of queratinase in diets with subprocessed soybean meal on the performance and intestinal health of broilers submitted to sanitary challenge. 640 chicks were housed in experimental cages following a completely randomized design and a 2 x 2 factorial scheme (with and without queratinase X with and without experimental challenge). The queratinase was added in the diets at a dose of 250 g/ton. The challenge was promoted through the use of discarded bedding, associated to non-specific enteritis. At the end of the trial (21 days of age) the performance was obtained. Fragments of duodenum, jejunum and ileum were collected for histomorphometry and goblet cell counting at 14 and 21 days of age. At these same ages, it was performed the macroscopic and microscopic evaluation of ileum, applying the morphometric index "I See Inside" (ISI). The results were submitted to analysis of variance at the 5% level of significance using SAS. The queratinase supplementation and the sanitary challenge did not influence on the performance of the animals. At 14 days of age, birds submitted to the challenge showed larger crypts and lower V:C; moreover, birds that underwent the challenge and received the diet containing queratinase had higher absorption area of jejunum. At 21 days, birds that received the diets with queratinase presented larger villi of jejunum. On the other hand, the sanitary challenge showed a higher number of goblet cells in the jejunum. Besides, birds that received diets without queratinase and underwent the challenge had higher number of goblet cells. A similar result was noticed in birds that were not challenged and received queratinase supplementation. However, birds that received diets with queratinase and did not undergo the challenge had a higher absorption area. For macroscopic evaluation at 14 days, birds from the challenged group showed higher scores, which indicates higher intestinal inflammation compared to the control group. At 21 days of age, birds that received the supplementation with queratinase and underwent the challenge had a lower score of congestion and petechiae. At 14 days, birds from the challenged group showed higher ISI ileum score. At 21 days, animals that received the queratinase supplementation and underwent the challenge had greater epithelial plasma infiltration and mixed lamina inflammatory infiltration. However, when evaluating unchallenged groups, queratinase supplementation resulted in reduced epithelial thickness and epithelial inflammatory infiltration, indicating queratinase benefits on the intestinal quality of broiler chickens at 21 days of age that were not challenged.

Key words: allergenic proteins, intestinal inflammation, microbiota

INTRODUÇÃO

O farelo de soja é considerado a melhor fonte de proteína vegetal para compor as dietas de aves e suínos, devido à sua composição nutricional, principalmente pelo alto teor proteico, adequado perfil e digestibilidade dos aminoácidos (RAVINDRAN, et al., 2013). Contudo, o farelo de soja pode possuir elevada concentração de fatores antinutricionais, que diminuem o seu valor nutritivo (MEHRI et al., 2010).

Dentre os fatores antinutricionais da soja mais relevantes ao desenvolvimento e desempenho de animais não ruminantes estão os α -galactosídeos (rafinose, estaquiase e verbascose) e os fatores antigênicos (glicinina e β -conglucina), qualificados como fatores antinutricionais termoestáveis (JANKOWSKI et al., 2009). Aproximadamente 60% das proteínas de reserva das sementes de soja são representadas pela glicinina e a β -conglucina (CARRÃO-PANIZZI et al., 2008).

Nas aves, estas proteínas provocam reações de hipersensibilidade, comprometendo a integridade da mucosa intestinal e a relação entre a altura de vilo e profundidade de cripta, com produção de anticorpos que impedem o desenvolvimento da microbiota intestinal, afetando o desempenho dos animais. A presença destes fatores ativos na dieta implica na redução no consumo da ração, comprometimento da digestão, da absorção de nitrogênio e da utilização dos nutrientes da dieta (FENG et al., 2007; KIM et al., 2010).

A adição de proteases exógenas pode representar uma ferramenta com potencial para inativação destes fatores antinutricionais presentes no farelo de soja em dietas de frangos de corte (BARLETTA, 2010). A queratinase é uma protease que possui capacidade de hidrolisar proteínas que contêm ligações de dissulfeto de cisteína, como, por exemplo, a glicina e a β -conglucina (WANG et al., 2011). Embora a finalidade original da suplementação dietética de queratinase era melhorar a digestibilidade da farinha de penas, posteriormente verificou-se que esta enzima melhora o desempenho, a utilização de aminoácidos, assim como a estrutura e a saúde do trato gastrointestinal em frangos de corte alimentados com dietas à base de milho e farelo de soja (WANG et al., 2011).

A compreensão do modo de ação das proteases no trato gastrointestinal de aves ainda é limitada. Embora a ligação entre a atividade de protease exógena e a digestão de proteínas dietéticas seja óbvia, o sistema intestinal é complexo e os efeitos das proteases não podem ser limitados, apenas, à hidrólise de proteínas. São possíveis interações entre a digestão de outros nutrientes da dieta, bem como mudanças na comunidade microbiana, devido a modificações na disponibilidade de proteínas facilmente acessíveis em diferentes partes do lúmen intestinal (SCOTT et al., 2013).

Neste sentido, o objetivo foi avaliar o efeito da adição de queratinase em dietas formuladas com farelo de soja subprocessado sobre o desempenho produtivo e integridade intestinal de frangos de corte submetidos ao desafio sanitário.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em gaiolas no biotério experimental da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina. Todos os procedimentos de criação dos animais e de coleta de material biológico foram aprovados pelo Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação sob o protocolo nº 28/2015. Foram utilizados 640 pintos machos de 1 dia de idade, da linhagem Cobb, provenientes de matrizes de 37 semanas de idade. As aves foram distribuídas em um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 2 (com e sem queratinase e com e sem desafio experimental), obtendo-se 4 tratamentos com 16 repetições e 10 aves por unidade experimental. As rações foram formuladas com farelo de soja subprocessado, com atividade ureática de 0,12 (pH). As dietas experimentais foram compostas por:

- Dieta experimental 1: Dieta controle e sem desafio;
- Dieta experimental 2: Dieta com inclusão de queratinase e sem desafio;
- Dieta experimental 3: Dieta controle e com desafio;
- Dieta experimental 4: Dieta com inclusão de queratinase e com desafio;

A queratinase utilizada foi a CIBENZA® DP100 (Novus International), produzida pelo *Bacillus licheniformis*. A enzima foi incluída nas dietas específicas na dose de 250 g/tonelada. Todos os tratamentos foram formulados considerando a contribuição nutricional (matriz) da queratinase (TABELA 1).

TABELA 1. COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL (%) CONSIDERADA NA FORMULAÇÃO DA ENZIMA QUERATINASE

	Inicial
Proteína	0,851
Energia met. (kcal/kg)	30,89
Lisina	0,043
Metionina	0,011
Met + Cys	0,027
Treonina	0,036
Arginina	0,060
Valina	0,033
Triptofano	0,013
Isoleucina	0,033
Leucina	0,067

FONTE: a autora (2017).

As dietas experimentais, a base de milho, farelo de soja e farinha de origem animal, foram formuladas visando atender as exigências nutricionais de frangos de corte de 1 a 21 dias, de acordo com as recomendações das agroindústrias locais (TABELA 2). As rações também foram elaboradas com pacotes enzimáticos (exceção de queratinase), melhorador do desempenho zootécnico e anticoccidiano.

TABELA 2. COMPOSIÇÃO E NÍVEIS NUTRICIONAIS CALCULADOS DAS DIETAS EXPERIMENTAIS

Ingredientes, %	Inicial (1-21 dias)
Milho	58,79
Farelo de soja	35,79
Farinha de carne	3,60
Calcário	0,46
Sal	0,36
Metionina (DL, 98%)	0,29
Lisina (L, 70%)	0,03
Treonina (L, 98%)	0,04
Bicarbonato de sódio	0,20
Cloreto de colina	0,03
Nicarbazina	0,05
Salinomicina	0,00
Enramicina	0,01
Suplemento ¹	0,30
Inerte ²	0,025
Fitase	0,01
Xilanase	0,005
α -Amilase	0,013
Total	100,00
Níveis nutricionais	
EM (Kcal/Kg)	2945,23
PB (%)	23,66
Cálcio (%)	0,95
Fósforo Disponível (%)	0,45
Lisina dig. (%)	1,15
Arginina dig (%)	1,46
Metionina+Cistina dig (%)	0,92
Arginina:Lisina	1,27

FONTE: a autora (2017).

¹Vitamina A 2.750.000UI/kg; vitamina D3 700.000UI/kg; vitamina E 10.500UI/kg; vitamina K3 550mg/kg; vitamina B1 750mg/kg; vitamina B2 1.850mg/kg; vitamina B6 1.030mg/kg; vitamina B12 4,35mg/kg; niacina 11.000mg/kg; ácido pantotênico 3.670mg/kg, ácido fólico 260mg/kg; biotina 25,66mg/kg; manganês 25.670mg/kg; zinco 28.850mg/kg; ferro 18.340mg/kg; cobre 3.670mg/kg; iodo 370mg/kg; selênio 110mg/kg.

²Inerte substituído por queratinase.

O ambiente de criação das aves consistia em uma sala climatizada (ar condicionado e exaustores) com 8 baterias de gaiolas, cada uma composta por 8 gaiolas (0,55 x 0,80m), totalizando 64 unidades experimentais. A temperatura de conforto térmico das aves foi regulada de acordo com a idade das aves. Água e

ração foram fornecidas *ad libitum* durante todo o período do ensaio. O programa vacinal foi realizado no incubatório (Marek, Gumboro e Bronquite).

O desafio experimental foi promovido por meio da utilização de cama descartada de um aviário comercial, associada com ocorrência de enterites inespecíficas. Nas demais gaiolas foi utilizada maravalha nova. O manejo das aves era iniciado pelas aves do grupo controle e em seguida eram manejadas as aves desafiadas procurando evitar a contaminação entre os grupos.

Para avaliação do desempenho produtivo (peso médio, ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar), as aves e as sobras de ração de cada unidade experimental foram pesadas ao final do período de experimento (21 dias de idade das aves). A conversão alimentar foi corrigida pela mortalidade semanal das aves conforme metodologia descrita por Sakomura e Rostagno (2007).

Aos 14 e 21 dias de idade, uma ave/repetição (16 aves/tratamento) foram sacrificadas e obtidos fragmentos de aproximadamente 5 cm de comprimento do duodeno, jejuno e íleo, os quais foram presos e abertos longitudinalmente em placas de isopor, e lavados com soro fisiológico. As amostras foram fixadas em solução de formol tamponado e, posteriormente, foram emblocadas em parafina. Cada fragmento foi submetido à cortes semi-seriados de 5 µm de espessura e corados por PAS.

Para o estudo morfométrico, as imagens foram capturadas por meio da microscopia de luz (objetiva 10x), utilizando-se o sistema analisador de imagens computadorizado (ImagePro-Plus - Versão 5.2 – Média Cibernética). Neste estudo foram mensurados o comprimento e largura de 20 vilos e a profundidade e largura de 20 criptas de cada lâmina. Estas medidas morfométricas foram utilizadas para o cálculo da área da superfície de absorção da mucosa intestinal, através da fórmula proposta por Kisielinski et al. (2002).

$$\text{Área de absorção: } \frac{(LV \times AV) + (LV/2 + LC/2)^2 - (LV/2)^2}{(LV/2 + LC/2)^2}$$

Onde: LV: largura de vilo, AV: altura de vilo, LC: largura de cripta.

As mesmas lâminas foram capturadas em objetiva 40x para contagem de células caliciformes. Para a análise macroscópica do íleo foi utilizada a metodologia de Bracarense et al. (2012) modificada. No momento da coleta foi realizada a

avaliação macroscópica. Para cada alteração macroscópica observada na mucosa intestinal das aves, foi atribuído um grau de severidade (GS) entre 0 e 3, sendo grau 0: sem alteração, grau 1: alteração leve, grau 2: alteração moderada e grau 3: alteração severa, de acordo com a sua importância em reduzir a capacidade funcional do órgão, ou seja, digestão e absorção de alimentos. Para cada alteração observada foram atribuídos escores de 0 a 3 conforme a intensidade da lesão, escore 0 sem lesão, escore 1 é baixa extensão (25%), escore 2 é média extensão (50%), e escore 3 é grande extensão (75%). Os valores de escores de intensidade foram multiplicados pelo GS, estabelecendo um valor total de alterações visualizadas na mucosa.

Para a análise microscópica do íleo novas lâminas foram confeccionadas e corados com hematoxilina e eosina e adicionado Alcian Blue. Foi realizada a leitura em objetiva de 40 vezes em 10 vilosidades por ave. A análise consistiu na avaliação do ISI (Índice de Saúde Intestinal), que expressa as alterações de necropsia ou histológicas em um valor numérico a partir da fórmula $ISI = \sum (EL * FI)$, onde: \sum somatória, EL é o escore de lesão (0-3, sendo 3 o mais severo) atribuído às alterações macroscópicas e microscópicas observadas nos diferentes órgãos e FI é o Fator de Impacto pré-estabelecido (que varia de 1-3, sendo 3 o mais severo) que é atribuído a alteração de acordo com quanto ela afeta a função do órgão avaliado. O ISI varia de 0-54 na microscopia de intestino delgado, sendo que quanto maior o valor numérico indica maiores alterações histológicas (KRAIESKI et al., 2016).

Os dados foram submetidos à análise de variância através do procedimento GLM do programa SAS (SAS Institute, 2002), ao nível de 5% de significância. Para os resultados obtidos nas análises macroscópica e microscópica de qualidade intestinal foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A suplementação, com queratinase, de dieta elaborada com farelo de soja subprocessado para frangos de corte de 1 a 21 dias submetidos ou não ao desafio sanitário não influenciou ($P > 0,05$) o desempenho produtivo (TABELA 3). O principal objetivo do uso de proteases exógenas é a redução de proteína bruta da dieta sem alteração no desempenho zootécnico das aves (YU et al., 2007). Portanto, o efeito benéfico da suplementação enzimática se torna limitado quando são adicionadas

acima das exigências de aminoácidos de frangos de corte. Toledo et al. (2007) testaram um complexo enzimático em dietas de diferentes densidades nutricionais e obtiveram melhora significativa apenas em dietas com níveis nutricionais reduzidos.

TABELA 3. ÍNDICES ZOOTÉCNICOS DE FRANGOS DE CORTE AOS 21 DIAS DE IDADE, RECEBENDO DIETAS SUPLEMENTADAS OU NÃO COM QUERATINASE E SUBMETIDOS OU NÃO AO DESAFIO SANITÁRIO

	Peso vivo, g	Ganho de peso, g	Consumo de ração, g	Conversão alimentar
Sem queratinase	722,91	639,61	964,34	1,510
Com queratinase	706,15	625,33	952,58	1,525
Sem desafio	720,71	635,63	964,56	1,519
Com desafio	708,35	629,31	952,36	1,515
CV, %	5,89	6,89	6,24	4,82
Queratinase (Q)	0,1167	0,1951	0,4349	0,3993
Desafio (D)	0,2459	0,5644	0,4181	0,8343
Q x D	0,0992	0,1977	0,3388	0,5466

FONTE: a autora (2017).

A avaliação do desempenho somente no final do período experimental, provavelmente, possibilitou que as aves se recuperassem do desafio imposto. Desta forma também não se pode observar diferença no desempenho entre o grupo desafiado e não. Em condições experimentais, essa recuperação pode ser observada, entretanto, em condições de criação comercial, os desafios ambientais, imunológicos e de manejo são mais intensos e frequentes permitindo que após um episódio, como de coccidiose, alguns agentes patogênicos oportunamente se estabeleçam e gerem enfermidades intestinais determinando perdas econômicas importantes. Além disso, a utilização de promotor de crescimento e anticoccidiano em todas as dietas pode ter minimizado os efeitos benéficos da queratinase avaliada.

Apesar de não ter refletido em pior desempenho produtivo, o desafio resultou em perturbação da proliferação celular na mucosa intestinal aos 14 dias (TABELA 4). Aves submetidas ao desafio apresentaram maior ($P=0,0510$) largura de cripta e menor relação vilo:cripta no duodeno.

Em resposta a uma agressão ocorre um processo denominado de restituição, que é mediado por células epiteliais que revestem a margem da zona epitelial danificada. Estas células têm como função migrar e revestir a área danificada, de modo a restaurar rapidamente a integridade da camada epitelial. Em seguida, a cripta alonga-se para permitir o aumento da proliferação da população de células progenitoras. Essa resposta de "cripta intestinal", segundo Okamoto (2011)

permite que o tecido epitelial restaure o número de células epiteliais para reconstruir sua estrutura.

Ainda aos 14 dias de idade houve interação ($P < 0,05$) entre a suplementação de queratinase e o desafio experimental para a área de absorção do jejuno. Ao desdobrar a interação (TABELA 5), pode se observar que quando as aves foram submetidas ao desafio e receberam a suplementação de queratinase apresentaram maior área de absorção. Este resultado demonstra a capacidade da queratinase em melhorar a qualidade intestinal de frangos de corte desafiados, direta ou indiretamente.

TABELA 4. MEDIDAS MORFOMÉTRICAS DE FRANGOS DE CORTE AOS 14 DIAS DE IDADE, RECEBENDO DIETAS SUPLEMENTADAS OU NÃO COM QUERATINASE E SUBMETIDOS OU NÃO AO DESAFIO SANITÁRIO

	CV, μm	LV, μm	PC, μm	LC, μm	V:C	N° C:V	Área, μm^2	Calic./mm ²
Duodeno								
Sem queratinase	1214,68	142,00	97,88	49,38	12,56	1,31	19,33	1,11
Com queratinase	1213,48	147,19	94,32	48,49	12,99	1,27	19,06	1,03
Sem desafio	1223,93	144,98	92,65	47,27 ^b	13,34 ^a	1,25	19,62	1,01
Com desafio	1205,06	144,04	92,41	50,51 ^a	12,23 ^b	1,33	18,81	1,12
CV, %	13,86	13,61	13,76	9,80	14,77	14,42	12,49	20,11
Queratinase (Q)	0,9746	0,3276	0,3722	0,5285	0,4550	0,4376	0,6564	0,1515
Desafio (D)	0,7061	0,8074	0,0895	0,0251	0,0510	0,1241	0,2727	0,0620
Q x D	0,8500	0,0703	0,4662	0,7156	0,4284	0,2621	0,1784	0,0947
Jejuno								
Sem queratinase	546,28	113,21	83,76	50,41	6,76	1,40	9,95	1,27
Com queratinase	573,92	110,14	81,65	46,81	7,03	1,49	10,32	1,27
Sem desafio	548,31	109,33	81,14	48,57	6,99	1,39	10,06	1,26
Com desafio	571,05	113,83	84,25	48,71	6,80	1,49	10,19	1,28
CV, %	20,60	11,92	17,74	14,35	15,49	24,50	14,96	17,32
Queratinase (Q)	0,3563	0,5032	0,6259	0,0655	0,3681	0,3440	0,3857	0,9896
Desafio (D)	0,4332	0,2508	0,4531	0,9575	0,5425	0,3033	0,6532	0,6667
Q x D	0,9039	0,0895	0,9921	0,1243	0,6313	0,5340	0,0424	0,8048
Íleo								
Sem queratinase	355,39	102,65	72,81	44,61	4,90	1,13	7,24	1,48
Com queratinase	372,58	103,48	77,43	45,12	4,87	1,18	7,49	1,69
Sem desafio	361,25	103,20	73,65	44,26	4,95	1,15	7,39	1,63
Com desafio	369,30	102,99	77,45	45,66	4,79	1,16	7,38	1,55
CV, %	24,24	11,66	18,43	12,91	20,04	17,18	21,57	25,46
Queratinase (Q)	0,4632	0,7776	0,2666	0,8676	0,9948	0,5279	0,5297	0,0604
Desafio (D)	0,8598	0,9065	0,4130	0,3745	0,5186	0,8200	0,8877	0,4586
Q x D	0,4533	0,7344	0,7416	0,4956	0,5509	0,1030	0,4222	0,2616

FONTE: a autora (2017). CV: comprimento de vilos; LV: largura de vilos; PC: profundidade de cripta; LC: largura de cripta; V:C: relação vilos:cripta; N° C:V: relação do número de criptas por vilos; Calic: células caliciformes.

A microbiota intestinal pode afetar a morfologia intestinal das aves. Tais alterações morfológicas não são, provavelmente, um efeito direto de enzimas, mas um efeito indireto através da manipulação da população microbiana do intestino. Mudança da morfologia intestinal também pode ser um resultado de infecções causadas por patógenos entéricos. Segundo Golder et al. (2011), aves desafiadas com *Eimeria* ou *C. Perfringens* apresentam encurtamento das vilosidades e menor relação vilo:cripta. Fasina et al. (2010) também demonstraram que aves não desafiadas possuem maior comprimento de vilo, área de absorção e relação vilo:cripta em relação a aves desafiadas com *Salmonella Typhimurium*.

TABELA 5. DESDOBRAMENTO DA INTERAÇÃO DA ÁREA DE ABSORÇÃO (μm^2) DO JEJUNO DE FRANGOS DE CORTE AOS 21 DIAS DE IDADE, RECEBENDO DIETAS SUPLEMENTADAS OU NÃO COM QUERATINASE E SUBMETIDOS OU NÃO AO DESAFIO SANITÁRIO.

	Sem queratinase	Com queratinase	Valor de P
Sem desafio	10,31	9,81	0,4200
Com desafio	9,64 ^B	10,88 ^A	0,0387
Valor de P	0,2377	0,1023	

FONTE: a autora (2017). Médias seguidas de letras distintas maiúsculas na linha diferem entre si.

Aos 21 dias, aves que receberam a suplementação de queratinase apresentaram maior ($P < 0,05$) largura de vilo do jejuno (TABELA 6). A morfologia intestinal é um dos principais indicadores da integridade intestinal em frangos de corte. Este resultado sugere a capacidade da queratinase em hidrolisar fatores antinutricionais presentes no farelo de soja subprocessado. A glicinina e a β -conglucina são as principais globulinas da soja (WANG et al., 2011). As proteínas alergênicas causam reações de hipersensibilidade, comprometendo a integridade da mucosa intestinal e a relação entre a altura de vilo e profundidade de cripta, com produção de anticorpos que impedem o desenvolvimento da microbiota intestinal (FENG et al., 2007; KIM et al., 2010).

TABELA 6. MEDIDAS MORFOMÉTRICAS DE FRANGOS DE CORTE AOS 21 DIAS DE IDADE, RECEBENDO DIETAS SUPLEMENTADAS OU NÃO COM QUERATINASE E SUBMETIDOS OU NÃO AO DESAFIO SANITÁRIO

	CV, μm	LV, μm	PC, μm	LC, μm	V:C	N° C:V	Área, μm^2	Calic./mm ²
Duodeno								
Sem queratinase	1369,69	162,67	92,99	48,52	15,03	1,34	20,58	0,89
Com queratinase	1370,32	163,79	89,01	45,73	15,56	1,39	21,03	0,97
Sem desafio	1332,58	158,39	90,66	46,70	14,88	1,38	20,62	0,90
Com desafio	1413,47	168,96	91,08	47,40	15,81	1,36	21,05	0,96
CV, %	12,61	23,92	13,92	13,28	17,18	15,88	14,66	24,79
Queratinase (Q)	0,9697	0,9070	0,2286	0,1011	0,4531	0,5145	0,6438	0,2003
Desafio (D)	0,0974	0,3573	0,8137	0,6200	0,2385	0,8777	0,5858	0,4479
Q x D	0,7911	0,4999	0,4236	0,8068	0,3467	0,0523	0,5263	0,0128
Jejuno								
Sem queratinase	644,65	109,28b	74,93	44,64	8,69	1,19	12,55	1,63
Com queratinase	737,22	121,76a	81,77	44,80	8,55	1,25	13,26	1,66
Sem desafio	664,93	110,27	76,89	43,59	8,46	1,20	12,87	1,51b
Com desafio	711,73	119,71	79,36	45,63	8,76	1,25	12,93	1,74a
CV, %	25,79	18,02	20,11	14,62	19,09	10,36	22,11	22,57
Queratinase (Q)	0,0598	0,0450	0,0940	0,7794	0,6928	0,1037	0,3637	0,9344
Desafio (D)	0,3422	0,1041	0,6175	0,2584	0,5157	0,1827	0,9410	0,0238
Q x D	0,7953	0,2423	0,2541	0,0874	0,3421	0,6294	0,9502	0,1340
Íleo								
Sem queratinase	442,75	105,08	74,96	44,22	5,86	1,11	8,86	2,33
Com queratinase	441,98	107,43	78,10	44,03	5,81	1,12	8,99	2,32
Sem desafio	464,85	106,17	79,37	44,89	6,01	1,10	9,40	2,33
Com desafio	423,46	106,47	74,23	43,44	5,69	1,12	8,51	2,33
CV, %	22,02	13,74	13,68	10,79	16,42	10,38	20,13	19,99
Queratinase (Q)	0,8058	0,5992	0,2360	0,9449	0,9832	0,8100	0,6449	0,9059
Desafio (D)	0,1744	0,9824	0,1036	0,3081	0,3101	0,6323	0,1187	0,9917
Q x D	0,0632	0,7903	0,1817	0,9316	0,0606	0,4582	0,0336	0,1792

FONTE: a autora (2017). CV: comprimento de vilos; LV: largura de vilos; PC: profundidade de cripta; LC: largura de cripta; V:C: relação vilos:cripta; N° C:V: relação do número de criptas por vilos; Calic: células caliciformes.

Tanto a glicinina como a β -conglucina contêm ligações dissulfeto de cisteína que podem impedir a digestão do farelo de soja (WANG et al., 2011). A queratinase possui capacidade de hidrolisar as ligações dissulfeto de cisteína das proteínas alergênicas, o que pode ter reduzido os efeitos deletérios dessas proteínas alergênicas sobre a mucosa intestinal. Uma das possíveis explicações bioquímicas sobre a capacidade da queratinase em hidrolisar um amplo espectro de proteínas foi proposta por Tu et al. (1998). Esses autores demonstraram que a queratinase é composta por proteína dissulfeto redutase e peptídeo hidrolase. A proteína-dissulfeto redutase rompe as ligações dissulfeto de cistina presentes em algumas proteínas não digeríveis e depois a peptídeo hidrolase hidrolisa a proteína em peptídeos e aminoácidos (TU et al., 1998; GUPTA e RAMNANI, 2006).

O aumento da largura das vilosidades do jejuno pode ser um fator contribuinte. O epitélio absorvente das vilosidades desempenha um papel significativo na fase final de assimilação de nutrientes (WANG e PENG, 2008). A maturação do intestino delgado é essencial para otimizar o crescimento dos frangos de corte, já que as taxas de digestão e absorção são diretamente influenciadas pelas taxas de proliferação e diferenciação celular, quanto maior a vilosidade e a densidade, maior é a área de superfície para digestão e absorção (BOLELI et al., 2002).

Além disso, aves que foram submetidas ao desafio sanitário apresentaram ($P < 0,05$) maior número de células caliciformes no jejuno. A superfície interna do intestino é coberta por um gel liquefeito de muco que se forma a partir de glicoproteína de mucina secretada pelas células caliciformes (FORDER et al., 2012). Esta camada de mucina consiste em uma camada externa em que os microrganismos podem colonizar e uma camada compacta interna que repele a maioria das bactérias (HANSSON e JOHANSSON, 2010). Como componente do sistema imune inato da mucosa intestinal, a camada de muco impede que os microrganismos intestinais penetrem no epitélio intestinal e serve como a primeira linha de defesa contra infecções (BRISBIN, CONG e SHARI, 2008).

Ainda aos 21 dias de idade, houve interação ($P < 0,05$) entre a suplementação de queratinase e o desafio sanitário para a contagem de células caliciformes do duodeno e a área de absorção do íleo (TABELA 7). Ao desdobrar a interação pode-se observar que aves que receberam dietas sem a inclusão da queratinase e foram submetidas ao desafio apresentaram maior número de células

caliciformes. Resultado semelhante pode ser observado nas aves que não foram desafiadas e receberam a suplementação com aqueratinase. Peek et al. (2009) demonstraram que a queratinase de *Bacillus licheniformis* aumentou o ganho de peso corporal de frangos de corte desafiados com três espécies de *Eimeria* e sugeriram que o mecanismo era a redução na ligação de parasitas à camada de muco. Isto foi suportado pelo aumento na espessura da camada de muco aderente do intestino devido à queratinase.

TABELA 7. DESDOBRAMENTO DA INTERAÇÃO DA CONTAGEM DE CÉLULAS CALICIFORMES DO DUODENO E DA ÁREA DE ABSORÇÃO DO ÍLEO DE FRANGOS DE CORTE AOS 21 DIAS DE IDADE, RECEBENDO DIETAS SUPLEMENTADAS OU NÃO COM QUERATINASE E SUBMETIDOS OU NÃO AO DESAFIO SANITÁRIO

	Sem queratinase	Com queratinase	Valor de P
Caliciformes/mm ² - Duodeno			
Sem desafio	0,78 ^{Bb}	1,03 ^A	0,0061
Com desafio	1,00 ^a	0,91	0,4024
Valor de P	0,0295	0,1955	
Área de absorção, μm ² - Íleo			
Sem desafio	8,70	10,10 ^a	0,1084
Com desafio	9,02	8,11 ^b	0,1821
Valor de P	0,7092	0,0058	

FONTE: a autora (2017). Médias seguidas de letras distintas maiúsculas na linha diferem entre si. Médias seguidas de letras minúsculas distintas na coluna diferem entre si.

No desdobramento da interação queratinase x desafio para a área de absorção do íleo (TABELA 7), observou-se que aves suplementadas com queratinase e que não sofreram o desafio sanitário apresentaram maior área de absorção. As alterações nas medidas morfométricas intestinais, tais como vilosidades mais curtas e criptas mais profundas, têm sido utilizadas como indicadores de integridade intestinal. Vilosidades compridas aumentam a área disponível para a absorção de nutrientes (LEBLANC et al., 2013). Em casos de desafio entérico, há maior renovação celular da mucosa intestinal, o que leva a maior profundidade de cripta, em virtude da hiperplasia, resultante da atividade mitótica. A regeneração epitelial começa a partir da cripta, de modo que uma cripta profunda é indicação de um rápido *turnover* de enterócitos e um aumento das necessidades de manutenção do tecido mucoso. Porém, quando ocorre aumento na taxa de mitose com ausência, diminuição ou manutenção da taxa de extrusão, há aumento no número de células e, conseqüentemente, um aumento na altura dos vilos (MAIORKA et al., 2003).

Para avaliação macroscópica da qualidade intestinal, aos 14 dias, houve interação ($P < 0,05$) entre a suplementação de queratinase e o desafio (TABELA 8). Aves dos grupos submetidos ao desafio sanitário apresentaram maiores escores de alterações macroscópicas, indicando maior inflamação intestinal em relação ao grupo controle. A suplementação da queratinase não foi suficiente para amenizar os danos causados pelo desafio imposto as aves aos 14 dias de idade.

TABELA 8. AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DA QUALIDADE INTESTINAL DE FRANGOS DE CORTE AOS 14 E 21 DIAS DE IDADE, RECEBENDO DIETAS SUPLEMENTADAS OU NÃO COM QUERATINASE E SUBMETIDOS OU NÃO AO DESAFIO SANITÁRIO

	Material Mucoso	Congestão	Petéquias
14 dias			
Sem queratinase	0,40	1,19	0,09
Com queratinase	0,12	1,34	0,19
Sem desafio	0,16	0,72b	0,03b
Com desafio	0,37	1,81a	0,25a
Dieta controle	0,12	0,56b	0,06b
Dieta controle + Queratinase	0,19	0,87ab	0,00b
Dieta controle + Desafio	0,69	1,81a	0,12b
Dieta controle + Queratinase + Desafio	0,06	1,81a	0,37a
CV, %	31,65	47,61	32,25
Queratinase (Q)	0,6644	0,8955	0,2845
Desafio (D)	0,7472	0,0088	0,0125
Q x D	0,9077	0,0449	0,0143
21 dias			
Sem queratinase	0,12	1,37a	0,37
Com queratinase	0,31	0,62b	0,09
Sem desafio	0,25	0,56b	0,06
Com desafio	0,18	1,44a	0,41
Dieta controle	0,12	0,62b	0,00b
Dieta controle + Queratinase	0,37	0,50b	0,12b
Dieta controle + Desafio	0,12	2,12a	0,75a
Dieta controle + Queratinase + Desafio	0,25	0,75b	0,06b
CV, %	68,34	47,50	32,20
Queratinase (Q)	0,3805	0,0272	0,2564
Desafio (D)	0,9682	0,0025	0,0680
Q x D	0,8561	0,0127	0,0121

FONTE: a autora (2017). Médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste de kruskal-Wallis.

Por outro lado, aos 21 dias de idade, as aves que receberam a dieta com a inclusão da queratinase e foram desafiadas apresentaram menor ($p < 0,05$) escore de congestão e petéquias na mucosa intestinal do íleo, em relação às aves que não receberam a suplementação. Os efeitos positivos das proteases exógenas sobre a capacidade das aves de lidar com problemas de doenças intestinais como infecções por *Eimeria* ou enterite necrótica também têm sido sugeridos, embora os

mecanismos não sejam bem compreendidos e as evidências disponíveis não sejam definitivas.

Yan et al. (2011) sugeriram que uma protease evitou o crescimento de *Clostridium perfringens* em aves desafiadas com uma vacina *Eimeria* por meio da melhor absorção de proteína e uma redução na proteína disponível para o crescimento bacteriano. No entanto, outros estudos não encontraram efeitos claros da protease dietética em aves desafiadas com vacinas *Eimeria* (WALK et al., 2011). No entanto, a integridade intestinal parece ser um fator que afeta as respostas de desempenho animal no campo com o uso de proteases, e requer mais estudos.

Na avaliação microscópica da saúde intestinal, pode se observar que aos 14 dias de idade houve interação ($P < 0,05$) entre os fatores queratinase e desafio (TABELA 9). Aves dos grupos desafiados apresentaram maior escore total de ISI de íleo, independente da suplementação de queratinase. Este resultado, associado ao macroscópico da mesma idade, demonstra o processo inflamatório intestinal que acontece quando as aves são desafiadas, indicando que o desafio imposto às aves foi efetivo.

Alguns dos mecanismos pelos quais a saúde intestinal influencia a digestibilidade de nutrientes e energia em dietas como resultado de desafios entéricos já foram elucidados. Estes incluem inflamação intestinal como resultado da destruição do epitélio intestinal, com consequente redução na área superficial absorvente. Portanto, há má absorção de nutrientes e redução na expressão de transportadores de aminoácidos de membrana de borda de escova (PERSIA et al., 2006; PARIS e WONG, 2013; SU et al., 2014).

Aos 21 dias também houve interação ($P < 0,05$) entre a suplementação enzimática e o desafio sanitário. Aves que receberam dietas formuladas com a queratinase e sofreram o desafio, apresentaram maior ($P < 0,05$) infiltração plasmática epitelial e infiltração inflamatória mista da lamina própria, indicando maior processo inflamatório neste grupo. Este resultado é contraditório ao encontrado na avaliação macroscópica aos 21 dias. Apesar das alterações histológicas encontradas a nível microscópico, as mesmas não foram visíveis macroscopicamente, nem tão pouco causaram efeitos deletérios sobre a morfometria intestinal do íleo.

No entanto, ao avaliar os grupos não desafiados, a suplementação com a queratinase resultou em menor ($P < 0,05$) espessura epitelial e infiltração inflamatória

epitelial, indicando benefícios da queratinase sobre a qualidade intestinal de frangos de corte aos 21 dias de idade. Este resultado demonstra a capacidade da queratinase em hidrolisar os fatores antinutricionais do farelo de soja subprocessado, reduzindo seus efeitos deletérios sobre a mucosa intestinal das aves.

As proteínas alergênicas presentes na soja são responsáveis por uma reação de hipersensibilidade que resulta na produção indesejável de anticorpos contra a soja antes que o sistema imune alcance a tolerância imunológica (FENG et al., 2007; KIM et al., 2010). Elas reduzem a absorção de nutrientes e causam efeitos deletérios sobre as microvilosidades do intestino delgado, podendo provocar encurtamento das vilosidades e aumento da profundidade da cripta, evidenciando o processo de produção celular e restauração da vilosidade intestinal que indicam o comprometimento da integridade da mucosa.

Além disso, as lectinas, glicoproteínas presentes na soja, têm a capacidade de ligação a moléculas específicas na superfície da borda escova da mucosa intestinal. Isso interrompe o epitélio intestinal, reduz a altura das vilosidades, altera a atividade das enzimas da borda da escova, provoca a hipersecreção da proteína endógena e danifica os microvilos (FASINA et al., 2006).

As proteases são enzimas proteolíticas que não afetam a digestão das proteínas apenas, mas também estimulam a digestibilidade de outros nutrientes. Já foi relatado o aumento da digestibilidade da energia metabolizável aparente, proteína bruta e aminoácidos com o uso de uma serina protease em dietas de frangos de corte (ANGEL et al., 2011; FREITAS et al., 2011; FRU-NJI et al., 2011; LIU et al., 2013). As enzimas suplementares podem degradar os componentes antinutricionais da alimentação, juntamente, com a promoção da degradação de amido, matriz de parede celular e proteínas de armazenamento (TROCHE et al., 2007).

TABELA 9. ÍNDICE DE SAÚDE INTESTINAL (ISI) DE ÍLEO DE FRANGOS DE CORTE AOS 14 E 21 DIAS DE IDADE, RECEBENDO DIETAS SUPLEMENTADAS OU NÃO COM QUERATINASE E SUBMETIDOS OU NÃO AO DESAFIO SANITÁRIO

	ELP	EE	PE	IIE	IIMLP	Calic.	Congestão	Necrose	Oocistos	Total
14 dias										
Sem queratinase	2,04	0,95	1,07	0,02	0,25	0,74	0	0,11	0	5,19
Com queratinase	2,11	0,94	1,01	0,01	0,24	0,83	0	0,10	0	5,24
Sem desafio	1,94	0,87 ^b	0,97 ^b	0,01	0,25	0,59 ^b	0	0,17 ^a	0	4,82 ^b
Com desafio	2,21	1,02 ^a	1,11 ^a	0,02	0,24	0,97 ^a	0	0,05 ^b	0	5,62 ^a
Dieta controle	1,94	0,83 ^b	0,94 ^b	0,02	0,24	0,57 ^b	0	0,19 ^a	0	4,73 ^b
Dieta controle + Queratinase	1,95	0,91 ^{ab}	1,01 ^{ab}	0,01	0,26	0,61 ^b	0	0,15 ^{ab}	0	4,90 ^{ab}
Dieta controle + Desafio	2,15	1,08 ^a	1,21 ^a	0,02	0,26	0,90 ^{ab}	0	0,04 ^b	0	5,65 ^a
Dieta controle + Queratinase + Desafio	2,26	0,97 ^{ab}	1,01 ^{ab}	0,02	0,23	1,03 ^a	0	0,06 ^b	0	5,58 ^a
CV, %	54,76	52,57	53,89	12,40	25,33	45,21	0	16,45	0	56,55
Queratinase (Q)	0,4653	0,7777	0,6411	0,5242	0,9984	0,5867	-	0,6499	-	0,7560
Desafio (D)	0,0720	0,0180	0,0431	0,5242	0,3785	<,0001	-	0,0044	-	0,0010
Q x D	0,2806	0,0494	0,0478	0,7489	0,8322	0,0005	-	0,0396	-	0,0114
21 dias										
Sem queratinase	0,76	0,46 ^a	0,35 ^a	0,33	1,16	2,58	0,49	0,11	0	6,23
Com queratinase	0,80	0,36 ^b	0,23 ^b	0,36	1,31	2,60	0,54	0,14	0	6,34
Sem desafio	0,85	0,43	0,32	0,26 ^b	0,92 ^b	2,79 ^a	0,54	0,08	0	6,19
Com desafio	0,71	0,39	0,27	0,43 ^a	1,56 ^a	2,39 ^b	0,48	0,17	0	6,38
Dieta controle	0,84	0,52 ^a	0,41 ^a	0,28 ^{bc}	0,84 ^b	2,82 ^a	0,38 ^{bc}	0,06	0	6,14
Dieta controle + Queratinase	0,86	0,34 ^b	0,23 ^b	0,23 ^c	0,99 ^b	2,76 ^{ab}	0,71 ^a	0,11	0	6,24
Dieta controle + Desafio	0,68	0,39 ^{ab}	0,29 ^{ab}	0,36 ^{ab}	1,48 ^a	2,33 ^b	0,60 ^{ab}	0,17	0	6,31
Dieta controle + Queratinase + Desafio	0,74	0,38 ^{ab}	0,24 ^b	0,48 ^a	1,63 ^a	2,43 ^{ab}	0,36 ^c	0,17	0	6,44
CV, %	46,76	47,78	43,34	45,50	48,16	51,78	39,88	20,07	0	57,45
Queratinase (Q)	0,5161	0,0390	0,0112	0,9565	0,1770	0,8423	0,7973	0,5555	-	0,7156
Desafio (D)	0,2287	0,6981	0,8529	<0,001	<,0001	0,0002	0,3702	0,0770	-	0,2680
Q x D	0,5983	0,0577	0,0170	<,0001	<,0001	0,0027	0,0105	0,2813	-	0,7134

FONTE: a autora (2017). ELP: Espessura de lâmina própria; EE: Espessura Epitelial; PE: Proliferação de enterócitos; IIE: Infiltração inflamatória epitelial; IIMLP: Infiltração inflamatória mista de lâmina própria; Calic.: Caliciformes. Médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis.

As proteínas são uma parte importante da estrutura das paredes celulares de ingredientes vegetais, onde são incorporadas em matrizes complexas com carboidratos (PARKER et al., 1999). Pesquisa em modelos de ruminantes *in vitro* e *in vivo* demonstrou a capacidade das proteases subtilisinas exógenas de aumentar a solubilização e fermentação da hemicelulose em grãos e alfafa (COLOMBATTO e BEAUCHEMIN, 2009). Os autores presumem que essas enzimas atuaram removendo proteínas estruturais na parede celular, permitindo o acesso mais rápido de microrganismos ruminais aos substratos digeríveis.

Neste sentido, com a melhor digestão de componentes da parede celular dos vegetais, as enzimas exógenas podem alterar a composição da microbiota e, assim, melhorar a saúde intestinal de frangos de corte (DANICKE, VAHJEN e SIMON, 1999). A melhor absorção dos nutrientes reduz a quantidade de substrato no intestino, o que resulta em alteração na quantidade e na composição da população microbiana. A microbiota compõe um ecossistema que interage de forma diferente com os nutrientes ingeridos pelos animais e com a mucosa intestinal. Portanto, a ação enzimática tem relação direta com a população microbiana do intestino. Já que a quebra enzimática pode liberar substâncias desfavoráveis no ambiente intestinal, promovendo um desequilíbrio da microbiota.

Em condições de criação comercial, os desafios ambientais, imunológicos e de manejo são mais intensos e frequentes que em condições experimentais. A suplementação de enzimas específicas como no caso da queratinase pode não ter o mesmo impacto quanto o observado em condições experimentais. Considerando que “o intestino é um órgão em estado constante de inflamação controlada”, a qualidade ambiental desfavorável, sem os recursos de manejos de limpeza e desinfecção rigorosos, e as altas densidades de criação, entre outros, representam maiores desafios e mais comumente alguns agentes patogênicos oportunamente se estabelecem e geram enfermidades gastrintestinais determinando perdas econômicas importantes.

CONCLUSÃO

A suplementação de queratinase e o desafio sanitário não influenciaram o desempenho zootécnico das aves aos 21 dias de idade.

Aos 14 e 21 dias de idade, o desafio sanitário imposto às aves resultou em perturbação da proliferação celular na mucosa intestinal e em alterações histológicas, indicando maior processo inflamatório intestinal.

Por outro lado, a suplementação de queratinase melhora a qualidade e integridade intestinal, somente, em aves que não foram desafiadas. Isso demonstra a capacidade da queratinase de hidrolisar os fatores antinutricionais presentes no farelo de soja subprocessado.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização da soja crua em substituição a soja desativada com o objetivo de aumentar os níveis de fatores antinutricionais na dieta foi eficiente. Esse resultado demonstra os efeitos deletérios da utilização de farelo de soja subprocessado, por exemplo, em dietas de frangos de corte.

A suplementação de queratinase resultou em maiores benefícios, principalmente, na fase inicial de criação das aves. Resultando em melhora no desempenho e integridade intestinal nesta fase. Isso sugere que aves mais jovens são mais responsivas a essa enzima. Portanto, a suplementação da mesma poderia ser realizada somente na fase inicial de criação das aves. Além disso, a associação da queratinase e soja crua resultou em redução no peso do pâncreas e da inflamação intestinal no íleo. Este resultado demonstra a capacidade da queratinase utilizada em hidrolisar os fatores antinutricionais da soja, reduzindo seus efeitos deletérios sobre a mucosa intestinal das aves.

Em condições de criação comercial os desafios ambientais, imunológicos e de manejo são mais intensos e frequentes em relação às condições experimentais. A suplementação de enzimas específicas como no caso da queratinase pode não ter o mesmo impacto quanto o observado em condições experimentais. Considerando que “o intestino é um órgão em estado constante de inflamação controlada”, a qualidade ambiental desfavorável, sem os recursos de manejos de limpeza e desinfecção rigorosos, e as altas densidades de criação, entre outros, representam maiores desafios e mais comumente alguns agentes patogênicos oportunamente se estabelecem e geram enfermidades gastrintestinais determinando perdas econômicas importantes.

REFERÊNCIAS

- ANGEL, C. R.; SAYLOR, W.; VIEIRA, S. L.; WARD, N. Effects of a mono-component protease on performance and protein utilization in 7- to 22-day-old broiler chickens. **Poultry Science**, v. 90, n. 10, p. 2281-2286, 2011.
- BARLETTA, A. Introduction: Current market and expected developments. In: BEDFORD, M. R.; PARTRIDGE, G. G. **Enzymes in farm animal nutrition**. 2nd. London: Cab International, 2011. p. 1-11.
- BOLELI, I. C.; MAIORKA, A; MACARI, M. Estrutura funcional do trato digestório. In: Macari M, editor. *Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte*. Jaboticabal: FUNEP-UNESP, 2002. 75-95.
- BRACARENSE, A. P.; LUCIOLI, J.; GRENIER, B.; DROCIUNAS PACHECO, G.; MOLL, W. D.; SCHATZMAYR, G.; OSWALD, I. P. Chronic ingestion of deoxynivalenol and fumonisin, alone or in interaction, induces morphological and immunological changes in the intestine of piglets. **British Journal of Nutrition**, v. 107, n. 12, p. 1776-1786, 2012.
- BRISBIN, J. T.; GONG, J.; SHARI, F. S. Interactions between commensal bacteria and the gut-associated immune system of the chicken. **Animal Health Research Reviews**, v. 9, n. 1, p. 101–110, 2008.
- CARRÃO-PANIZZI, M. C.; KWANYUEN, P.; ERHAN, S. Z.; LOPES, I. O. N. Genetic variation and environmental effects on beta-conglycinin and glycinin content in Brazilian soybean cultivars. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 9, p. 1105-1114, 2008.
- COLOMBATTO, D.; BEAUCHEMIN, K. A. A protease additive increases fermentation of alfalfa diets by mixed ruminal microorganisms in vitro. *Journal of Animal Science*, v. 87, n. 3, p. 1097–1105, 2009.
- DANICKE, S.; VAHJEN, W.; SIMON, O. Effects of dietary fat type and xylanase supplementation to rye-based broiler diets on selected bacterial groups adhering to the intestinal epithelium, on transit time of feed, and on nutrient digestibility. **Poultry Science**, v. 78, n. 9, p. 1292-1299, 1999.
- FASINA, Y. O.; CLASSEN, H. L.; GARLICH, J. D.; BLACK, B. L.; FERKET, P. R.; UNI, Z.; OLKOWSKI, A. A. Response of turkey poults to soybean lectin levels typically encountered in commercial diets. 2. Effects on intestinal development and lymphoid organs. **Poultry Science**, v. 85, n. 5, p. 870–877, 2006.
- FASINA, Y. O.; HOERR, F. J.; MCKEE, S. R.; CONNER, D. E. Influence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection on intestinal goblet cells and villous morphology in broiler chicks. **Avian Diseases**, v. 54, n. 2, p. 841–847, 2010.
- FENG, J.; LIU, X.; XU, Z. R.; LU, Y. P.; LIU, Y. Y. Effect of fermented soybean meal on intestinal morphology and digestive enzyme activities in weaned piglets. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 52, n. 8, p. 1845-1850, 2007.
- FORDER, R. E.; NATTRASS, G. S.; GEIER, M. S.; HUGHES, R. J.; HYND, P. I. Quantitative analyses of genes associated with mucin synthesis of broiler chickens with induced necrotic enteritis. **Poultry Science**, v. 91, n. 6, p. 1335–1341, 2012.

- FREITAS, S.; VIEIRA, C.; ANGEL, A.; FAVERO A.; MAIORKA, A. Performance and nutrient utilisation of broilers fed diets supplemented with a novel mono-component protease. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 20, n. 3, p. 322-334, 2011.
- FRU-NJI, F.; KLUENTER, A.M.; FISCHER, M.; PONTOPPIDAN, K. A feed serine protease improves broiler Performance and energy digestibility. **The Journal of Poultry Science**, v. 48, n. 10, p. 239–246, 2011.
- GOLDER, H. M.; GEIER, M.S.; FORDER, R. E.; HYND, P. I.; HUGHES, R. J. Effects of necrotic enteritis challenge on intestinal micro-architecture and mucin profile. **British Poultry Science**, v. 52, n. 4, p. 500–506, 2011.
- GUPTA, R.; RAMNANI, P. Microbial keratinases and their prospective applications: An overview. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, n. 1, p. 21-33, 2006.
- HANSSON, G. C.; JOHANSSON, M. E. The inner of the two Muc2 ucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. **Gut Microbes**, v. 1, n. 1, p. 51–54, 2010.
- JANKOWSKI, J.; JUSKIEWICZ, J.; GULEWICZ, K.; LECEWICZ, A.; SLOMINSKI, B. A.; ZDUNCZYK, Z. The effect of diets containing soybean meal, soybean protein concentrate, and soybean protein isolate of different oligosaccharide content on growth performance and gut function of young turkeys. **Poultry Science**, v. 88, n. 10, p. 2132–2140, 2009.
- KIM, S. W.; VAN HEUGTEN, E.; JI, F.; LEE, C. H.; MATEO, R. D. Fermented soybean meal as a vegetable protein source of nursery pigs. **Journal of Animal Science**, v. 88, n. 1, p. 214-224, 2010.
- KISIELINSKI, K.; WILLIS, S.; PRESCHER, A.; KLOSTERHALFEN, B.; SCHUMPELICK, V. A simple new method to calculate small intestine absorptive surface in the rat. **Clinical and Experimental Medicine**, v. 2, n. 3, p. 131-135, 2002.
- KRAIESKI, A. L.; HAYASHI, R. M.; SANCHES, A.; ALMEIDA, G. C.; SANTIN, E. Effect of aflatoxin experimental ingestion and *Eimeria* vaccine challenges on intestinal histopathology and immune cellular dynamic of broilers: applying an Intestinal Health Index. **Poultry Science**. doi: 10.3382/ps/pew397. 2016.
- LEBLANC, J. G.; MILANI, C.; DE GIORI, G. S.; SESMA, F.; VAN SINDEREN, D.; VENTURA, M. Bacteria as vitamin suppliers to their host: a gut microbiota perspective. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 24, n. 2, p. 160–168, 2013.
- LIU, S. Y.; SELLE, P. H.; COURT, S. G.; COWIESON, A. J. Protease supplementation of sorghum-based broiler diets enhances amino acid digestibility coefficients in four small intestinal sites and accelerates their rates of digestion. **Animal Feed Science and Technology**, v. 183, n. 3-4, p. 175-183, 2013.
- MAIORKA, A.; SANTIN, E.; DAHLKE, F.; BOLELI, I. C.; FURLAN, R. L.; MACARI, M. Posthatching water and feed deprivation affect the gastrointestinal tract and intestinal mucosa development of broiler chicks. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 12, n. 4, p. 483-492, 2003.
- MEHRI, M.; ADIBMORADI, M.; SAMIE, A.; SHIVAZAD, M. Effects of β -mannanase on broiler performance, gut morphology and immune system. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 37, p. 6221–6228, 2010.

OKAMOTO, R Epithelial regeneration in inflammatory bowel diseases. **Inflammation and Regeneration**, v. 31, n. 3; p. 275-281, 2011.

PARIS, N. E.; WONG, E. A. Expression of digestive enzymes and nutrient transporters in the intestine of *Eimeria maxima*-infected chickens. **Poultry Science**, v. 92, n. 5, p. 1331-1335, 2013.

PARKER, M. L.; GRANT, A.; RIGBY, N. M.; BELTON, P. S.; TAYLOR, J. R. N. Effects of popping on the endosperm cell walls of sorghum and maize. *Journal of Cereal Science*, v. 30, n. 3, p. 209–216, 1999.

PEEK, H. W.; VAN DER KLIS, J. D.; VERMEULEN, B.; LANDMAN, W. J. M. Dietary protease can alleviate negative effects of a coccidiosis infection on production performance in broiler chickens. **Animal Feed Science and Technology**, v. 150, n.1-2, p. 151–159, 2009.

PERSIA, M. E.; YOUNG, E. L.; UTTERBACK, P. L.; PARSONS, C. M. Effects of dietary ingredients and *Eimeria acervulina* infection on chick performance, apparent metabolizable energy, and amino acid digestibility. **Poultry Science**, v. 85, n. 1, p. 48–55, 2006.

RAVINDRAN, V. Feed enzymes: The science, practice, and metabolic realities. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 22, n. 3, p. 628–636, 2013.

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

SCOTT, K. P.; GRATZ, S. W.; SHERIDAN, P. O.; FLINT, H. J.; DUNCAN, S. H. The influence of diet on the gut microbiota. **Pharmacological Research**, v. 69, n. 1, p. 52–60, 2013.

SU, S.; MISKA, K. B.; FETTERER, R. H.; JENKINS, M. C.; WONG, E. A. Expression of digestive enzymes and nutrient transporters in *Eimeria acervulina*-challenged layers and broilers. **Poultry Science**, v. 93, n. 5, p. 1217-1226, 2014.

TOLEDO, G. S. P.; COSTA, P. T. C.; SILVA, J. H.; CECCANTINI, M.; JUNIOR, C. P. Broilers fed diets varying in energy and protein supplemented with a pool of enzymes. **Ciência Rural**, v. 37, n. 2, p. 518-523, 2007.

TROCHE, C.; SUN, X.; MCELORY, A. P.; REMUS, J.; NOVAK, C. L. Supplementation of Avizyme 1502 to corn-soybean meal-wheat diets fed to turkey tom poults: the first fifty-six days of age. **Poultry Science**, v. 86, n. 3, p. 496-502, 2007.

TU, G. Q.; YE, Y. J.; ZHANG, B.; GUO, M. J.; SUN, Y. H. Studies on the biomechanism of keratin decomposed by streptomyces. **Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis**, v. 20, n. 1, p. 1-5, 1998.

WALK, C. L.; COWIESON, A. J.; REMUS, J. C.; NOVAK, C. L.; MCELROY, A. P. Effects of dietary enzymes on performance and intestinal goblet cell number of broilers exposed to a live coccidia oocyst vaccine. **Poultry Science**, v. 90, n. 1, p. 91-98, 2011.

WANG, D.; PIAO, X.; ZENG, Z.; LU, T.; ZHANG, Q.; LI, P.; XUE, L.; KIM, S. Effects of keratinase on growth performance, nutrient utilization, intestinal morphology, intestinal ecology and inflammatory response of weaned piglets fed diets with

different levels of crude protein. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 24, n. 12, p. 1718–1728, 2011.

WANG, J. X.; PENG, K. M. Developmental morphology of the small intestine of African ostrich chicks. **Poultry Science**, v. 87, n. 12, p. 2629–2635, 2008.

YAN, F.; DIBNER, J.; KNIGHT, C. D.; VAZQUEZ-ANON, M.; ODETALLAH, N.; CARTER, S. Effect of dietary protein and protease supplementation on performance and gut health of broiler chicks. **Poultry Science**, v. 90 (E-Suppl. 1), p. 19, 2011.

YU, B.; WU, S.T.; LIU, C.C.; GAUTHIER, R.; CHIOU, P. W. S. Effects of enzyme inclusion in a maize-soybean diet on broiler performance. **Animal Feed Science and Technology**, v. 134, n. 3-4, p. 14-16, 2007.