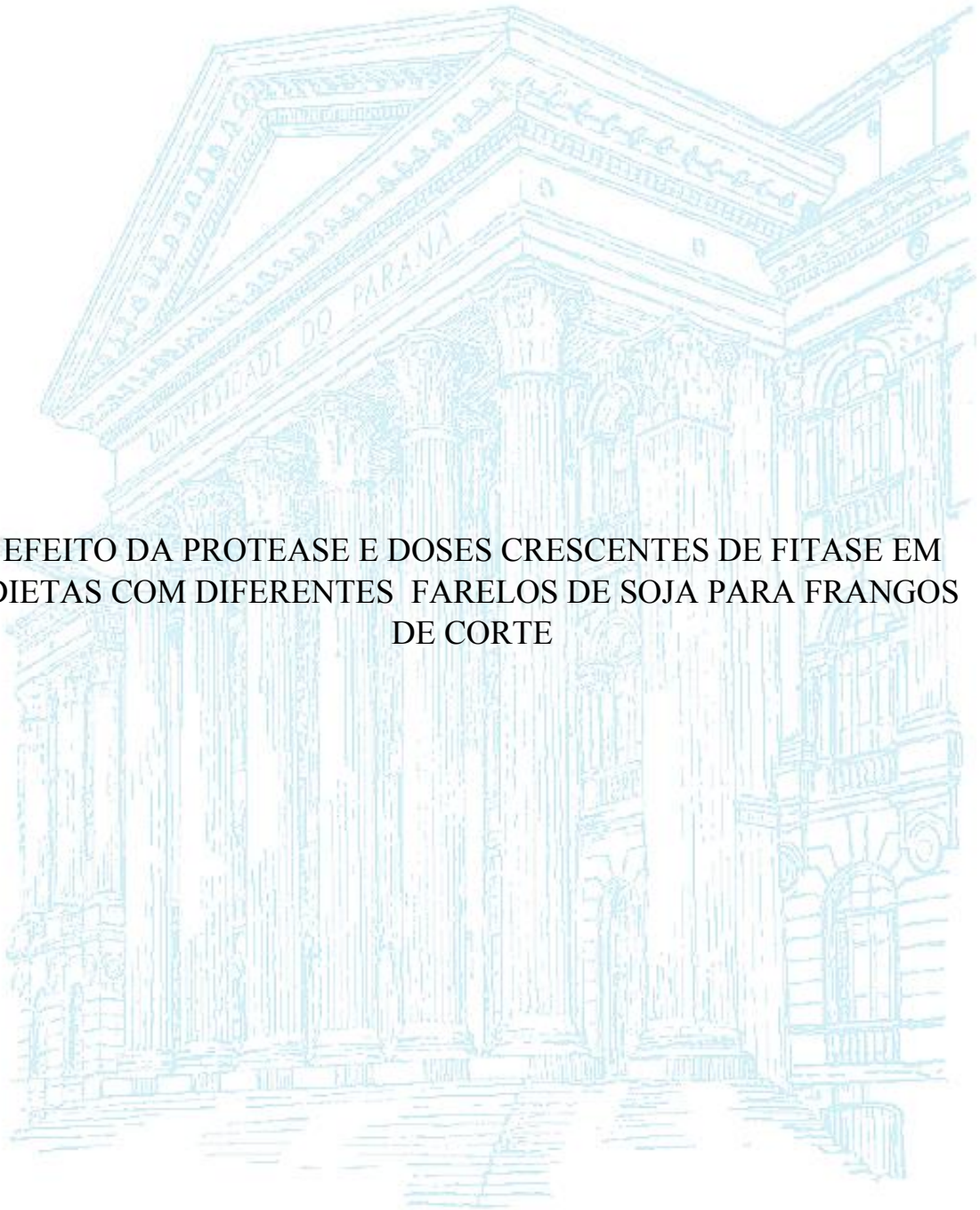
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RAFAEL FERNANDO SENS



# EFEITO DA PROTEASE E DOSES CRESCENTES DE FITASE EM DIETAS COM DIFERENTES FARELOS DE SOJA PARA FRANGOS DE CORTE

CURITIBA

2021

RAFAEL FERNANDO SENS

# EFEITO DA PROTEASE E DOSES CRESCENTES DE FITASE EM DIETAS COM DIFERENTES FARELOS DE SOJA PARA FRANGOS DE CORTE

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, ofertado no Setor de Ciências Agrárias na Universidade Federal do Paraná, como um dos requisitos à obtenção de Título de Doutor.

Orientador: Prof Dr. Alex Maiorka

CURITIBA

2021

Sens, Rafael Fernando
Efeito da protease e doses crescentes de fitase em dietas com diferentes farelos de soja para frangos de corte. / Rafael Fernando Sens. - Curitiba, 2021.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
Orientador: Alex Maiorka.

1. Frango de corte - Alimentação e rações. 2. Farelo de soja como ração. 3. Enzimas proteolíticas. I. Maiorka, Alex. II. Título. III. Universidade Federal do Paraná.

Sistema de Bibliotecas/UFPR

Guilherme Luiz Cintra Neves - CRB9/1572

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS - 40001016023P3

# TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS VETERINÁRIAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **RAFAEL FERNANDO SENS** intitulada: **Efeito da protease e doses crescentes de fitase em dietas com diferentes farelos de soja para frangos de corte.**, sob orientação do Prof. Dr. ALEX MAIORKA, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 04 de Fevereiro de 2021.

Assinatura Eletrônica
08/02/2021 09:08:44.0
ALEX MAIORKA
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
05/02/2021 17:37:46.0
SIMONE GISELE DE OLIVEIRA
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
19/02/2021 16:04:12.0
LEVY DO VALE TEIXEIRA
Avaliador Externo (DSM - NUTRITIONAL PRODUCTS)

Assinatura Eletrônica
05/02/2021 16:35:01.0
ANANDA PORTELLA FÉLIX
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
16/04/2021 18:43:41.0
KEYSUKE MURAMATSU
Avaliador Externo (JBS S.A)

*Dedico:*

*Aos meus amados filhos Larissa e Gustavo*

*Á minha amada e querida esposa Priscilla*

*À toda a minha família, em especial, aos meus país José Fernando e Aracy*

*Ao meu mestre e orientador Alex Maiorka, por sua competência, amizade e paciência*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos filhos Larissa e Gustavo e minha esposa Priscilla por todo apoio, carinho e amor nessa longa jornada!

Aos meus pais José Fernando e Aracy, por sempre estarem ao meu lado, nos piores e melhores momentos, me ouvindo, me aconselhando, me animando, e acreditando em mim!

Aos meus irmãos Patrícia, Juliana e Júnior e a toda a minha família que sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos e sempre me apoiaram!

Aos meus mestres, professores, em especial ao professor Alex Maiorka, por todos os ensinamentos, amizade, paciência (muita), pelas oportunidades e confiança!

Ao Uislei Orlando, Keysuke Muramatsu e Fabricio Delgado, que foram os primeiros amigos e colegas que me desafiaram a buscar novos conhecimentos em nutrição animal!

A todos os meus gestores na BRF, Sérgio Vieira e Marcus Reginatto, e na DSM, Paco Piracés, José Maria Luvizotto, Enrique Castañeda e Regiane Peres, que me liberaram para as aulas e me incentivaram!

Aos meus queridos amigos da Novozymes, Jacqueline e Diogo que sempre me ajudaram e me ensinaram sobre análises *in vitro*!

Aos meus colegas da UFPR Lucas, Leopoldo, Katiucia, Filipe, Francielle, Marley, Kariny e Vitor que tanto me ajudaram na condução dos experimentos!

Aos meus queridos amigos Ronan Santos, Levy Teixeira, Adsos Passos, Rafael Hermes, Eduardo Yamashita e Fabiana Souza que me ajudaram quando eu precisei para cumprir com as obrigações do Doutorado!

E por fim, um agradecimento especial reforçado para o Lucas Bassi, Levy Teixeira e Diogo Rosso, o apoio de vocês foi fundamental para eu chegar até aqui!

**RESUMO**

O farelo de soja (FS) é uma importante fonte de proteína em alimentos, entretanto, não possui uma composição nutricional homogênea. Este importante ingrediente é uma importante fonte de antinutrientes proteicos dietéticos e apresenta variações nas suas características químicas e físicas. A adição de enzimas exógenas, como a fitase e a protease, reduz a influência negativa de antinutrientes proteicos e do fitato. O objetivo deste estudo foi avaliar a suplementação de dietas de frango de corte com altos níveis de fitase e a utilização de FS com diferentes conteúdos proteicos no desempenho, digestibilidade ileal dos nutrientes, mio-inositol plasmático, liberação de fosfatos *in vitro*, e composição mineral óssea, e avaliar o efeito de diferentes níveis de proteína bruta e aminoácidos em dietas de frangos de corte com ou sem inclusão de uma protease exógena. Foram alojados um total de 1.200 pintinhos de um dia de idade, provenientes de um incubatório comercial, alojados em unidades experimentais de 2,06 m2 (12,1 frangos de corte/m2), equipados com bebedouros nipple e comedouros tubulares. As aves receberam ração e água *ad libitum*. As dietas foram baseadas em milho e farelo de soja, fareladas. O estudo foi dividido em dois, sendo que no primeiro experimento, os tratamentos dietéticos foram um arranjo fatorial completo 2 x 2, que consistiu em 2 farelos de soja com diferentes concentrações de proteína (45% e 47% de proteína bruta), e 2 doses de fitase (1.000 e 2.500 unidades de fitase/kg - FYT), totalizando quatro tratamentos dietéticos com 12 repetições de 25 aves cada e divididas em duas fases de: fase inicial (1 a 21 dias) e fase de crescimento/terminação (22 a 42 dias). No segundo experimento, os boxes com os pintinhos foram distribuídos em um arranjo fatorial 2x2 inteiramente casualizado. Os fatores avaliados consistiram em 2 dietas: uma dieta basal e uma dieta reduzida (com redução dos níveis de proteína bruta e aminoácidos); e 2 doses de suplementação de protease: com ou sem a suplementação exógena de 15.000 unidades de protease (PROT)/kg; totalizando 4 tratamentos com 12 repetições de 25 aves cada. Em conclusão, maiores doses de fitase para frangos de corte melhoram o desempenho, o mio-inositol, e a composição mineral óssea. A digestibilidade ileal dos nutrientes pode ser aumentada com doses de fitase mais elevadas quando em combinação com farelo de soja de maior qualidade nutricional. As dietas à base de milho e farelo de soja com menor teor de proteína bruta e aminoácidos tiveram efeitos negativos sobre o ganho de peso e conversão alimentar de frangos de corte de 1 a 42 dias de idade. Aos 42 dias, o rendimento de carcaça e de peito foi reduzido, e a porcentagem de gordura abdominal aumentada com dietas de baixos níveis de proteína bruta e aminoácidos. A inclusão de 15000 PROT/kg de uma protease exógena não teve efeito sobre o desempenho de crescimento e variáveis de carcaça, mas melhorou a solubilidade da proteína dietética *in vitro*.

Palavras-chave: Farelo de Soja, Fitase, Fósforo, Protease, Proteína.

**ABSTRACTS**

The soybean meal is an important source of protein in feed, however, it does not have a homogeneous nutritional composition. This important ingredient is an important source of dietary protein antinutrients and has variations in its chemical and physical characteristics. The addition of exogenous enzymes such as phytase and protease reduces the negative influence of protein antinutrients such as trypsin inhibitors and phytate. The objective of this study was to evaluate the supplementation of broiler diets with high levels of phytase and the use of soybean meal with different protein contents in the performance, ileal digestibility of nutrients, plasma myo-inositol, phosphate release *in vitro*, and bone mineral composition, and to evaluate the effect of different levels of crude protein and amino acids in broiler diets with or without the inclusion of an exogenous protease. A total of 1,200 day old chicks from a commercial hatchery were housed in experimental units of 2.06 $m^2$ (12.1 broilers/$m^2$, equipped with nipple drinkers and tubular feeders. The chickens received feed and water *ad libitum*. The diets were based on corn and soybean meal. The study was divided in two, and in the first experiment, the dietary treatments were a complete 2 x 2 factor arrangement, consisting of 2 soybeans meal with different protein concentrations (45% and 47% crude protein), and 2 doses of phytase (1,000 and 2,500 units of phytase/kg - FYT), totaling four dietary treatments with 12 repetitions of 25 birds each and divided into two phases: initial phase (1 to 21 days) and growth/finisher phase (22 to 42 days). In the second experiment, the boxes with the chicks were distributed in a 2x2 factorial arrangement entirely randomized. The factors evaluated consisted of 2 diets: a basal diet and a reduced diet (with reduction of crude protein and amino acids levels); and 2 doses of protease supplementation: with or without exogenous supplementation of 15,000 units of protease (PROT)/kg; totaling 4 treatments with 12 repetitions of 25 birds each. In conclusion, higher doses of phytase for broilers improve performance, the supply of myo-inositol, and the bone mineral composition. The ileal digestibility of nutrients can be increased with higher doses of phytase when combined with higher nutritional quality soybean meal. Corn-based diets and soybean meal with lower crude protein and amino acid content had negative effects on weight gain and feed conversion of broilers from 1 to 42 days of age. At 42 days, carcass and breast yields were reduced, and the percentage of abdominal fat increased with low levels of crude protein and amino acids diets. The inclusion of 15000 PROT/kg of an exogenous protease had no effect on growth performance and carcass variables, but improved the solubility of dietary protein *in vitro*.

Key-words: Phosphorus, Phytase, Protease, Protein, Soybean Meal.

## LISTA DE FIGURAS

**CAPÍTULO II – EFEITO DE DIFERENTES DOSES DE FITASE E CONTEÚDO PROTEICO DO FARELO DE SOJA NO DESEMPENHO, DIGESTIBILIDADE DE NUTRIENTES E CARACTERÍSTICAS ÓSSEAS DE FRANGO DE CORTE**

FIGURA 1. EFEITO DE DIFERENTES DOSES DE FITASE NA LIBERAÇÃO DE FOSFATO *IN VITRO* DE DIETAS INICIAIS DE FRANGO DE CORTE À BASE DE MILHO E FARELO DE SOJA (P < 0,01; SEM = 18,012).....50

FIGURA 2. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA DO FARELO DE SOJA (FS) E DIFERENTES DOSES DE FITASE NA LIBERAÇÃO *IN VITRO* DE FOSFATO EM DIETAS CRESCICMENTO/TERMINAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE A BASE DE MILHO E DE FARELO DE SOJA (P < 0,05; SEM = 22,670).....51

**CAPÍTULO III – EFEITO DA INCLUSÃO DE UMA PROTEASE MONOCOMPONENTE EM DIETAS COM DIFERENTES NÍVEIS DE PROTEÍNA E AMINOÁCIDOS SOBRE DESEMPENHO E RENDIMENTO DE CARCAÇA DE FRANGOS DE CORTE E SOLUBILIDADE IN *VITRO* DE PROTEÍNA**

FIGURA 1. CONTEÚDO DE PROTEÍNA SOLÚVEL *IN VITRO* DO MILHO (*P* < 0.001) E FARELO DE SOJA (*P* = 0.01) INCUBADOS COM OU SEM PROTEASE (200 PPM – 15.000 UNIDADES/kg).....70

FIGURA 2. CONTEÚDO DE PROTEÍNA SOLÚVEL *IN VITRO* DE DIETAS INICIAIS, CRESCIMENTO E FINAL DE FRANGOS DE CORTE COM DIFERENTES NÍVEIS DE PROTEÍNA BRUTA E AMINOÁCIDOS, INCUBADAS COM OU SEM PROTEASE (200 PPM – 15.000 PROT/kg).....71

## LISTA DE TABELAS

**CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS**

TABELA 1. COMPOSIÇÃO QUÍMICA (%) DE FARELOS DE SOJA DE DIFERENTES PAÍSES DE ORIGENS.....5

**CAPÍTULO II – EFEITO DE DIFERENTES DOSES DE FITASE E CONTEÚDO PROTEICO DO FARELO DE SOJA NO DESEMPENHO, DIGESTIBILIDADE DE NUTRIENTES E CARACTERÍSTICAS ÓSSEAS DE FRANGO DE CORTE**

TABELA 1. COMPOSIÇÃO E ANÁLISE CALCULADA DAS DIETAS INICIAIS (0 A 21 DIAS).....38

TABELA 2. COMPOSIÇÃO E ANÁLISE CALCULADA DAS DIETAS DE CRESCIMENTO/ TERMINAÇÃO (22 A 42 DIAS).....39

TABELA 3. COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DO MILHO, DO FARELO DE SOJA E DA CASCA DE SOJA.....40

TABELA 4. ATIVIDADE DE FITASE ESPERADA E ANALISADA* RECUPERADA EM AMOSTRAS DE RAÇÃO.....43

TABELA 1. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA DO FARELO DE SOJA (FS) E DOSES DE FITASE SOBRE O CONSUMO DE RAÇÃO (CR), GANHO DE PESO (GP) E CONVERSÃO ALIMENTAR (CA) DE FRANGOS DE CORTE.....44

TABELA 6. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO PROTEICA DO FARELO DE SOJA (FS) E DOSES DE FITASE NO COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDADE ILEAL APARENTE (CDIA) DE MATÉRIA SECA (MS), PROTEÍNA BRUTA (PB), CINZAS, CÁLCIO (Ca), FÓSFORO (P) E ENERGIA DIGESTÍVEL ILEAL (EDI) DE FRANGOS DE CORTE AOS 21 DIAS.....46

TABELA 7. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO PROTEICA DO FARELO DE SOJA (FS) E DOSES DE FITASE NO COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDADE ILEAL APARENTE (CDIA) DA MATÉRIA SECA (MS), PROTEÍNA BRUTA (PB), CINZAS, CÁLCIO (Ca),

FÓSFORO (P), E ENERGIA DIGESTÍVEL ILEAL (EDI) DE FRANGOS DE CORTE AOS 42 DIAS.....47

TABELA 8. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DO FARELO DE SOJA (FS) E DOSES DE FITASE SOBRE OS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE MIO-INOSITOL (MIO) EM FRANGOS DE CORTE AOS 21 E 42 DIAS DE IDADE.....49

TABELA 9. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO PROTEICA DO FARELO DE SOJA (FS) E DE DOSES DE FITASE SOBRE AS CINZAS, CÁLCIO (Ca), PORCENTAGEM DE FÓSFORO (P) E ÍNDICE DE SEEDOR (IS) DO OSSO DA TÍBIA E CINZAS DOS DEDOS AOS 21-DIAS E OSSO DA TÍBIA DE FRANGOS DE CORTE AOS 42-DIAS DE IDADE.....52

**CAPÍTULO III – EFEITO DA INCLUSÃO DE UMA PROTEASE MONOCOMPONENTE EM DIETAS COM DIFERENTES NÍVEIS DE PROTEÍNA E AMINOÁCIDOS SOBRE DESEMPENHO E RENDIMENTO DE CARCAÇA DE FRANGOS DE CORTE E SOLUBILIDADE *IN VITRO* DE PROTEÍNA**

TABELA 1. COMPOSIÇÃO E ANÁLISE CALCULADA DAS DIETAS EXPERIMENTAIS.....62

TABELA 2. NÍVEIS DE ATIVIDADE DE FITASE E PROTEASE RECUPERADOS* NAS AMOSTRAS DA DIETA.....63

TABELA 3. CONSUMO DE RAÇÃO (CR; g), GANHO DE PESO (GP; g), E CONVERSÃO ALIMENTAR (CA; g/g) DE FRANGOS DE CORTE ALIMENTADOS COM DIETAS COM NÍVEIS BASAIS OU REDUZIDOS DE PROTEÍNA BRUTA E AMINOÁCIDOS E SUPLEMENTADOS COM PROTEASE.....66

TABELA 4. RENDIMENTO DE CARCAÇA, PEITO, COXA COM SOBRECOXA E PORCENTAGEM DE GORDURA ABDOMINAL DE FRANGOS DE CORTE ALIMENTADOS COM DIETAS COM NÍVEIS BASAIS OU REDUZIDOS DE PROTEÍNA BRUTA E AMINOÁCIDOS E SUPLEMENTADOS COM PROTEASE.....68

## LISTA DE SIGLAS

| | | |
|---|---|---|
| AA | - | Aminoácidos |
| CA | - | Conversão Alimentar |
| CDIA | - | Coeficiente de Digestibilidade Ileal Aparente |
| CIA | - | Cinzas Insolúveis em Ácido |
| CN | - | Controle Negativo |
| CR | - | Consumo de Ração |
| EB | - | Energia Bruta |
| EDI | - | Energia Digestível Ileal |
| EL | - | Energia Líquida |
| EMA | - | Energia Metabolizável Aparente |
| FI | - | Fator de Indigestão |
| FS | - | Farelo de Soja |
| GP | - | Ganho de Peso |
| IS | - | Índice de Seedor |
| IT | - | Inibidores de Tripsina |
| MIO | - | Mio-Inositol |
| MS | - | Matéria Seca |
| PB | - | Proteína Bruta |
| PNAs | - | Polissacarídeos não Amiláceos |
| TGI | - | Trato Gastrointestinal |

**SUMÁRIO**

**CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS**.....1
**1. INTRODUÇÃO**.....1
**2. REVISÃO DE LITERATURA**.....2
2.1 FARELO DE SOJA.....2
2.1.1 Fatores Antinutrientes.....5
2.1.1.1 Fatores termolábeis e fatores alergênicos presentes no farelo de soja.....5
2.1.1.2 Ácido Fítico e Fitato.....6
2.2 FITASE .....8
2.2.1 Unidades de fitase.....9
2.2.2 Ação da fitase sobre o fitato.....10
2.2.3 Doses crescentes de fitase.....10
2.2.3.1 Mio-Inositol.....11
2.2.4 Efeitos da fitase sobre a mineralização óssea.....12
2.2.5 Efeitos da fitase sobre a digestibilidade.....13
2.2.6 Efeitos da fitase sobre o desempenho.....14
2.3. PROTEASE.....15
2.3.1 Mecanismo de ação das proteases.....16
2.3.2 Efeitos da protease sobre a digestibilidade.....17
2.3.3 Efeitos da protease sobre o desempenho.....20
2.4 SINERGIA ENTRE ENZIMAS EXÓGENAS.....21
**3 REFERÊNCIAS**.....24
**CAPÍTULO II – EFEITO DE DIFERENTES DOSES DE FITASE E CONTEÚDO PROTEICO DO FARELO DE SOJA NO DESEMPENHO, DIGESTIBILIDADE DE NUTRIENTES E CARACTERÍSTICAS ÓSSEAS DE FRANGO DE CORTE**.....33
**RESUMO**.....33
**ABSTRACTS**.....34
**1 INTRODUÇÃO**.....35
**2 MATERIAL E MÉTODOS**.....36

2.1 AVES, INSTALAÇÕES E DIETAS EXPERIMENTAIS.....36
2.2 DESEMPENHO.....40
2.3 DIGESTIBILIDADE.....40
2.4 MIO-INOSITOL PLASMÁTICO.....41
2.5 LIBERAÇÃO DE FOSFATO ($PO_4^{-3}$) *IN VITRO*.....42
2.6 COMPOSIÇÃO MINERAL ÓSSEA.....42
2.7 DESENHO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA.....43
**3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**.....43
3.1 DESEMPENHO.....44
3.2 DIGESTIBILIDADE.....45
3.3 MIO-INOSITOL.....48
3.4 LIBERAÇÃO DE $PO_4^{-3}$ *IN VITRO*.....49
3.5 COMPOSIÇÃO MINERAL ÓSSEA E CINZAS DO DEDO.....51
**4 CONCLUSÃO**.....53
**5 REFERÊNCIAS**.....54
**CAPÍTULO III – EFEITO DA INCLUSÃO DE UMA PROTEASE MONOCOMPONENTE EM DIETAS COM DIFERENTES NÍVEIS DE PROTEÍNA E AMINOÁCIDOS SOBRE DESEMPENHO E RENDIMENTO DE CARCAÇA DE FRANGOS DE CORTE E SOLUBILIDADE *IN VITRO* DE PROTEÍNA**.....58
**RESUMO**.....58
**ABSTRACTS**.....59
**1 INTRODUÇÃO**.....60
**2 MATERIAL E MÉTODOS**.....61
2.1 ANIMAIS E INSTALAÇÕES.....61
2.2 DELINEAMENTO E DIETAS EXPERIMENTAIS.....61
2.3 DESEMPENHO, RENDIMENTO DE CARCAÇA E RENDIMENTO DE CORTES.....63
2.4 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA PROTEASE.....64
2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....65
**3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**.....65
3.1 DESEMPENHO.....65
3.2 RENDIMENTO DE CARCAÇA E CORTES.....68

3.3 ENSAIO *IN VITRO*.....70
**4 CONCLUSÃO**…….....72
**5 REFERÊNCIAS**.....73

# CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

## 1. INTRODUÇÃO

O farelo de soja é uma importante fonte de proteína, sendo o ingrediente proteico mais consumido no mundo nas dietas de frango de corte. Possui alto teor de proteína bruta (PB) comparado a outros farelos proteicos (de forma geral entre 44% e 50% de PB) e um perfil e biodisponibilidade de aminoácidos (AA) adequados para rações de aves e suínos (RAVINDRAN et al. 2014). Mesmo assim, há vários fatores que podem afetar a composição química do farelo de soja. Por isso, é importante que o produtor de rações possua um controle de qualidade estruturado para que consiga minimizar e adaptar a sua formulação às variações desta importante matéria prima. Uma estratégia importante é a inclusão de enzimas exógenas na ração para melhorar o valor nutricional do alimento oferecido aos animais. As enzimas nutricionais exógenas (proteases, fitases e carboidrases) têm sido usadas para aumentar a disponibilidade dos nutrientes e de maior digestibilidade para os animais, permitindo ao nutricionista maior flexibilidade na escolha dos ingredientes a serem utilizados na formulação da ração, reduzindo os custos e tornando a produção mais sustentável.

Como a maior parte dos alimentos para monogástricos é baseada em vegetais (milho e farelo de soja), até 70% do fósforo da dieta pode estar indisponível para animais como frangos e suínos. A inclusão de fitase reduz a necessidade da utilização de fontes inorgânicas de fósforo (fosfatos) nas rações, melhorando a eficiência alimentar e o custo de produção, e sobretudo, reduzindo a necessidade do consumo de fontes não renováveis de fósforo e a excreção de fósforo no solo, tornando a atividade mais sustentável. Uma enzima fitase para ser referência em nutrição animal precisa ter estabilidade térmica adaptada aos desafios do processamento de ração, principalmente tempo e temperatura de condicionamento da ração, e a consistência na liberação de fósforo.

A principal fonte de proteína nas dietas de frango de corte é o farelo de soja, mas muitos outros ingredientes também são incluídos nas formulações, como farinhas de origem animal ou outros farelos de oleaginosas, como canola e girassol, além de soja integral extrusada ou desativada. Vários fatores podem interferir na digestibilidade da proteína destes ingredientes, como origem, processamento e idade do animal. O aumento da digestibilidade da proteína presente na ração é o principal argumento para a inclusão de uma protease exógena nas rações

de frango de corte. Este incremento da digestibilidade afetará positivamente no desempenho dos animais, na rentabilidade do produtor e na redução da excreção de nitrogênio no ambiente.

Assim, considerando que um dos fatores determinantes da concentração de proteína bruta no farelo de soja está relacionada com as diferentes inclusões de casca de soja, o que pode levar a diferentes concentrações de fitato e outros fatores antinutrientes.

Os objetivos deste trabalho foram avaliar a inclusão de altos níveis de fitase em dietas de frango de corte formuladas com farelos de soja de diferentes conteúdos proteicos e seus efeitos sobre desempenho, digestibilidade ileal dos nutrientes, mio-inositol plasmático, liberação de fosfatos *in vitro* e composição mineral óssea, e avaliar a inclusão de uma protease exógena em dietas de frango de corte formuladas com diferentes níveis de proteína bruta e aminoácidos sobre o desempenho e rendimento de carcaça.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 FARELO DE SOJA

A soja, pelas suas qualidades nutricionais e características de produção (facilidade de adaptação, alta produção e facilidade de cultivo), pode ser considerada como a principal fonte proteica nas rações animais. O farelo de soja (FS), na sua composição nutricional, possui elevada quantidade de energia, baixa concentração de fibras e principalmente proteína de alta qualidade e níveis elevados de aminoácidos digestíveis, como lisina, metionina, treonina e triptofano (ROSTAGNO et al., 2017). O tratamento térmico durante a extração do óleo e produção do FS pode afetar a digestibilidade de alguns aminoácidos, especialmente a lisina, entretanto, é fundamental para inativar os fatores antinutrientes naturais da soja. Quando processado adequadamente, o FS é altamente palatável e digestível.

No Brasil, a indústria de soja pode produzir três tipos de FS com base no teor de PB. 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.

O FS não possui uma composição nutricional homogênea. Existem vários fatores que podem afetar a composição química do FS. Entre estes, o genótipo da soja (CROMWELL et al., 1999; PALACIOS et al., 2004), tipo de solo, latitude, localização e condições ambientais

(VAN KEMPEN et al., 2002; GOLDFLUS et al., 2006; THAKUR & HURBURGH, 2007), fonte ou país de origem (KARR-LILIENTHAL et al., 2004; DE COCA-SINOVA et al., 2008), quantidade de fatores antinutrientes, oligossacarídeos e polissacarídeos não amiláceos (PNAs) e condições aplicadas durante o processamento térmico do farelo de soja (WALDROUP et al., 1985; PARSONS et al., 1991; PARK et al., 2002).

A variabilidade na composição do FS foi demonstrada por DE COCA-SINOVA et al. (2008), que avaliaram o FS de seis origens diferentes e encontraram variações consideráveis na composição química e na qualidade final do produto, em especial devido aos inibidores de tripsina, teor de oligossacarídeos e fibra em detergente neutro. Esses fatores influenciaram negativamente na digestibilidade dos AA para frangos de corte aos 21 dias de idade.

Apesar do FS ser reconhecido como um ingrediente de alta digestibilidade, existem algumas frações de carboidratos que não são digeridas pelos animais monogástricos. Estas frações são as fibras solúveis (oligossacarídeos – rafinose e estaquiose e polissacarídeos) e insolúveis (celulose, hemicelulose e lignina) (CHOCT, 2001). Estudos demonstraram que o valor nutritivo da FS também depende da presença de carboidratos indigestíveis, em particular a quantidade de oligossacarídeos (rafinose e estaquiose), porque as enzimas endógenas podem ter acesso limitado aos nutrientes presos nas paredes celulares, limitando a utilização de energia e a digestibilidade dos nutrientes (SLOMINSKI & CAMPBELL, 1990; CASTELL et al., 1996; KOCHER et al., 2003).

É provável que as melhorias em Energia Metabolizável Aparente (EMA) (corrigida pelo balanço de nitrogênio) para frangos alimentados com dietas baseadas em FS de diferentes fontes sejam atribuídas a diferenças na composição de carboidratos. Normalmente, o FS possui aproximadamente 10% de açúcares livres (CHOCT et al., 2010), 6% de PNAs solúvel, 18–21% de PNAs insolúvel e menos de 1% de amido (BACH KNUDSEN, 1997). É relatado que o farelo de soja obtido em um processo onde a soja foi previamente descascada e consequentemente resultando em um produto com maior teor de proteína bruta do que um farelo de soja convencional, possui uma energia metabolizável mais alta e contém menos fibras e cinzas em cerca de 4% do que o farelo de soja produzido de soja não descascada (SWICK, 1995, 1998).

Os oligossacarídeos no FS podem afetar a utilização de energia também devido à perda de água no lúmen devido à sua natureza hidrofílica e aumentar a colonização de microrganismos no trato gastrointestinal, levando ao aumento da produção de excretas (KOCHER et al., 2003).

Segundo CHOCT (2001), os frangos não digerem bem os carboidratos estruturais de modo que a digestão é realizada pelos microrganismos dos cecos. Entretanto, a fermentação cecal não é significativa, em razão da morfologia dos cecos das aves.

A diferença no desempenho de frangos de corte considerando FS com variados teores de PB foi observado no estudo conduzido por GERBER et al. (2006), no qual, analisando três FS com três diferentes teores de PB (44%, 46% e 48%), não encontraram diferenças significativas para consumo de ração (CR), peso corporal (PC), ganho de peso (GP) e conversão alimentar (CA) no período de 1 a 7 dias de idade. Para o período de 8 a 21 dias, quando foram utilizadas as dietas iniciais, houve melhora no GP ($P<0,001$) dos frangos do tratamento FS48%. Considerando o período total de crescimento inicial (1 a 21d), observou-se o mesmo CR nos três tratamentos, porém com maiores GP e PC, além de melhor CA para os frangos submetidos ao tratamento FS48%, comprovando que o uso de FS com maior nível proteico na formulação de dietas até os 21 dias proporcionou melhor resultado. Os menores conteúdos de FB (3,07 e 4,70% e 2,70 e 3,98% para as respectivas fases) da dieta com FS48%, em relação àquela com FS44%, pode explicar o melhor aproveitamento da energia pelos frangos que receberam o FS48%.

Este resultado é similar àquele relatado por NETO et al. (1996), que, utilizando dois FS (FS45,5% PB e FS48% PB) em dietas para frangos de até 21 dias de idade, não observaram diferença para GP e CR, mas notaram melhora na CA para os frangos do tratamento com FS de maior teor proteico (1,46 para FS 48% e 1,54 para o FS45,5%). PARK et al. (2002), também verificaram melhores resultados zootécnicos para frangos alimentados com FS 48,3% PB em comparação aos do tratamento com FS 45,2% PB.

Os dados da meta-análise publicada por IBÁÑEZ et al. (2020) (TABELA 1), comparando farelos de soja produzidos em diferentes países, sugerem que a composição química, a qualidade da proteína e o valor nutritivo do FS variam conforme o país de origem da soja. Neste estudo, em média, os FS do Brasil apresentaram maior teor de PB, FDN e rafinose do que os FS da Argentina e dos EUA, enquanto que o FS da Índia apresentou maior teor de cinzas, rafinose e FDN. Os FS dos EUA tinham mais sacarose e estaquiose, mas menos rafinose. Apesar do menor teor de PB, o FS dos EUA apresentou conteúdo energético semelhante ou até superior para aves e suínos do que o FS do Brasil, sugerindo maior digestibilidade proteica do FS dos EUA. Consequentemente, matrizes diferentes devem ser usadas na formulação de rações

para FS comercial obtido de grãos de diferentes origens e regiões, mesmo quando produzidos dentro de um mesmo país continental como o Brasil ou os EUA.

TABELA 1. COMPOSIÇÃO QUÍMICA (%) DE FARELOS DE SOJA DE DIFERENTES PAÍSES DE ORIGENS.

| | Argentina | Brasil | Estados Unidos | Índia |
|---|---|---|---|---|
| Matéria Seca | 89,1 | 89,1 | 89,1 | 89,2 |
| Proteína Bruta | $45,5^{x}$ | $47,0^{z}$ | $46,4^{y}$ | $46,3^{x,y,z}$ |
| Extrato Etéreo | $1,66^{z}$ | $1,78^{z}$ | $1,67^{z}$ | $1,11^{y}$ |
| Sucrose | $6,41^{y}$ | $5,24^{x}$ | $6,99^{z}$ | $4,19^{y}$ |
| Estaquiose | $4,15^{y}$ | $3,80^{x}$ | $4,77^{z}$ | $3,97^{x,y,z}$ |
| Rafinose | $1,15^{y}$ | $1,33^{z}$ | $0,95^{x}$ | $1,70^{y,z}$ |
| Fibra Bruta | $4,32^{x}$ | $5,03^{y}$ | $3,88^{w}$ | $6,55^{z}$ |

### 2.1.1 Fatores Antinutrientes

O FS é considerado como um ingrediente de alta digestibilidade para aves, mas ainda há possibilidades de melhorar seu valor nutricional. Este ingrediente é uma importante fonte de antinutrientes proteicos dietéticos e tem demonstrado variar consideravelmente nas suas características químicas e físicas (DOZIER & HESS, 2011; COWIESON et al., 2017).

Podemos dividir estes fatores antinutrientes em termolábeis e termorresistentes. Os principais fatores termolábeis presentes na soja são os inibidores de proteases (fatores Kunitz, que inibe a tripsina e o fator Bowman-Birk, o qual inibe a tripsina e a quimotripsina), hemaglutininas (lectina) e lipoxigenases. A complexação destes fatores antinutrientes com as enzimas pancreáticas tripsina e quimotripsina diminuem a digestibilidade da proteína. No caso dos fatores termorresistentes temos os oligossacarídeos, polissacarídeos não-amiláceos (PNAs), lisinoalaninas (formada por ligações de resíduos de lisina com cistina ou serina em meio alcalino), fatores alergênicos (glicinina e β-conglicinina) e fitato (LIENER, 1981).

#### 2.1.1.1 Fatores termolábeis e fatores alergênicos presentes no farelo de soja

Os inibidores de tripsina (IT) são o grupo mais importante de fatores antinutrientes presentes no grão de soja cru. Esses fatores antinutrientes são inativados pelo calor, o que permite o uso de inclusões maiores de FS na alimentação animal.

O processamento térmico pode não ser suficiente para inativar todos os fatores antinutrientes. Estes fatores reduzem a ação das enzimas pancreáticas, como a tripsina, em frangos de corte (CLARKE & WISEMAN, 2005). Por outro lado, um excesso de calor durante o processamento reduz a digestibilidade de Lisina e outros AA e o valor nutritivo do FS (FONTAINE et al., 2007; GONZÁLEZ-VEGA et al., 2011).

A adição de protease exógena reduz a influência negativa de antinutrientes proteicos, como os inibidores de tripsina (HUO, et al., 1993; CORTES, 2012), melhora a integridade do intestino devido à redução da alergenicidade das proteínas antigênicas, reduzindo a inflamação intestinal (COWIESON, et al., 2016b), e solubiliza componentes dos PNAs (OLUKOSI, et al., 2015). Evidentemente, a protease não tem a mesma capacidade que uma enzima xilanase para solubilizar a xilose, mas parece permitir uma solubilização preferencial das cadeias laterais substituídas por arabinose. No nível pós-cecal, a protease reduziu o fluxo de muitos dos constituintes dos PNAs, o que pode ser o resultado da ação conjunta das atividades de protease e atividade microbiana (OLUKOSI, et al., 2015).

Um modo potencial de ação da protease microbiana é superar a competição com o inibidor de tripsina (IT) por sítios ativos, melhorando assim a digestibilidade da proteína e a utilização de AA. Alternativamente, a protease microbiana também pode destruir ou inativar o IT (ADERIBIGBE et al., 2020). GHAZI et al. (2003) relataram melhora no valor nutritivo do FS quando a protease foi adicionada à dieta de frangos de corte.

#### 2.1.1.2 Ácido Fítico e Fitato

O ácido fítico (1,2,3,4,5,6 mio-inositol hexakis di-hidrogenofosfato), também chamado de hexacifosfato de inositol, é a principal forma de armazenamento de fósforo em material vegetal e é amplamente distribuído em cereais, leguminosas e farelos de sementes oleaginosas em concentrações em torno de 7-8 g / kg de milho a 50-60 g / kg em subprodutos de cereais (EECKHOUT & DE PAEPE, 1994). Entre os ingredientes vegetais, a maior concentração de inositol está presente nas leguminosas como a soja e a menor concentração é encontrada nos vegetais folhosos e no milho (CLEMENTS & DARNELL, 1980).

O ácido fítico não é normalmente encontrado no material vegetal como um ácido dissociado, mas como um sal misto (fitina) e é comumente associado com Mg, K e Ca (LOTT et al., 2000).

O fitato (mio-inositol hexafosfato), o termo utilizado com mais frequência, refere-se ao sal misto de Ácido Fítico (Ca-fitato ou Na-fitato). A fitina, por sua vez, refere-se especificamente ao complexo de mio-inositol hexafosfato com potássio magnésio e cálcio, tal como ocorre nas plantas (SELLE & RAVINDRAN, 2007).

A principal reserva de fósforo de muitas plantas é o fitato e é um antinutriente para os animais. Reduz a solubilidade das proteínas e vários cátions através de mecanismos eletrostáticos, impedindo a digestão e aumentando a perda de nutrientes endógenos (COWIESON & RAVINDRAN, 2008). Esses efeitos podem ser mediados por uma melhora na solubilidade de proteínas e também de amido na fase gástrica, reduzindo a secreção de pepsina e HCl que, por sua vez, pode aliviar a demanda de secreção de mucina (e também possivelmente de bicarbonato de sódio) mais distalmente de maneira semelhante ao mecanismo proposto para fitase (COWIESON & RAVINDRAN, 2007; SELLE & RAVINDRAN, 2007).

Os efeitos negativos do fitato podem ser substanciais, embora a magnitude exata dependa de uma variedade de fatores, incluindo a concentração de fitato, a fonte de proteína e o equilíbrio de cátions / ânions (COWIESON et al., 2011). Pode ligar-se a outros compostos pela carga negativa do oxigênio do grupo fitato. Esta carga negativa interage com íons carregados positivamente, como, por exemplo, Ca2 +, Zn2 + e Fe2 + e outros nutrientes. Esses minerais-traço ligados, portanto, não estão disponíveis para digestão, são antinutrientes (COWIESON et al., 2016a).

As dietas para frangos de corte são baseadas em ingredientes de fontes vegetais, como grãos ou derivados, com 60 a 80% de seu conteúdo de fósforo na forma de fitato e, portanto, indisponíveis para frangos de corte. As dietas típicas de frangos de corte contêm de 2,5 a 4,0 g $kg^{-1}$ de fitato (RAVINDRAN, 1995). Para outros autores (ANGEL et al., 2001), até 70% do P da dieta pode estar na forma de fitato. Sabe-se que o fitato contém P ligado que não está disponível para as aves, resultando em um aumento da exigência de P que é atendido pela adição de fontes inorgânicas de P (NRC 1994). Dietas formuladas com milho, FS e farelo de trigo contêm níveis suficientes de fitato (0,21%, 0,36% e 0,45%, respectivamente; ROSTAGNO et al., 2017) para interferir negativamente no desempenho de uma ave. Mesmo os níveis normais de fitato encontrados nas dietas à base de farelo de milho / soja podem ter um efeito negativo no desempenho do crescimento e na eficiência alimentar (LI et al., 2000).

Os animais monogástricos tem apenas uma capacidade muito limitada de hidrolisar o fitato P em alimentos de origem vegetal devido à falta de atividade da fitase endógena significativa e baixa população microbiana (SELLE & RAVINDRAN, 2007).

Além disso, em um meio aquoso, como no estômago, as extremidades carregadas negativamente das moléculas de fitato desenham uma camada de hidratação ao seu redor, competindo com outros compostos na matriz de água. Nesse contexto, é a polaridade da superfície de uma proteína e a interação agora reduzida com a água circundante, que está então reduzindo a solubilidade da proteína e, portanto, sua digestibilidade (COWIESON et al, 2016).

## 2.2 FITASE

As fitases são um grupo diversificado de enzimas que abrangem uma variedade de tamanhos, estruturas e mecanismos catalíticos. Com base no mecanismo catalítico, as fitases podem ser referidas como fitases ácidas de histidina, fitases de hélice β, fitases de cisteína ou fitases ácidas roxas (MULLANEY & ULLAH, 2003; GREINER, 2006). Dependendo do seu pH ideal, as fitases foram divididas em fitases ácidas e alcalinas e também com base no carbono no anel MIO do fitato no qual a desfosforilação é iniciada em 3-fitases, 6-fitases e 5-fitases. A maioria das fitases conhecidas até o momento pertencem à subfamília das histidinas fosfatases ácidas e não precisam de nenhum cofator para uma atividade ideal.

A fitase exógena foi estabelecida como suplemento alimentar para hidrolisar o ácido fítico (mio-inositol 1,2,3,4,5,6-hexakis [fosfato di-hidrogenado]; InsP6) e seus sais, com o objetivo de aumentar a utilização da P fítico para animais (SELLE et al., 2012).

Uma fitase alimentar eficaz deve degradar IP6 e IP5 em uma taxa rápida, enquanto a degradação de fosfatos de inositol mais baixos é menos importante. Fosfatos de inositol mais baixos, como IP4 e IP3, ligam-se a menos minerais e aminoácidos e também são mais solúveis. Também é possível que seja mais facilmente degradado pelas fosfatases do intestino delgado. Portanto, é mais vantajoso que em um pool de substratos a fitase degrada os fitatos IP6 e IP5 antes de IP4 e IP3. O P máximo será igual a 5/6 vezes o conteúdo de fitato na ração. No entanto, as fitases hidrolisam completamente os fitatos se houver tempo suficiente em um substrato puro. Mas este não é o caso em condições digestivas de animais vivos (COWIESON, et al, 2016a).

Testes *in vivo* consistentes e com base científica nas espécies e rações relevantes são a melhor maneira de determinar o valor de uma fitase de maneira consolidada. Os valores da matriz são uma forma de expressar o efeito, de forma que possa ser aplicado em programas de formulação de ração de menor custo.

### 2.2.1 Unidades de fitase

As unidades de fitase descrevem a atividade da enzima sob condições de reação definidas (por exemplo, pH, temperatura de incubação, substrato, concentração de substrato e sistema tampão). A definição das unidades é parte integrante do cientista para estudar as características das enzimas. Mas também para o controle de qualidade de produtos comerciais unidades bem definidas são necessárias, porque o conteúdo do produto deve corresponder à declaração do rótulo (RUCKEBUSCH & GLITSOE, 2013).

Os ensaios de atividade enzimática - e, portanto, as unidades de fitase - são então determinados em condições laboratoriais bem definidas, que estão longe da aplicação final em animais. Portanto, os ensaios de enzimas podem fornecer informações valiosas sobre as características das enzimas, mas não podem ser usados como a única ferramenta para prever a eficácia das fitases *in vivo* (RUCKEBUSCH & GLITSOE, 2013)..

No caso das fitases, os principais fabricantes têm trabalhado juntos na padronização do procedimento analítico para medir a atividade em produtos de enzima e em amostras de ração. Isto foi feito sob a supervisão da FEFAN (associação da União Europeia que reúne operadores de aditivos para ração e premixes). O método padrão foi avaliado em um estudo entre laboratórios, em cooperação com o CRL, Laboratório de Referência da Comunidade da Comissão Europeia. Finalmente, o método tornou-se um padrão ISO (Organização Internacional para Padronização). Resumindo, uma unidade de fitase (U) é a quantidade de enzima que libera 1 micromol de fosfato inorgânico por minuto, sob condições de laboratório especificadas: isto é, de uma solução de fitato sódico purificado (5 mMol) em pH 5,5 e a 37°C (RUCKEBUSCH & GLITSOE, 2013).

### 2.2.2 Ação da fitase sobre o fitato

A desfosforilação do fitato pela fitase ocorre de maneira gradual (SELLE & RAVINDRAN, 2007). Dentro do tempo e das restrições ambientais no intestino do frango, essa desfosforilação é limitada à inibição do produto (talvez relacionada a alterações de pH à medida que o ácido fosfórico é produzido) e a uma taxa inerentemente menor de hidrólise dos ésteres de polifosfato de inositol de menor peso molecular (GREINER et al., 2000; SELLE & RAVINDRAN, 2007).

Quando o fitato é hidrolisado, seus efeitos inibitórios são eliminados (KORNEGAY, 2001), com a magnitude da resposta da fitase mais significativa com o aumento dos níveis de inclusão nas dietas, provavelmente devido à maior degradação do fitato. Sabe-se que a degradação do fitato está correlacionada com grandes aumentos na retenção de P, concentração de cinzas da tíbia, ganho de peso, consumo de ração, eficiência alimentar, retenção de nitrogênio, energia metabolizável aparente e retenção de Ca, os quais são mais pronunciados com um alto nível de inclusão de fitase na dieta (SELLE & RAVINDRAN, 2007).

### 2.2.3 Doses crescentes de fitase

O termo "superdosagem de fitase" não é universalmente entendido, aplicado ou aceito. Para alguns, pode ser interpretado como um aumento modesto nos níveis de inclusão de fitase com o deslocamento apropriado de vários nutrientes na formulação da ração. Para outros, é o uso de fitase “on top” na formulação e, para outros, pode ser uma estratégia mais complexa envolvendo o uso de doses maiores de fitase para acomodar a substituição de fontes proteicas alternativas mais baratas (COWIESON et al, 2013a). Os mesmos autores, ao chegar a essa ampla definição, reconhecem que descrever a superdosagem em termos de unidades adicionadas por quilograma de alimento pode ser enganoso, pois diferentes produtos podem variar em definições de unidades, metodologias de ensaio, entre outros fatores, e também que a implementação bem-sucedida de uma estratégia de superdosagem pode ser restringida por uma série de fatores, incluindo altos níveis de cálcio e sódio (ou cloreto) na dieta, concentrações de fitato, uma proporção maior de fitato total presente em uma forma pouco solúvel e fatores gerais de criação de animais.

Outra definição importante é a proposta por COWIESON et al (2016a), no qual a 'nutrição livre de fitatos' é definida como a remoção enzimática rápida e completa de todos os ésteres de alto peso molecular do ácido fítico (IP6, IP5 e IP4) pelo uso de um ou mais enzimas

exógenas, potencializadas por alterações estratégicas na densidade de nutrientes da dieta e a subsequente desfosforilação desses ésteres inferiores para liberar fosfato e mio-inositol por fosfatases endógenas.

Especificamente, a taxa de remoção do fitato, o efeito sobre a solubilidade da proteína, carboidrato e vários íons, os ésteres e isômeros gerados, a extensão da alta concentração de tecidos fisiológicos da mio-inositolina e o efeito desses elementos na saúde e nutrição dos animais devem ser considerado simultaneamente com valores de matriz e formulação de menor custo, além de depender da dosagem da fitase, fonte do fitato, atribuições atuais de valor da matriz e, possivelmente, da proporção de fitato: proteína, levando a suposição de mais fitato significa que teremos melhores efeitos da fitase é provavelmente simplista demais (COWIESON et al, 2016aa).

Uma estratégia utilizada em rações de frango de corte é a descrita por COWIESON et al, 2013a, no qual a superdosagem de fitase equivale a 3 vezes a dose normalmente recomendada e mantendo a matriz de nutrientes recomendadas pelos fornecedores na dose standard, aplicada a partir de um dia de idade. A inclusão extra de enzima não se destina a reduzir o custo da dieta, mas sim melhorar a taxa de conversão alimentar e o ganho de peso corporal através da eliminação do fitato.

As informações sobre o efeito do nível de superdosagem de fitase na digestibilidade dos nutrientes dos alimentos individuais são importantes para o desenvolvimento dos valores da matriz nutritiva dos alimentos quando eles são incluídos em dietas superdosadas com fitase (WOYENGOA & WILSON, 2019). Embora a concentração de fitato em uma dieta necessária para obter uma resposta de 'superdosagem' não seja conhecida, é provável que exista um limite específico sobre o qual as respostas de fitase sejam elevadas, ou justificadas concentrações mais elevadas de inclusão de fitase (COWIESON et al, 2016a).

#### 2.2.3.1 Mio-Inositol

O Mio-Inositol (MIO) é um álcool de açúcar cíclico com uma fórmula semelhante à glicose e é o núcleo do ácido fítico. A atenção mudou recentemente da liberação de P e do efeito antinutritivo reduzido do fitato para o papel do MIO na resposta à fitase (COWIESON et al., 2014).

O papel do MIO na nutrição não é claro e é uma área ativa de pesquisa, particularmente em dietética humana. No entanto, descobriu-se que MIO é um mimético da insulina e, portanto, pode regular o transporte de glicose, a gliconeogênese e a deposição de proteína (YAMASHITA et al. 2013).

Embora as espécies aviárias geralmente não tenham GLUT4 (o principal transportador sensível à insulina em mamíferos), várias aves (incluindo frango de corte) mostraram ser responsivas à insulina (SWEAZEA & BRAUN, 2006). Este mecanismo pode explicar por que a adição de fitase - particularmente em altas concentrações de inclusão - tem benefícios positivos no GP e na relação de CA que se estendem para além da soma dos efeitos na digestibilidade de nutrientes.

De maneira geral, o MIO administrado por via oral mostrou recentemente que melhora o desempenho de pintos de corte (COWIESON et al. 2013b; ZYLA et al. 2013). Por exemplo, COWIESON et al. (2013b) descobriram que a adição de 0,15% de MIO às dietas de frangos com base em trigo, milho, farelo de soja e colza melhorou a taxa de conversão alimentar (CA) em ~ 7–9 pontos em dois experimentos separados.

Além disso, a remoção dos impedimentos nutricionais que o fitato introduz e a liberação uniforme do MIO pode não resultar necessariamente em um melhor desempenho *in vivo*, a menos que as concentrações de aminoácidos digestíveis e energia sejam adequadas para promover o crescimento adicional (COWIESON, et al, 2016a).

### 2.2.4 Efeitos da fitase sobre a mineralização óssea

A formação óssea é importante durante o crescimento inicial e é altamente dependente da nutrição (SHAW et al, 2009). Na avicultura, o alto desempenho está associado à mineralização óssea adequada, fundamental para apoiar o grande desenvolvimento muscular preconizado pela recente evolução genética na produção. Frangos de corte com deficiência no desenvolvimento podem sofrer fraturas ósseas durante a produção, transporte e abate, potencialmente levando a perdas consideráveis pelas carcaças descartadas no matadouro (CARDOSO et al., 2010). Assim, a deposição óssea adequada afeta diretamente a produção e o rendimento da carne.

Historicamente, a cinza óssea tem sido usada para avaliar os requisitos de P com base no grau de mineralização. Normalmente, o aumento da cinza óssea está associado ao aumento da quantidade de P disponível (MITCHELL & EDWARDS JR, 1996). REICHMANN & CONNOR (1977) determinaram que o conteúdo mineral ósseo tem um efeito direto na força óssea; assim, a força de ruptura ou força de cisalhamento pode ser usada como uma alternativa à cinza para indicar o status P.

No estudo conduzido por KIARIE et al, 2015, a resposta da fitase no teor de cinzas da tíbia foi linear ($p < 0,01$) e quadrática ($p = 0,02$) como resultado de aves que receberam Controle Negativo + 2000 U apresentando maior teor de cinzas da tíbia (8%) em relação às aves alimentadas com Controle Negativo + 250 U. No mesmo estudo, a resposta da fitase foi linear ($p = 0,01$) para as cinzas dos dedos dos pés.

O Índice de Seedor (IS) está diretamente relacionado à densidade óssea, ou seja, à medida que o SI aumenta, maior a densidade óssea e, assim, também a força, resistência e peso ósseo (BROCH et al, 2018)

### 2.2.5 Efeitos da fitase sobre a digestibilidade

A fitase exógena aumenta a digestibilidade de muitos nutrientes da dieta, principalmente P, que estão ligados ao fitato, que podem ser liberados e absorvidos no intestino delgado (COWIESON et al., 2011). Isso é apoiado por trabalhos demonstrando que o fitato adicionado reduz a digestibilidade de aminoácidos e a atividade enzimática endógena em frangos de carne e interfere na digestibilidade mineral por quelação com cátions (COWIESON et al., 2006; LIU et al., 2009).

A suplementação de dietas para aves com fitase em níveis mais altos (≥ 2.500 U / kg) que os níveis recomendados pela indústria (500 a 1.000 U / kg) demonstrou ter efeitos mais positivos na digestibilidade e utilização de nutrientes pelas aves alimentadas com as dietas com doses maiores de fitase (COWIESON et al., 2010).

A eficiência da absorção de P aumenta com a diminuição do nível alimentar de P (SADDORIS et al., 2010). RAVINDRAN et al. (2008) e SANTOS et al. (2008) relataram melhora na digestibilidade do Ca e de outros minerais, enquanto UM et al. (2000) não relataram melhora na digestibilidade do Ca.

A maior digestibilidade e retenção de P observadas com a adição de doses maiores em relação à menor dose de fitase parecem sugerir que a adição de maiores concentrações de fitase permite que a desfosforilação ocorra de maneira mais eficaz nas condições relativamente restritas no trato gastrointestinal da ave (KIARIE et al., 2015). Da mesma forma, COWIESON et al. (2006b) demonstraram que altas doses de fitase (> 1.200 U / kg) melhoraram a digestibilidade aparente de fitato P e a digestibilidade total de P em comparação com doses mais baixas de fitase.

WOYENGOA & WILSON (2019) suplementando a fitase a 1.500 U / kg à dieta de frango de corte à base de milho que continha fitase no nível recomendado pela indústria (1.000 U / kg) verificaram uma melhor digestibilidade ileal de Energia Bruta (EB), PB e P. Isso indica que a suplementação de fitase em níveis crescentes de inclusão (≥ 2.500 U / kg) são mais benéficos no que diz respeito à melhoria da digestibilidade ileal de EB, PB e P no milho para frangos de corte do que a suplementação de fitase no nível recomendado pela indústria.

### 2.2.6 Efeitos da fitase sobre o desempenho

Os benefícios do GP ou CA associados às doses maiores de uma fitase podem estar associados à destruição do fitato e ao fornecimento de inositol, em vez do excesso de P e Ca (WALK, et al 2015).

A suplementação de 3000 U/ kg na fase inicial (1-21 dias de idade) produziu melhorias significativas no GP de frangos de corte (Broch et al, 2018) assim como todas as variáveis de desempenho apresentaram resposta linear aos 21 dias de idade, indicando que quanto maior o nível de fitase, melhor o desempenho da ave.

No estudo conduzido por KIARIE et al (2015), a fitase melhorou linearmente ($p < 0,05$) o desempenho do crescimento, de modo que as aves que receberam o controle negativo (CN) + 2.000 U/kg apresentaram a maior melhora no GP (20%) e CA (7,4%) em relação às aves alimentadas com dieta CN sem fitase.

WALK et al (2015), incluindo sobre dosagens de fitase em rações de frango de corte observaram uma hidrólise quase completa de IP6, um aumento na concentração de inositol na moela e um melhor desempenho no crescimento de frangos de corte e CA, sem ter um efeito

substancial sobre a cinza da tíbia além daquelas de uma dieta inadequada em nutrientes ou de uma dieta suplementada com excesso de Ca e P.

Além disso, uma revisão de vários estudos independentes mostrou que a melhoria da suplementação de fitase na utilização de energia em frangos de corte variou de –0,7% a 5,2% (SELLE & RAVINDRAN, 2007).

## 2.3. PROTEASE

As enzimas exógenas podem não apenas promover a utilização de nutrientes dos ingredientes da ração, mas aumentar a flexibilidade nas abordagens de formulação para nutricionistas (COWIESON et al, 2016b). Também é postulado que as enzimas exógenas podem apresentar uma oportunidade para minimizar a produção de enzimas endógenas, bem como reduzir o investimento secretório, possivelmente levando a uma melhoria no desempenho (ISAKSEN et al., 2010).

Aproximadamente 70 a 75% do nitrogênio ingerido pelos animais pode ser perdido para processos metabólicos ou excretado devido principalmente à ineficiência no metabolismo dos AA absorvidos ou à oxidação do AA alimentado com excesso de necessidades (NAHM, 2007)

Nas rações para aves, proteínas não digeridas nas fezes são convertidas em compostos prejudiciais, como amônia, nitratos e óxido nitroso (HALAS et al., 2010; WEIR et al., 2017). Como PARSONS et al. (1997), demonstraram que a digestibilidade da PB e do AA relatada para aves indica que quantidades valiosas de proteína passam pelo trato gastrointestinal (TGI) sem serem completamente digeridas. De acordo com OXEMBOLLl et al. (2011) os impactos da poluição ambiental podem ser reduzidos mesmo com a suplementação de protease “on top” (sem matriz nutricional). No entanto, esse benefício fica mais evidente quando a quantidade de proteínas na dieta é reduzida.

O foco da protease na nutrição animal é a redução do custo da ração mediada pela redução da concentração de proteína bruta e deslocamento de fontes de proteína caras na dieta com ingredientes de menor custo de inclusão (COWIESON et al, 2015). Reduzir o teor de PB nas dietas de frangos de corte representará um risco de desempenho de crescimento reduzido, pois à medida que o nível de PB na dieta diminui, os aminoácidos essenciais também diminuem. Quando o conteúdo de PB é reduzido, os níveis de glicina e serina, entre outros AA não essenciais, também diminuem (DEAN et al., 2006).

Seguindo o trabalho pioneiro de Lewis e Baker na década de 1950 (LEWIS et al. 1955; BAKER et al. 1956), que foram capazes de mostrar o potencial de fontes de protease exógena em suínos, os benefícios específicos da protease para o FS não foram demonstrados de forma conclusiva até início da década de 1990 (COWIESON & ROOS, 2016). Estudos relataram que as proteases endógenas sintetizadas e liberadas no TGI podem ser suficientes para otimizar a utilização de proteína alimentar (LE HEUROU-LURON et al., 1993; NIR et al., 1993).

A protease microbiana é relativamente nova no mercado global de enzimas para rações (COWIESON & ROOS, 2016). Além disso, pode-se admitir que a protease exógena pode exibir seus efeitos benéficos indiretamente por meio da necessidade de manutenção, secreção e recuperação, no entanto, é difícil ter certeza até que novos estudos sejam realizados (BAREKATAIN et al, 2013).

A protease exógena oferece um valor considerável na redução do custo da alimentação, na sustentabilidade ambiental e no aprimoramento do desempenho animal, e esse valor provavelmente aumentará no futuro, à medida que todo o potencial desta enzima alimentar for realizado (COWIESON et al, 2018).

### 2.3.1 Mecanismo de ação das proteases

Pesquisas anteriores constataram que as proteases endógenas do trato gastrointestinal podem não atender às necessidades de crescimento das aves, por isso é essencial melhorar o suporte externo para maior utilização de proteínas (SELIM et al., 2016).

O principal mecanismo de ação das proteases exógenas inclui a redução da gravidade do efeito dos antinutrientes proteicos, e. inibidores de tripsina ou proteínas antigênicas, melhora na solubilidade e digestibilidade da proteína dietética (e nutrientes adjacentes, como gordura), redução no fluxo de proteína endógena no intestino, e. mucina e vários efeitos benéficos na saúde intestinal, e. aumentam a integridade da junção firme (que ajudam na regulação da função de barreira ou permeabilidade intestinal) e a resistência à tração intestinal (COWIESON & ROOS, 2016).

A protease exógena regula negativamente a expressão de mucina-2 no jejuno de aves alimentadas com dietas com aumento da concentração de IT na dieta. Isso está de acordo com relatórios (COWIESON & ROSS, 2014; COWIESON et al., 2017) que observaram um efeito

benéfico da protease exógena na secreção de mucina no intestino do frango. Isso geralmente está associado a uma redução na secreção de mucina ou a um aumento na recuperação autolítica de mucina ou ambos. COWIESON et al. (2017) sugere um efeito da protease exógena na modulação da absorção de proteínas, o que também pode ser devido à disponibilidade de mais AA liberado no intestino.

Para ADERIBIGBE et al (2020), as melhorias na atividade da tripsina e quimiotripsina intestinal por causa da suplementação com protease sugerem uma complementaridade ou aditividade entre as proteases exógenas e endógenas. Isso ocorre porque a atividade enzimática no intestino delgado é composta por componentes exógenos e endógenos. Os mesmos autores mostraram que o aumento do IT na dieta afetou o desempenho do crescimento e a digestibilidade do AA e que a administração de protease exógena melhora essas respostas nas aves e os dados deste estudo sugerem que a eficácia da protease exógena na dieta pode ser independente da concentração de IT na dieta.

É importante ressaltar que a magnitude e a consistência da resposta à adição da enzima está ligada à digestibilidade inerente da dieta à qual ela é adicionada com efeito elevado em ingredientes ou nutrientes com menor digestibilidade e vice-versa (COWIESON, 2010). Métodos de análise e características de protease são os principais fatores que impedem a comparação entre alguns estudos (VIEIRA et al, 2016).

### 2.3.2 Efeitos da protease sobre a digestibilidade

A protease exógena é uma ferramenta eficaz para promover a digestibilidade do AA em frangos de corte e pode fazê-lo em maior extensão do que no caso da fitase. A maioria da literatura publicada recentemente sobre proteases exógenas nas dietas de animais monogástricos tem sido fortemente orientada para efeitos na digestibilidade de AA e PB (COWIESON & ROOS, 2014). Assim, os efeitos benéficos da protease exógena podem se originar de uma variedade de fontes, incluindo melhor digestibilidade da proteína dietética e nutrientes associados na matriz alimentar, redução da perda de proteína e energia endógena e respostas fisiológicas alteradas aos antinutrientes, como lectinas, proteínas antigênicas e inibidores de tripsina (COWIESON et al, 2015). A suplementação com proteases proporciona maior degradação da conglicinina e da β-conglicinina presentes na soja crua (GRAHAM et al., 2002); ambos considerados proteínas alergênicas (ZILIC et al., 2011).

COWIESON & ROOS (2014) conduziram uma meta-análise do efeito da protease exógena na digestibilidade ileal aparente de aminoácidos em 25 estudos conduzidos independentemente e observaram que a magnitude do efeito estava diretamente ligada à digestibilidade inerente dos AA nos grupos de controle. Essa relação destaca a importância do controle de qualidade na seleção e uso de matérias-primas e sugere que a protease microbiana reduzirá a variância na digestibilidade da proteína na nutrição animal. Os mesmos autores observaram que a protease foi mais eficaz em ingredientes em que a digestibilidade dos aminoácidos era baixa e houve um declínio na resposta média à medida que a digestibilidade ileal dos aminoácidos aumentou além de 90 e observaram também que havia uma correlação significativa entre o padrão de resposta nas melhorias de digestibilidade de aminoácidos com uma protease exógena e o perfil de aminoácidos da mucina intestinal. Essa correlação é única em comparação com proteínas endógenas alternativas e sugere que parte do benefício na digestibilidade aparente de aminoácidos associada ao uso de protease em suínos e aves está relacionada a uma redução na perda de mucina do íleo.

Um modo potencial de ação da protease microbiana é superar a competição com o inibidor de tripsina (TI) por sítios ativos, melhorando assim a proteína geral e a utilização de AA. Alternativamente, a protease microbiana também pode destruir ou inativar o TI (ADERIBIGBE et al., 2020). O efeito da protease exógena na utilização da proteína de soja pode ser confundido pelo nível e ou método de processamento.

As proteases usadas como aditivos para rações podem complementar os efeitos da pepsina endógena e das enzimas pancreáticas, aumentando a hidrólise e a solubilização da PB *in vitro* e *in vivo* (FRU-NJI et al., 2011).

BERTECHINI et al. (2009) relataram aumento da digestibilidade verdadeira de AA para FS e CARVALHO et al. (2009) relataram aumento da digestibilidade verdadeira de AA para milho, na presença de uma protease exógena. KONG & ADEOLA (2013), considerando apenas milho, FS ou uma mistura de milho e FS para frangos de corte observaram que os valores medidos na mistura de milho e FS, quando baseados nos valores de digestibilidade aparente para as matérias-primas individuais, foram significativamente maiores do que o previsto.

ANGEL et al. (2011) também relataram que uma protease exógena em qualquer concentração aumentou a digestibilidade aparente de Arginina, Isoleucina, Lisina, Treonina, Histidina, Cisteína e Serina em frangos de corte. FREITAS et al. (2011) demonstraram um

aumento de 1,8% na digestibilidade da PB quando a protease foi adicionada às dietas ricas em proteínas (7% a mais do que o nível recomendado de PB), enquanto uma melhora de 1% foi observada nas dietas de baixa PB.

O AA derivado da atividade de degradação de PB da protease deve estar disponível para absorção intestinal, dependendo, em parte, da afinidade entre a enzima e o substrato (FREITAS et al., 2011). COWIESON et al. (2016b) confirma que a protease exógena pode influenciar a dinâmica digestiva por meio da secreção alterada de mucina intestinal e alteração da ênfase no transporte de aminoácidos.

As proteases exógenas também mostraram aumentar a digestibilidade de energia e gordura em dietas para aves, o que sugere um aumento genérico da solubilidade de nutrientes e da digestão após sua adição (COWIESON & ROOS, 2016). ANGEL et al. (2011) encontraram 6% de melhora na digestibilidade da PB de uma dieta de baixa densidade proteica (dieta com milho - FS).

Em outro estudo, a adição de protease exógena aumentou a digestibilidade ileal de amido, principalmente na dieta com menor concentração de proteínas e aminoácidos digestíveis (+ 3,9%) (COWIESON et al, 2018). Um aumento na digestibilidade do amido ileal com adição de protease exógena também foi relatado por AMERAH et al. (2017) em dietas à base de milho e FS. Como a protease exógena não atua no amido per se, mas pode aumentar a digestibilidade do amido indiretamente, melhorando a solubilidade das matrizes de amido / proteína, é lógico que um aumento no amido solúvel no intestino, mediado pela atividade da protease exógena, necessitaria de uma regulação positiva dos genes responsáveis pela digestão posterior da dextrina (COWIESON et al, 2018). Na verdade, é possível que a disponibilidade de aminoácidos nas seções apropriadas do intestino possa ter estimulado a dinâmica para a digestão do amido (LIU & SELLE, 2015).

Embora um aumento na digestibilidade da energia ileal seja esperado, proporcional aos aumentos na digestibilidade da proteína, os efeitos relatados são substanciais e se estendem além de uma magnitude que pode ser facilmente explicada com base na soma aritmética da contribuição aminoácidos. Por exemplo, FRU-NJI et al. (2011) observaram um aumento no EMA de 51 a 212 kcal / kg em frangos (dia 36) alimentados com dietas à base de milho e FS. FREITAS et al. (2011) observaram aumentos no EMA de até 194 kcal / kg quando a protease exógena foi adicionada a uma dieta à base de milho e FS (dia 42). COWIESON et al. (2016b)

observaram um aumento no EMA de 28 a 131 kcal / kg quando uma protease exógena foi adicionada a dietas à base de milho / FS ou milho / canola para frangos de corte.

A separação do efeito da protease na digestibilidade direta ou métricas de metabolizabilidade dos efeitos nas métricas "líquidas", como o investimento de energia na manutenção do intestino ou na síntese de proteínas endógenas, é relevante quando se trata de explicação das mudanças na taxa de crescimento animal e eficiência (COWIESON et al, 2018).

### 2.3.3 Efeitos da protease sobre o desempenho

Os trabalhos pioneiros de LEWIS et al. (1955) e BAKER et al. (1956) e pesquisas subsequentes publicadas por CASTANON & MARQUARDT (1989), HUO et al. (1993), GUENTER et al. (1995), HESSING et al. (1996), SIMBAYA et al. (1996), ROOKE et al. (1998), THORPE & BEAL (2001) e ODETALLAH et al. (2003, 2005) focou no efeito da protease exógena no desempenho (ganho de peso e FCR) e no efeito benéfico da protease em antinutrientes proteicos, por exemplo, inibidores de tripsina e lectinas.

Não há uma conclusão universalmente aceita sobre a interação entre a idade das aves e a utilidade da protease exógena (COWIESON & ROOS, 2016; ODETALAH, et al, 2003; ODETALLAH, et al, 2005). No entanto, uma ave jovem pode se beneficiar em eixos, como aumento de um trato intestinal imaturo ou por meio de uma redução na suscetibilidade a proteínas antigênicas ou antinutrientes proteicos. Uma ave mais velha com maior ingestão de ração e massa visceral reduzida em relação ao peso corporal (e taxas de aumento de proteína rápida) pode se beneficiar mais na consistência do suprimento de aminoácidos digestíveis e energia.

No estudo conduzido por BAREKATAIN et al. (2013), no qual foi analisado a interação entre protease e xilanase em dietas de frangos de corte contendo DDGS de sorgo, encontrou melhorias marcantes no ganho de peso corporal e na eficiência alimentar ao longo de todo o período de alimentação.

ADERIBIGBE et al (2020), ao estudar o desempenho zootécnico e respostas de digestibilidade de AA de frangos de corte alimentados com dietas contendo inibidor de tripsina de soja purificado e suplementado com uma protease exógena, a suplementação das dietas com protease exógena resultou em aumento no ganho de PV ($P < 0,01$) e na relação ganho /

alimentação (P <0,05) em todas as fases experimentais. Segundo COWIESON et al. (2019a) a adição de protease ao controle negativo resultou em um aumento significativo no GP em comparação com as aves que foram alimentadas com o controle negativo (dia 1-5, P = 0,059; dia 1-9, P <0,05) e esses valores foram comparáveis àqueles que recebeu o controle positivo, comprovando a eficácia de uma protease exógena mesmo na presença de uma alta concentração de fitase exógena no desempenho de crescimento de frangos de corte. Por outro lado, GHAZI et al. (2002); FREITAS et al. (2011) relataram uma falta de efeito positivo da protease exógena no ganho de peso vivo, embora a conversão alimentar tenha melhorado significativamente.

Essas melhorias nas respostas de desempenho de crescimento também podem ser atribuídas às melhorias observadas na digestibilidade do AA (COWIESON et al, 2019b). ANGEL et al., 2011, usando uma protease como único tratamento, o desempenho *in vivo* e a digestibilidade da PB em frangos de corte também foram restaurados.

Isso ocorre porque as aves que atingem mais prontamente sua meta de ingestão de AA digestíveis melhoraram a eficiência alimentar, em comparação com os controles correspondentes (ADERIBIGBE et al, 2020).

Pode-se concluir que uma protease exógena é capaz de melhorar significativamente o desempenho de frangos de corte alimentados com uma dieta convencional à base de milho / FS, mesmo quando reduzida na formulação proteína e aminoácidos digestíveis (COWIESON et al, 2018). Além disso, esses efeitos benéficos foram evidentes, apesar das dietas de controle serem formuladas com xilanase exógena e uma alta concentração de fitase exógena (COWIESON et al, 2018).

## 2.4 SINERGIA ENTRE ENZIMAS EXÓGENAS

Em geral, a protease tem sido usada principalmente em combinação com outras enzimas para melhorar o desempenho de frangos de corte (MARSMAN et al., 1995; COWIESON et al., 2006a; COWIESON & RAVINDRAN, 2008).

Um dos argumentos contrários a utilidade da protease exógena na nutrição de monogástricos é que os efeitos podem ser retardados pela presença de enzimas adicionais na formulação, por exemplo, fitase ou xilanase (LEE et al., 2018; WALK et al., 2018). A controvérsia é que, devido aos aumentos da digestibilidade associados às enzimas já incluídas

nas dietas, o efeito de enzimas terciárias, como protease, podem ser de difícil visualização ou os sinais de efeito diminuídos.

Em geral, estas classes de enzimas não competem umas com as outras pelo substrato mas a resposta cumulativa à sua adição para uma dada dieta tende a ser subaditiva devido à sobreposição em efeito nos nutrientes libertados, e. energia, aminoácidos ou fósforo (COWIESON, 2010).

KALMENDAL & TAUSON (2012) observaram uma melhora na CA de frangos de corte alimentados com dietas suplementadas com xilanase e protease individualmente ou em combinação, sem efeito subaditivo das duas enzimas.

Para BAREKATAINA et al, (2013), a xilanase sozinha não afeta a digestibilidade do AA. Neste mesmo trabalho estudando a interação entre protease e xilanase em dietas com DDGS de sorgo, observou a interação entre xilanase e protease para a quantidade total de PNAs insolúveis ($P < 0{,}01$), arabinose ($P < 0{,}05$), xilose ($P < 0{,}05$) e galactose ($P < 0{,}01$) no qual a redução da quantidade total de PNAs insolúvel, arabinose e xilose causadas pela adição de xilanase foram comprometidas quando xilanase e protease foram adicionadas à dieta simultaneamente.

O efeito sinérgico de protease e carboidrases foi avaliado em dietas à base de trigo-canola por SIMBAYA et al. (1996), que demonstrou uma melhora dose-resposta na eficiência alimentar por uma combinação de fitase, protease e carboidrases, em comparação com a suplementação individual de qualquer uma das enzimas. KOCHER et al. (2002) demonstraram um aumento na digestibilidade fecal de PNAs quando dietas à base de FS foram suplementadas com uma mistura de protease e carboidrases, mas nem a digestibilidade da proteína nem o desempenho de crescimento de frangos de corte foram afetados. No entanto, o mecanismo de interação entre essas duas enzimas permanece obscuro até que o modo de ação da protease seja totalmente compreendido.

Os efeitos sinérgicos da fitase e da protease na digestibilidade de treonina, cisteína e prolina exigem mais atenção, especialmente considerando o fluxo de proteína endógena, transporte de peptídeo e partição de sódio (COWIESON et al, 2020).

Uma hipótese levantada por LEE et al. (2018) era que a protease exógena melhoraria significativamente a digestibilidade dos aminoácidos em dietas que contenham xilanase e fitase, independentemente dos níveis adequados ou reduzidos de proteínas e AA, e que aumentos na

EMA e Energia Líquida (EL) também se declarariam. COWIESON et al. (2018) sugere que a protease exógena é capaz de aumentar significativamente a digestibilidade ileal aparente de vários aminoácidos importantes, mesmo em uma dieta que contém carboidrase e uma alta concentração de fitase.

OLUKOSI et al. (2008) observaram apenas pequenas mudanças (ou mesmo negativas) no EMA quando uma dieta à base de milho e trigo foi suplementada com fitase ou uma combinação de carboidrase e protease e fornecida para frangos de corte, mas ao mesmo tempo observou aumentos significativos em EL. É importante notar que OLUKOSI et al. (2008) observaram uma correlação mais forte entre o peso corporal das aves e EL do que foi o caso para EMA. Isso sugere que o efeito das enzimas sobre a EL pode ser mais indicativo do valor "verdadeiro" da enzima no que diz respeito à ave do que as mudanças no EMA.

Novos estudos devem se concentrar na aditividade do efeito das enzimas alimentares em matérias-primas individuais e se esses valores podem ser traduzidos de forma confiável para alimentos completos. É possível que um fator de correção para a influência de uma enzima no AA endógeno ou nas perdas de energia seja necessário para garantir que o valor da enzima não seja subestimado nem superestimado (COWIESON et al., 2019b).

Independentemente do modo de ação, os resultados mais recentes confirmam um efeito benéfico da protease exógena na digestibilidade de AA, EMA e amido em dietas práticas para frangos de corte que contêm fitase e xilanase (COWIESON et al, 2018).

## 3 REFERÊNCIAS

ADERIBIGBE, A. et al. Growth performance and amino acid digestibility responses of broiler chickens fed diets containing purified soybean trypsin inhibitor and supplemented with a mono-component protease. **Poultry Science**, Volume 99, Issue 10, October 2020, Pages 5007-5017. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.06.051. Acesso em: 18 jan. 2021.

AMERAH, A. M. et al. Effect of exogenous xylanase, amylase, and protease as single or combined activities on nutrient digestibility and growth performance of broilers fed corn/soy diets. **Poultry Science**. Apr 1;96(4):807-816. 2017. Disponível em: https://doi.org/10.3382/ps/pew297. Acesso em: 01 nov. 2020.

ANGEL, C. R. et al. Non-phytin phosphorus requirement of broilers fed a four-phytase feeding program. Pages 416–427 in **Addressing Anim. Prod. Environ**. Issues. Research Triangle Park, Durham, NC. 2001.

ANGEL, C. R. et al. Effects of a monocomponent protease on performance and protein utilization in 7-to 22-day-old broiler chickens. **Poultry Science**. Volume 90, Issue 10, 1 October. Pages 2281-2286. 2011. Disponível em: https://doi.org/10.3382/ps.2011-01482. Acesso em: 01 nov. 2020.

BACH KNUDSEN, K.E., Carbohydrate and lignin contents of plant materials used in animal feeding. **Animal Food Science Technology** 67, 319–338. 1997.

BAKER, R. O. et al. Supplementation of baby pig diets with enzymes. **Journal Animal Science** 15:1245–1245. 1956.

BAREKATAINA, M. R. et al. Interaction between protease and xylanase in broiler chicken diets containing sorghum distillers' dried grains with solubles. **Animal Feed Science and Technology**. Volume 182, Issues 1–4, 12 June 2013, Pages 71-81. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2013.04.002. Acesso em: 01 mar. 2020.

BERTECHINI, A. G. et al. Use of a protease to enhance the utilization of soybean meal amino acids by broilers. **Poultry Science** 88(Suppl. 1):69. (Abstr.). 2009.

BROCH , J. et al. High levels of dietary phytase improves broiler performance. Animal **Feed Science and Technology** 244 (2018) 56–65. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2018.06.001 Acesso em: 07 jul. 2020.

CARDOSO JÚNIOR, A. et al. Levels of available phosphorus and calcium for broilers from 8 to 35 days of age fed rations containing phytase. **Revista Brasileira De Zootecnia.** 39, 1237–1245. 2010.

CARVALHO, J. C. C. et al. Use of a protease to enhance the utilization of corn amino acids by broilers. **Poultry Science** 88(Suppl. 1):69–70. (Abstr.). 2009.

CASTANON, J. I. R.; MARQUARDT, R. R. Effect of enzyme addition, autoclave treatment and fermenting on the nutritive value of field beans (Vicia faba L.). **Animal Feed Science Technology** 26:71–79. 1989.

CASTELL, A.G.; GUENTER, W.; IGBASAN, F.A. Nutritive value of peas for nonruminant diets. **Animal Feed Science Technology** 60, 209–227. 1996.

CHOCT, M. Carbohydrate and fiber digestion in monogastric animals. **ASA Technical bulletin**. 2001.

CHOCT, M. et al. Soy oligosaccharides and soluble non-starch polysaccharides: a review of digestion, nutritive and anti-nutritive effects in pigs and poultry. **Asian Australian Journal Animal Science** 23, 1386–1398. 2010.

CLARKE, E.; WISEMAN, J. Effects of variability in trypsin inhibitor content of soya bean meals on true and apparent ileal digestibility of amino acids and pancreas size in broiler chicks. **Animal Feed Science and Technology**. 121(2):125- 138, 2005.

CLEMENTS, R. S.; DARNELL, B. Myo-inositol content of common foods: Development of a high-myo-inositol diet. **American Journal Clinical Nutrition** 33:1954–1967. 1980.

COWIESON, A. J.. Strategic Selection of Exogenous Enzymes for Corn/soy-based Poultry Diets. **The Journal of Poultry Science** 47: 1-7. 2010.

COWIESON, A. J.; ACAMOVIC, T.; BEDFORD, M. R. Phytic acid and phytase: Implications for protein utilization by poultry. **Poultry Science** 85:878–885. 2006a

COWIESON, A. J.; ACAMOVIC, T.; BEDFORD, M. R. Supplementation of corn–soy-based diets with an Escherichia coli-derived phytase: effects on broiler chick performance and the digestibility of amino acids and metabolizability of minerals and energy. **Poultry Science** 85:1389-1397. 2006b.

COWIESON, A. J. et al. Exploit benefits from 'superdosing' phytase. **Feedstuffs**, January 28, 2013a.

COWIESON, A. J. et al. The effect of microbialphytase and myo-inositol on performance and blood biochemistry of broiler chickens fed wheat/corn-based diets. **Poultry Science** 92, 2124–2134. 2013b.

COWIESON, A. J. et al. Phytate-free nutrition: A new paradigm in monogastric animal production. **Animal Feed Science and Technology** 222: 180–189. 2016a. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.10.016. Acesso em: 07 jul. 2020.

COWIESON, A. J. et al. Interactive effects of dietary protein source and exogenous protease on growth performance, immune competence and jejunal health of broiler chickens. **Animal Production Science** 57(2) 252-261. 2016b. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1071/AN15523. Acesso em: 07 jul. 2020.

COWIESON, A. J. et al. Interactive effects of dietary protein source and exogenous protease on growth performance, immune competence and jejunal health of broiler chickens. Anim. Prod. Sci. 57:252–261. 2017.

COWIESON, A. J. et al. A mono-component microbial protease improves performance, net energy, and digestibility of amino acids and starch, and upregulates jejunal expression of genes responsible for peptide transport in broilers fed corn/wheat-based diets supplemented with xylanase and phytase. **Poultry Science** Volume 98, Issue 3, Pages 1321-1332. 2018. Disponível em: http://dx.doi.org/10.3382/ps/pey456. Acesso em: 20 jan. 2020.

COWIESON, A. J. et al. Efficacy of a Mono-Component Exogenous Protease in the Presence of a High Concentration of Exogenous Phytase on Growth Performance of Broiler Chickens**.** **Journal of Applied Poultry Research**. Volume 28, Issue 3, 1 September 2019a, Pages 638-646. Disponível em: http://dx.doi.org/10.3382/japr/pfz014 Acesso em: 15 mar. 2020.

COWIESON, A. J. et al. Additivity of apparent and standardized ileal amino acid digestibility of corn and soybean meal in broiler diets. **Poultry Science** 0:1–7. 2019b. Disponível em: http://dx.doi.org/10.3382/ps/pez060 Acesso em: 15 mar. 2020.

COWIESON, A. J. et al. Toward standardized amino acid matrices for exogenous phytase and protease in corn–soybean meal–based diets for broilers. **Poultry Science**. Volume 99, Issue 6, June 2020, Pages 3196-3206 Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.psj.2019.12.071 Acesso em: 15 jan. 2021.

COWIESON, A.J., RAVINDRAN, V. Effect of phytic acid and microbial phytase on the flow and amino acid composition of endogenous protein at the terminal ileum of growing broiler chickens. **British Journal of Nutrition**. 98, 745–752. 2007.

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**. 49, 37–44. 2008.

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 of Applied Animal Nutrition** 2, e13. 2014. Disponível em: https://doi:10.1017/ jan.2014.5. Acesso em: 15 nov. 2020.

COWIESON, A. J.; ROOS, F. F. Toward optimal value creation through the application of exogenous monocomponent protease in the diets of non-ruminants. **Animal Feed Science and Technology**. Volume 221, Part B, November 2016, Pages 331-340. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.04.015 Acesso em: 15 mar. 2020.

COWIESON, A. J.; WILCOCK, P.; BEDFORD, M. R. Super-dosing effects of phytase in poultry and other monogastrics. **Worlds Poultry Science Journal** 67: 225-236. 2011.

CROMWELL, G.L. et al. Variability among sources and laboratories in nutrient analyses of corn and soybean meal. **Journal Animal Science** 77, 3262–3273. 1999.

DEAN, D. W.; BIDNER, T. D.; SOUTHERN, L. L. Glycine sup-plementation to low protein, amino acid-supplemented diets sup-ports optimal performance of broiler chicks. **Poultry Science** 85:288–296. 2006.

DE COCA-SINOVA, et al. Apparent ileal digestibility of energy, nitrogen, and amino acids ofsoybean meals of different origin in broilers. **Poultry Science**. 87, 2613–2623. 2008.

DOZIER III, W. A.; HESS, J. B. **Soybean Meal Quality and Analytical Techniques, Soybean and Nutrition,** Prof. Hany El-Shemy (Ed.), ISBN: 978-953-307-536-5, InTech, (2011). Disponível em: http://www.intechopen.com/books/soybean-and-nutrition/soybean-meal-quality-and-analytical-techniques. Acesso em: 07 jul. 2020.

EECKHOUT, W.; DE PAEPE, M. Total phosphorus, phytate-phosphorus and phytase activity in plant feedstuffs. **Animal Feed Science Technology**. 47, 19–29. 1994.

FONTAINE, J. et al. Effect of heat damage in an autoclave on the reactive lysine contents of soy products and corn distillers dried grains with solubles. Use of the results to check on lysine damage in common qualities of these ingredients. **Journal Agriculture Food Chemistry** 55, 10737–10743. 2007.

FREITAS, D.M. et al. Performance and nutrient utilization of broilers fed diets supplemented with a novel monocomponent protease. **Journal Applied Poultry Research**. 20, 347–352. 2011.

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

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

GHAZI, S. et al. O potencial para a melhoria do valor nutritivo do farelo de soja por diferentes proteases em frangos de corte e galos de corte. **British Poultry Science.** 43: 70-77. 2002.

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

GOLDFLUS, F.; CECCANTINI, M.; SANTOS, W. Amino acid content of soybean samples collected in different Brazilian states—harvest 2003/2004. **Brazilian Journal of Poultry Science**. 8, 105–111. 2006.

GONZALEZ-VEGA, J.C. et al. Amino acid digestibility in heated soybean meal fed to growing pigs. **Journal Animal Science** 89, 3617–3625. 2011.

GRAHAN, K. K. et al. The effect of enzyme treatment of soybean meal on oligosaccharide disappearance and chick growth performance. **Poultry Science**. 81(7):1014-1019, 2002.

GREINER, R. Phytate-degrading enzymes: regulation of sythesis in microorganisms and plants. In: Turner, B. L., Richardson, A. E. and Mullaney, E. J. (eds) **Inositol Phosphates: Linking Agriculture and Environment**. CAB International, Wallingford, UK, pp. 78-96. 2006.

GREINER, R.; CARLSSON, N.-G.; ALMINGER, M. L. Stereospecificity of myo-inositol hexakisphosphate dephosphorylation by a phytate-degrading enzyme of Escherichia coli. **Journal of Biotechnology**. 84:53-62. 2000.

GUENTER, W. et al. Potential for improved utilization of canola meal using exogenous enzymes. **Proceedings 9th International Rapeseed Congress**, Cambridge, UK:164–166. 1995.

HALAS, D. et al. Dietary supplementation with benzoic acid improves apparent ileal digestibility of total nitrogen and increases villous height and caecal microbial diversity in weaner pigs. **Animal Feed Science and Technology**, 160(3–4), 137– 147. 2010. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2010.07.001. Acesso em: 15 nov. 2020.

HESSING, G. C. et al. Quality of soyabean meals (SBM) and effect of microbial enzymes in degrading soya antinutritional compounds (ANC). **2nd International Soyeabean Processing and Utilization Conference**, Bangkok, Thailand:8–13. 1996.

HUO, G. C. et al. The use of enzymes to denature anti-nutritive factors in soyabean. Pages 517–521 in A. F. B. van der Poel, J. Huisman, and H. S. Saini eds., **Recent Advances of Research in Anti-nutritional Factors in Legume Seeds–Proceedings of the Second International Workshop on Anti-Nutritional Factors (ANFs) in Legume Seeds**. Wageningen, Pers, Wageningen, The Netherlands. 1993.

IBÁÑEZ, M. A. et al. Chemical composition, protein quality and nutritive value of commercial soybean meals produced from beans from different countries: A meta-analytical study. **Animal Feed Science and Technology** 267. 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2020.114531. Acesso em: 15 jan. 2021.

ISAKSEN, M.F.; COWIESON, A.J.; KRAGH, K.M. Starch- and protein-degrading enzymes: biochemistry, enzymology and charachteristics relevant to animal feed use. In: Bedford, M.R., Partridge, G.G. (Eds.), **Enzymes in Farm Animal Nutrition**. , 2nd ed. CAB, International, Cambridge, MA, USA. 2010.

KALMENDAL, R.; TAUSON, R. Effects of a xylanase and protease, individually or in combination, and an ionophore coccidiostat on performance, nutrient utilization, and intestinal morphology in broiler chickens fed a wheat–soybean meal-based diet. **Poultry Science** 91, 1387–1393. 2012.

KARR-LILIENTHAL, L.K. et al. Ileal amino acid digestibilities by pigs fed soybean meals from five major soybean-producing countries. **Journal Animal Science** 82, 3198–3209. 2004.

KIARIEL, E.; WOYENGO, T.; NYACHOTI, C. M. Efficacy of New 6-Phytase from Buttiauxella spp. on Growth Performance and Nutrient Retention in Broiler Chickens Fed Corn Soybean Meal-based Diets. **Asian Australasian Journal Animal Science.** Vol. 28, No. 10 : 1479-1487 October 2015. Disponível em: http://dx.doi.org/10.5713/ajas.15.0059 Acesso em: 15 mar. 2020.

KOCHER, A. et al. Effects of feed enzymes on nutritive value of soyabean meal fed to broilers. **British Poultry Science** 43, 54–63. 2002.

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

KONG, C.; ADEOLA, O. Additivity of amino acid digestibility in corn and soybean meal for broiler chickens and White Pekin ducks. **Poultry Science**. 92:2381–2388. 2013.

KORNEGAY, E.T. Digestion of phosphorus and other nutrients: the role of phytases and factors influencing their activity. In: Bedford, M.R., Partridge, G.G. (Eds.), **Enzymes in Farm Animal Nutrition**. 2000 CABI Publishing, New York, pp. 237–271. 2001.

LE HEUROU-LURON, I. et al. Molecular aspects of enzyme synthesis in the exocrine pancreas with emphasis on development and nutritional regulation. **Proceedings of the Nutrition Society**. 52, 301–313. 1993.

LEE, S. A.; BEDFORD, M. R.; WALK, C. L. Meta-analysis: explicit value of mono-component proteases in monogastric diets. **Poultry Science** 97:2078–2085. 2018.

LEWIS, C. J. et al. Swine nutrition, enzyme supplementation of baby pig diets. **Journal Agricultural Food Chemistry**. 3:1047–1050. 1955.

LI, Y. C. et al. Effects of low phytic acid corn on phosphorus utilization, performance, and bone mineralization in broiler chicks. **Poultry Science** 79:1444–1450. 2000.

LIENER, I.E. Factors affecting the nutritional quality of soya products. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.58, p.406-415, 1981.

LIU, N. et al. Effect of dietary phytate and phytase on proteolytic digestion and growth regulation of broilers. **Archives Animal Nutrition**. 63:292–303. 2009.

LIU, S. Y.; SELLE, P. H. A consideration of starch and protein digestive dynamics in chicken-meat production. **Worlds Poultry Science Journal** 71:297–310. 2015.

LOTT, J.N.A. et al. Phytic acid in crop seeds and fruits: a global estimate. **Seed Science Resourch** 10, 11–33. 2000.

MARSMAN, G.J.P. et al. The effect of shear forces and addition of a mixture of a protease and a hemicellulase on chemical, physical and physiological parameters during extrusion of soybean meal. **Animal Feed Science Technology** 56, 21–35. 1995.

MITCHELLl, R. D.; EDWARDS JR, H. M. Effects of phytase and 1,25-dihydroxycholecalciferol on phytate utilization and the quantitative requirement for calcium and phosphorus in young broiler chickens. **Poultry Science** 75:95–110. 1996.

MULLANEY, E. J.; ULLAH, A. H. J. The term phytase comprises several diferente classes of enzymes. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 312, 179-184. 2003

NAHM, K.H. Efficient phosphorus utilization in poultry feeding to lessen the environmental impact of excreta. **World's Poultry Science Journal**, 63 (2007), pp. 625-654. 2007.

NETO, G.J.; FRANZINI, P.O.; DARI, R.L. Efeito da qualidade nutricional do farelo de soja, soja integral tostada no desempenho de frangos de corte. In: **CONFERÊNCIA APINCO 1996 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS**, 1996, Campinas. Resumo... Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, p.21. 1996.

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

NRC. **Nutrient Requirements of Poultry**. 9th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC. 1994.

ODETALLAH, N. H et al. Keratinase in starter diets improves growth of broiler chicks. **Poultry Science** 82:664–670. 2003.

ODETALLAH, N. H.; WANG, J. J.; GARLICH, J. D. Versazyme supplementation of broiler diets improves market growth performance. **Poultry Science** 84:858–864. 2005.

OLUKOSI, O. A.; COWIESON, A. J.; ADEOLA, O. Energy utilization and growth performance of broilers receiving diets supplemented with enzymes containing carbohydrase or phytase activity individually or in combination. **British Journal Nutrition**. 99:682–690. 2008.

OLUKOSI, O. A. et al. Effects of exogenous proteases without or with carbohydrases on nutrient digestibility and disappearance of non-starch polysaccharides in broiler chickens. **Poultry Science**. 94:2662–2669. 2015.

OXEMBOLL, K. M.; PONTOPPIDAN, K.; FRU-NJI, F. Use of a protease in poultry feed offers promising environmental benefits. **International Journal of Poultry Science**. 10(11):842-848, 2011.

PALACIOS, M.F. et al. Effect of soybean variety and processing ongrowth performance of young chicks and pigs. **Journal Animal Science** 82, 1108–1114. 2004.

PARK, H.Y. et al. Effects of three different soybean meal sources on layer and broilers performance. **Asian-Australian Journal of Animal Science**, v.15, n.2, p.254- 265, 2002

PARSONS, C. M., et al. Effect of overprocessing on the availability of amino acids and energy in soybeanmeal. **Poultry Science** 71, 133–140. 1991.

PARSONS, C. M.; CASTANON, F.; HAN, Y. Protein and amino acid quality of meat and bone meal. **Poultry Science**, 76, 361– 368. 1997. Disponível em: https://doi.org/10.1093/ps/76.2.36. Acesso em: 15 mar. 2020.

RAVINDRAN, V. Phytases in poultry nutrition. An overview. **Poultry Science** 7, 135–139. 1995.

RAVINDRAN, V.; ABDOLLAHI, M. R.; BOOTWALLA, S. M. Nutrient Analysis, Metabolizable Energy, and Digestible Amino Acids of Soybean Meals of Different Origins for Broilers. **Poultry Science** 93: 2567–2577. 2014. Disponível em: https://doi:10.3382/ps.2014-04068. Acesso em: 15 mar. 2020.

RAVINDRAN, V.; COWIESON, A. J; SELLE, P. H. Influence of dietary electrolyte balance and microbial phytase on growth performance, nutrient utilization, and excreta quality of broiler chickens. **Poultry Science** 87:677-688. 2008.

ROOKE, J. A. et al. Growth performance and gut function of piglets weaned at four weeks of age and fed protease-treated soya-bean meal. **Animal Feed Science Technology** 70:175–190. 1998.

ROSTAGNO, H.S. et al. 2017. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. UFV. Departamento de Zootecnia, Viçosa, pp. 488. 2017.

RUCKEBUSCH, J. P.; GLITSOE, V. Can I compare different units from different enzyme manufacturers. 2013. Disponível em: **https://www.dsm.com/content/dam/dsm/anh/en_US/documents/2013_Can_I_compare_di**

fferent units from different enzyme manufacturers E013A.pdf. Acesso em 15 jan. 2021.

SADDORIS, K.L.; FLEET, J.C.; RADCLIFFE, J.S. Sodium dependent phosphate uptake in the jejunum is post-transcriptionally regulated in pigs fed a low-phosphorus diet and is independent of dietary calcium concentration. **Journal Nutrition**. 140, 731–736. 2010.

SANTOS, F. R. et al. Effect of phytase supplementation in diets on nutrient digestibility and performance in broiler chicks. **Journal Applied Poultry Research** 17:191-201. 2008.

SELIM, N. A. et al. Evaluation of using protease enzyme at different levels of protein in corn-soybean meal broiler diets. **Egyptian Poultry Science Journal**, 36, 233– 249. 2016.

SELLE, P. H.; RAVINDRAN, V. Microbial phytase in poultry nutrition. **Animal Feed Science Technology**. 135:1-41. 2007.

SHAW, L.; BLAKE, J. P.; GORDON, R. W. Evaluation of commercial phytase enzymes on performance and tibia-breaking strength of male broiler chicks. **Journal Applied Poultry Research**. 19 :415–421. 2010. Disponível em: http://doi: 10.3382/japr.2009-00121. Acesso em: 07 jul. 2020.

SIMBAYA, J. et al. The effects of protease and carbohydrase supplementation on the nutritive value of canola meal for poultry: *in vitro* and *in vivo* studies. **Animal Feed Science Technology** 61:219–234. 1996.

SLOMINSKI, B.A.; CAMPBELL, L.D. Non-starch polysaccharides of canola meal: quantification, digestibility in poultry and potential benefit of dietary enzyme supplementation. **Journal Science Food Agricuture**. 53, 175–184. 1990.

SWICK, R. A. Selection and use of soybean meal in swine feed. **ASA Technical Bulletin** No. 083/12/94. ASA, Singapore. 1995.

SWICK, R. A. US soybean meal: Present Quality and Future Trends. **ASA Technical Bulletin**. MITA No. 096/11/97. AN14- 1998. ASA. Singapore. 1998.

SWEAZEA, K.L.; BRAUN, E.J. Glucose transporter expression in English sparrows (Passer domesticus). **Comparative Biochemistry and Physiology**. Part B 144, 263–270. 2006.
THAKUR, M.; HURBURGH, C.R. Quality of US soybean meal compared to the quality of soybean meal from other origins. **Journal American Oil Chemists' Society** 84,835–843. 2007.

THORPE, J.; BEAL, J. D. Vegetable protein meals and the effects of enzymes. Pages 125–144 in **Enzymes in Farm Animal Nutrition**, 1st edn. M. R. Bedford, and G. G. Partridge, eds. CAB International, Oxon, UK. 2001.

UM, J. S. et al. Effects of microbial phytase supplementation to low phosphorus diets on the performance and utilization of nutrients in broiler chickens. **Asian Australasian Journal Animal Science** 13:824-829. 2000.

VAN KEMPEN, T.A.T.G. et al. Regional and processor variation in the ileal digestible amino acid content of soybean meals measured in growing swine. **Journal Animal Science** 80,429–439. 2002.

VIEIRA, S.L.; STEFANELLO, C.; CEMIN, H.S. Lowering the dietary protein levels by the use of synthetic amino acids and the use of a mono component protease. **Animal Feed Science**

**and Technology** Volume 221, Part B, November 2016, Pages 262-266. 2016. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.07.001 Acesso em: 20 nov. 2020.

WALDROUP, P.W. et al. Optimum processing for soybean meal used in broiler diets. **Poultry Science** 64, 2314–2320. 1985.

WALK, C. L.; POERNAMA, F. Evaluation of phytase, xylanase, and protease in reduced nutrient diets fed to broilers. **Journal Applied Poultry Research**. Volume 28, Issue 1, 1 March 2019, Pages 85-93 2018. Disponível em: https://doi.org/10.3382/japr/pfy022. Acesso em: 15 jan. 2021.

WALK, C. L.; SANTOS, T. T.; BEDFORD, M. R. Influence of superdoses of a novel microbial phytase on growth performance, tibia ash, and gizzard phytate and inositol in young broilers. **Poultry Science** 93 :1172–1177. 2014. Disponível em: http://dx.doi.org/ 10.3382/ps.2013-03571. Acesso em: 07 jul. 2020.

WALK, C. L. et al. Evaluation of novel protease enzymes on growth performance and apparent ileal digestibility of amino acids in poultry: enzyme screening. **Poultry Science**. 97:2123–2138. 2018.

WEIR, J. et al. Characterizing ammonia emissions from horses fed different crude protein concentrations. **Journal of Animal Science**, 95(8), 3598– 3608. 2017. Disponível em: https://doi.org/10.2527/jas.2017.1648. Acesso em: 07 jul. 2020.

WOYENGOA, T.A.; WILSON, J. Enhancing nutrient utilization in maize for broiler chickens by superdosing phytase. **Animal Feed Science and Technology** 252 (2019) 34–40. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.04.005 Acesso em: 15 jan 2020.

YAMASHITA Y, et al. Detection of orally administered inositol stereoisomers in mouse blood plasma and their effects on translocation of glucose transporter 4 in skeletal muscle cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 61, 4850–4854. 2013.

ZYLA, K. et al. Phytases and myo-inositol modulate performance, bonemineralization and alter lipid fractions in the serum of broilers. **Journal Animal Feed Science** 22, 56–62. 2013.

ZILIC, S. M. et al. Characterization of proteins from kernel of different soybean varieties. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 91(1):60-67, 2011.

## CAPÍTULO II – EFEITO DE DIFERENTES DOSES DE FITASE E CONTEÚDO PROTEICO DO FARELO DE SOJA NO DESEMPENHO, DIGESTIBILIDADE DE NUTRIENTES E CARACTERÍSTICAS ÓSSEAS DE FRANGO DE CORTE

### RESUMO

Este estudo avaliou os efeitos de doses elevadas de fitase e farelo de soja (FS) com diferentes conteúdos de proteína bruta (PB) no desempenho, digestibilidade ileal dos nutrientes, energia digestível, mio-inositol plasmático, liberação de fosfato *in vitro*, e composição óssea de frangos de carne. Foram distribuídos 1.200 frangos de corte de um dia de idade num arranjo fatorial 2x2 completamente aleatório, com 2 doses de fitase (1.000 e 2.500 unidades de fitase/kg; FYT) e 2 FS com diferentes concentrações de PB (45 e 47%), totalizando 4 tratamentos com 12 repetições de 25 aves cada. As aves receberam ração e água ad libitum. As dietas foram baseadas em milho e FS, com diferentes inclusões de casca de soja utilizadas para diluir o conteúdo de PB do FS de acordo com cada tratamento. A inclusão de 2.500 FYT aumentou o ganho de peso de 0 à 21 d ($P < 0,05$), enquanto que o desempenho entre 22 e 42 d não foi afetado, e o FS não teve qualquer efeito no desempenho. Aos 21 d, a digestibilidade ileal da matéria seca, cinzas, P, e energia digestível foram maiores em dietas com 2.500 FYT/kg ($P < 0,05$), bem como a liberação de fosfato *in vitro* ($P < 0,01$) em comparação com a dose mais baixa. Aos 42 d, as dietas com o FS com 47% PB e 2.500 FYT/kg promoveram uma maior digestibilidade da matéria seca, cinzas, PB, Ca, P, e energia digestível ($P < 0,001$), e uma maior liberação de fosfatos ($P < 0,05$) em comparação com outros tratamentos. O nível de mio-inositol no plasma a 21 e 42 d foi mais elevado com a utilização de 2.500 FYT em comparação com 1.000 FYT ($P < 0,05$). A dose mais elevada de fitase aumentou as cinzas da tíbia, cinzas dos dedos dos pés, e o Índice de Seedor ($P < 0,05$) aos 21 d, e o conteúdo de Ca na tíbia foi mais elevado com 2.500 FYT e o FS com 47% PB aos 42 d. Em conclusão, maiores doses de fitase para frangos de corte melhoram o desempenho, o fornecimento de mio-inositol, e a composição

mineral óssea. A digestibilidade ileal dos nutrientes pode ser aumentada com doses de fitase mais elevadas quando em combinação com FS de maior qualidade nutricional.

Palavras-chave: Farelo de Soja, Fitase, Fósforo, Frango de Corte, Proteína.

## EFFECT OF DIFFERENT DOSES OF PHYTASE AND PROTEIN CONTENT OF SOYBEAN MEAL ON GROWTH PERFORMANCE, NUTRIENT DIGESTIBILITY AND BONE CHARACTERISTICS OF BROILERS

### ABSTRACT

This study evaluated the effects of high phytase doses and soybean meal (SBM) with different crude protein (CP) content on growth performance, ileal nutrient digestibility, digestible energy, plasmatic *myo*-inositol, phosphate release *in vitro*, and bone composition of broiler chickens. 1,200 one-d-old broilers were distributed in a 2x2 completely randomized factorial arrangement, with 2 phytase doses (1,000 and 2,500 phytase units/kg; FYT) and 2 SBM with different CP concentrations (45 and 47%), totaling 4 treatments with 12 replicates of 25 birds each. The chickens received feed and water *ad libitum*. Diets were based on corn and SBM, with different inclusions of soybean hull used to dilute CP content of SBM according to each treatment. The inclusion of 2,500 FYT increased weight gain from 0 to 21 d ($P < 0.05$), whereas growth performance from 22 to 42 d was not affected, and SBM had no effect on growth performance. At d 21, ileal digestibility of dry matter, ash, P, and digestible energy were greater on diets with 2,500 FYT/kg ($P < 0.05$), as well as phosphate *in vitro* release ($P < 0.01$) compared to the lower dose. At d 42, diets with 47% CP SBM and 2,500 FYT/kg promoted greater digestibility of dry matter, ash, CP, Ca, P, and digestible energy ($P < 0.001$), and greater phosphate release ($P < 0.05$) in comparison to other treatments. *Myo*-inositol level in the plasma at 21 and 42 d was higher with the use of 2,500 FYT compared to 1,000 FYT ($P < 0.05$). The higher phytase dose increased tibia ash, toe ash, and Seedor Index ($P < 0.05$) at d 21, and Ca content in tibia was higher with 2,500 FYT and SBM 47% CP at d 42. In conclusion, greater phytase doses for broilers improve weight gain, *myo*-inositol provision, and bone mineral

composition. Nutrient ileal digestibility can be enhanced by higher phytase doses when in combination with SBM of greater nutritional quality.

Key-words: Phosphorus, Phytase, Poultry, Protein, Soybean meal.

## 1 INTRODUÇÃO

Nas dietas avícolas à base de ingredientes vegetais, até 70% de P está presente como fitato-P, ligado à molécula de ácido fítico, e indisponível para digestão e absorção (ANGEL et al., 2001). Os níveis regulares de fitato nas dietas à base de milho e farelo de soja (FS) variam entre 2,5 a 4,0 g/kg, e podem causar impacto negativo no ganho de peso e na eficiência alimentar (RAVINDRAN, 1995), uma vez que o fitato pode formar complexos com proteínas, aminoácidos (AA) e minerais (SANTOS, 2012).

O FS é a principal fonte de proteína utilizada na dieta para frango de corte devido ao seu teor elevado de proteína bruta (PB) (entre 44 e 50%), bom perfil de AA e biodisponibilidade. O conteúdo de PB no FS é ainda a principal razão para a sua inclusão em matrizes nutricionais (IBÁÑEZ et al., 2020), mas outros componentes são também relevantes para determinar a qualidade do FS. De acordo com o NRC (1994), a proporção de fitato-P/P total no FS é de cerca de 58,5%. Outros componentes antinutrientes são também comuns na soja, como inibidores da tripsina e oligossacarídeos (rafinose, estaquiose, polissacarídeos), que podem prejudicar a disponibilidade de P, Ca, e outros minerais dietéticos, e também reduzir a digestibilidade de AA e a utilização de energia (HURREL, 2003; KOCHER et al., 2003; CHOCT et al., 2010; IBÁÑEZ et al., 2020).

Uma das etapas do processamento do FS inclui a remoção e reincorporação da casca da soja ao farelo, a fim de diluir o conteúdo de PB e reduzir os custos, mas esta adição de casca aumenta o conteúdo de oligossacarídeos e fibras no FS. Como salientado por IBÁÑEZ et al. (2020), existe uma correlação negativa entre a PB e o teor de fibra do FS, que depende, entre outros fatores, da quantidade de casca adicionada ao farelo. Além disso, 10% do teor de fitato nos grãos está localizada na casca (ABDELRAHMAN et al., 1984), assim, o FS não descascado pode também conter mais fitato. Alguns dos componentes antinutrientes presentes n FS são termolábeis, susceptíveis às altas temperaturas utilizadas durante o processamento do FS, mas o fitato é resistente ao calor (PARK et al., 2001) e precisa ser eliminado através de outros métodos como a utilização de fitase exógena.

As fitases são normalmente utilizadas para hidrolisar o fitato em mio-inositol (MIO) livre e 6 moléculas de fosfato inorgânico. A degradação e eliminação do fitato no trato gastrointestinal com a utilização da fitase está correlacionada com melhorias significativas na digestibilidade de P e Ca (COWIESON et al., 2006; KIARIE et al., 2015), teor de cinzas no osso da tíbia (SOUSA et al., 2015; WALK & RAMA RAO, 2020), aumento de peso, e eficiência alimentar (BROCH et al., 2018), e a medida em que o fitato é eliminado do trato pode ser intensificada também com maiores níveis de fitase. A suplementação das dietas de frango de corte com níveis de fitase superiores aos recomendados pelo setor industrial (≥ 1.500 U/kg) demonstrou aumentar ainda mais a solubilidade e digestibilidade dos nutrientes além do P, como da proteína, aminoácidos e energia, levando a efeitos extra-fosfóricos (WALK & RAMA RAO, 2020; DERSJANT-LI & KWAKERNAAK, 2019; COWIESON et al., 2017).

Considerando que a concentração de PB no FS está relacionada com diferentes inclusões de casca de soja, o que pode levar a diferentes concentrações de fitato, o objetivo deste estudo foi avaliar a suplementação de dietas de frango de corte com altos níveis de fitase e a utilização de FS com diferentes conteúdos proteicos no desempenho, digestibilidade ileal dos nutrientes, mio-inositol plasmático, liberação de fosfatos *in vitro* e composição mineral óssea.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais foram aceites pelo Comité de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Paraná (Protocolo número 071/2018).

## 2.1 AVES, INSTALAÇÕES E DIETAS EXPERIMENTAIS

Um total de 1.200 pintinhos Cobb 500 de um dia de idade, provenientes de um incubatório comercial, foram alojados em unidades experimentais de 2,06 m2 (12,1 frangos de corte/$m^2$), com cama de maravalha, equipados com bebedouros nipple e comedouros tubulares.

A temperatura inicial foi fixada em 32ºC e gradualmente reduzida para 18ºC até o 42º. dia. Durante os primeiros 10 d, foi fornecida continuamente luz incandescente (24 h), depois disso foi aplicado um programa de iluminação de 9 h de escuridão por dia. As baias eram verificadas diariamente para a remoção de aves mortas. Foram oferecidos ração e água ad libitum durante todo o período experimental.

Os tratamentos dietéticos formaram um arranjo fatorial completo 2 x 2, que consistiu em 2 farelos de soja (FS) com diferentes concentrações de proteína (45% e 47% de proteína bruta - PB), e 2 doses de fitase (1.000 e 2.500 unidades de fitase/kg - FYT), totalizando quatro tratamentos dietéticos com 12 repetições de 25 aves cada. As dietas foram baseadas em milho e FS, fareladas, e divididas em duas fases de: fase inicial (1 a 21 d; TABELA 1) e fase de crescimento/terminação (22 a 42 d; TABELA 2).

Foram incluídos na fórmula diferentes níveis de casca de soja, provenientes do mesmo lote de FS, a fim de diluir as concentrações proteicas da FS de acordo com cada tratamento. O diâmetro geométrico médio das dietas produzidas com o FS 45% e 47% de PB foi de 753 µm e 709 µm, respectivamente, e o desvio padrão geométrico foi de 2,16% e 2,18%, respectivamente. A PB (método 954,01), cinzas (método 942,05), cálcio (método 927,02), fósforo (método 965,17), e fibra bruta (método 962,10) das dietas (Tabelas 1 e 2) e ingredientes principais (TABELA 3) foram analisados de acordo com a Association of the Official Analytical Chemists (AOAC, 1995). A fibra em detergente neutro solúvel e a fibra em detergente ácido solúvel foram analisadas através da metodologia Van Soest (VAN SOEST et al., 1991). O Fitato-P das dietas foi predito por espectroscopia no infravermelho próximo ((NIRS; EVONIK NUTRITION & CARE, São Paulo, Brasil), à semelhança de BEESON et al. (2017), e os açúcares totais e os AA digestíveis foram também predistos por NIRS.

A enzima fitase utilizada foi RONOZYME® HiPhos GT (RONOZYME® HiPhos Granulated Thermostable - DSM, Kaiseraugst, Suíça), que é uma 6-fitase originada de Citrobacter braakii e expressa em Aspergillus oryzae, com uma atividade mínima de 20.000 FYT/g de produto. Um FYT é definido como a quantidade de enzima que libera 1 µmol de

fosfato inorgânico por minuto de 5,0 µmol/l de fitato de sódio a pH 5,5 e 37ºC (ENGELEN et al., 1994). A atividade da fitase nas dietas suplementadas foi medida em Biopract GmbH, Berlim, Alemanha. A recuperação enzimática foi calculada como a percentagem da atividade enzimática medida na dieta à atividade enzimática esperada estimada a partir da quantidade e atividade mínima de enzimas adicionadas às dietas.

TABELA 1. COMPOSIÇÃO E ANÁLISE CALCULADA DAS DIETAS INICIAIS (0 A 21 DIAS).

| Ingredientes (%) | FS 45% PB + 1.000 FYT | FS 47% PB + 1.000 FYT | FS 45% PB + 2.500 FYT | FS 47% PB + 2.500 FYT |
|---|---|---|---|---|
| Milho | 55,963 | 60,615 | 55,963 | 60,615 |
| Farelo de Soja | 30,040 | 30,050 | 30,040 | 30,050 |
| Casca de Soja | 5,810 | 2,980 | 5,810 | 2,980 |
| Óleo de Soja | 3,650 | 1,800 | 3,650 | 1,800 |
| Calcário | 1,070 | 1,120 | 1,070 | 1,120 |
| Fosfato Bicálcico | 0,970 | 0,970 | 0,970 | 0,970 |
| Cloreto de Sódio | 0,470 | 0,470 | 0,470 | 0,470 |
| L-Lisina HCl | 0,283 | 0,292 | 0,283 | 0,292 |
| L-Treonina | 0,085 | 0,074 | 0,085 | 0,074 |
| L-Valina | 0,071 | 0,063 | 0,071 | 0,063 |
| DL-Metionina | 0,326 | 0,311 | 0,326 | 0,311 |
| Cloreto de Colina | 0,070 | 0,070 | 0,070 | 0,070 |
| Premix Vitamínico[1] | 0,130 | 0,130 | 0,130 | 0,130 |
| Premix Mineral [2] | 0,050 | 0,050 | 0,050 | 0,050 |
| Fitase[3] | 0,005 | 0,005 | 0,013 | 0,013 |
| Celite[4] (Marcador) | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 |
| Composição química calculada | | | | |
| Energia Metabolizável (kcal) | 3.070 | 3.070 | 3.070 | 3.070 |
| Sódio (%) | 0,20 | 0,20 | 0,20 | 0,20 |
| Cloro (%) | 0,35 | 0,35 | 0,35 | 0,35 |
| Composição química analisada (Matéria Natural) | | | | |
| Proteína bruta (%) | 21,09 | 21,13 | 21,03 | 21,60 |
| Cálcio (%) | 1,00 | 0,99 | 1,10 | 1,06 |
| Fósforo total (%) | 0,60 | 0,62 | 0,59 | 0,61 |
| Cinzas (%) | 6,70 | 6,90 | 6,79 | 6,83 |
| Fibra bruta (%) | 4,18 | 3,29 | 4,31 | 3,22 |
| Fibra em detergente ácido (%) | 6,12 | 4,87 | 6,09 | 4,78 |
| Fibra em detergente neutro (%) | 12,65 | 11,21 | 12,55 | 11,07 |
| Composição analisada através de espectroscopia de refletância no infravermelho próximo | | | | |
| Fósforo Fítico (%) | 0,22 | 0,25 | 0,19 | 0,24 |
| Total de açúcares (%) | 3,68 | 3,55 | 3,64 | 3,57 |
| Lisina digestível (%) | 1,20 | 1,18 | 1,21 | 122 |
| Metionina digestível (%) | 0,62 | 0,58 | 0,61 | 0,64 |
| Metionina + cisteína (%) | 0,90 | 0,86 | 0,85 | 0,91 |
| Treonina digestível (%) | 0,73 | 0,74 | 0,72 | 0,79 |
| Triptofano digestível (%) | 0,20 | 0,21 | 0,19 | 0,24 |
| Valina digestível (%) | 0,86 | 0,90 | 0,87 | 0,91 |

[1]Fornecido por quilograma de produto: cobre, 20g; ferro, 100g; iodo, 2g; manganês, 130g; zinco, 130g.

[2]Fornecido por quilograma de produto: vitamina A, 11.000.000 UI; vitamina D3, 4.000.000 UI; vitamina E, 55.000 UI; vitamina K3, 3g; vitamina B1, 2,3g; vitamina B2, 7g; ácido pantotênico, 12g; vitamina B6, 4g; vitamina B12, 25mg; ácido nicotínico, 60g; ácido fólico, 2g; biotina, 250mg; selênio, 300mg.

[3]RONOZYME® HiPhos GT com 20.000 FYT/g (DSM Nutritional Products - Kaiseraugst, Suíça)

[4]Celite® Marcador insolúvel (Celite® 400 - Celite Corp., Lompoc, US).

TABELA 2. COMPOSIÇÃO E ANÁLISE CALCULADA DAS DIETAS DE CRESCIMENTO/ TERMINAÇÃO (22 A 42 DIAS).

| Ingredientes (%) | FS 45% PB+ 1.000 FYT | FS 47% PB + 1.000 FYT | FS 45% PB + 2.500 FYT | FS 47% PB + 2.500 FYT |
|---|---|---|---|---|
| Milho | 63,971 | 66,548 | 63,963 | 66,540 |
| Farelo de Soja | 24,200 | 24,200 | 24,200 | 24,200 |
| Casca de Soja | 4,100 | 2,320 | 4,100 | 2,320 |
| Óleo de Soja | 3,700 | 2,900 | 3,700 | 2,900 |
| Calcário | 0,770 | 0,790 | 0,770 | 0,790 |
| Fosfato Bicálcico | 0,970 | 0,970 | 0,970 | 0,970 |
| Cloreto de Sódio | 0,470 | 0,470 | 0,470 | 0,470 |
| L-Lisina HCl | 0,220 | 0,220 | 0,220 | 0,220 |
| L-Treonina | 0,054 | 0,048 | 0,054 | 0,048 |
| L-Valina | 0,043 | 0,038 | 0,043 | 0,038 |
| DL-Metionina | 0,247 | 0,241 | 0,247 | 0,241 |
| Cloreto de Colina | 0,050 | 0,050 | 0,050 | 0,050 |
| Premix Vitamínico[1] | 0,100 | 0,100 | 0,100 | 0,100 |
| Premix Mineral [2] | 0,100 | 0,100 | 0,100 | 0,100 |
| Fitase[3] | 0,005 | 0,005 | 0,013 | 0,013 |
| Celite[4] (Marcador) | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 |
| Composição química calculada | | | | |
| Energia Metabolizável (kcal) | 3.220 | 3.220 | 3.220 | 3.220 |
| Sódio (%) | 0,18 | 0,18 | 0,18 | 0,18 |
| Cloro (%) | 0,32 | 0,32 | 0,32 | 0,32 |
| Composição química analisada (Matéria Natural) | | | | |
| Proteína bruta (%) | 18,38 | 18,82 | 18,57 | 18,41 |
| Cálcio (%) | 0,80 | 0,73 | 0,80 | 0,79 |
| Fósforo total (%) | 0,50 | 0,51 | 0,54 | 0,53 |
| Cinzas (%) | 6,09 | 6,04 | 6,03 | 5,98 |
| Fibra bruta (%) | 3,61 | 2,91 | 3,55 | 2,98 |
| Fibra em detergente ácido (%) | 5,20 | 4,38 | 5,16 | 4,41 |
| Fibra em detergente neutro (%) | 11,83 | 10,98 | 11,78 | 11,02 |
| Composição analisada através de NIRS (Espectroscopia de refletância no infravermelho próximo) | | | | |
| Fósforo fítico (%) | 0,23 | 0,21 | 0,24 | 0,19 |
| Total de açúcares (%) | 3,18 | 2,97 | 3,25 | 3,05 |
| Lisina digestível (%) | 0,95 | 1,01 | 0,97 | 0,94 |
| Metionina digestível (%) | 0,48 | 0,53 | 0,52 | 0,50 |
| Metionina + cisteína (%) | 0,80 | 0,72 | 0,79 | 0,78 |
| Treonina digestível (%) | 0,60 | 0,67 | 0,68 | 0,63 |
| Triptofano digestível (%) | 0,19 | 0,20 | 0,17 | 0,17 |
| Valina digestível (%) | 0,74 | 0,78 | 0,75 | 0,72 |

[1]Fornecido por quilograma de produto: cobre, 20g; ferro, 100g; iodo, 2g; manganês, 130g; zinco, 130g.

[2]Fornecido por quilograma de produto: vitamina A, 11.000.000 UI; vitamina D3, 4.000.000 UI; vitamina E, 55.000 UI; vitamina K3, 3g; vitamina B1, 2,3g; vitamina B2, 7g; ácido pantotênico, 12g; vitamina B6, 4g; vitamina B12, 25mg; ácido nicotínico, 60g; ácido fólico, 2g; biotina, 250mg; selênio, 300mg.

[3]RONOZYME® HiPhos GT com 20.000 FYT/g (DSM Nutritional Products - Kaiseraugst, Suíça)

[4]Celite® Marcador insolúvel (Celite® 400 - Celite Corp., Lompoc, US).

TABELA 3. COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DO MILHO, DO FARELO DE SOJA E DA CASCA DE SOJA.

| Nutriente (%) | Milho | Farelo de Soja | Casca de Soja |
|---|---|---|---|
| Composição química analisada | | | |
| Proteína bruta | 8,30 | 50,10 | 12,40 |
| Fibra bruta | 2,01 | 3,11 | 37,62 |
| Fibra em detergente neutro | 10,90 | 9,02 | 61,55 |
| Fibra em detergente ácido | 2,92 | 5,40 | 46,93 |
| Cinzas | 1,11 | 5,65 | 4,49 |
| Cálcio | 0,03 | 0,38 | 0,36 |
| Fósforo total | 0,23 | 0,64 | 0,13 |
| Composição analisada através de NIRS (Espectroscopia de refletância no infravermelho próximo) | | | |
| Fósforo fítico (%) | 0,15 | 0,38 | 0,07 |
| Total de açúcares (%) | 1,10 | 9,70 | 1,11 |
| Lisina digestível (%) | 0,18 | 2,78 | 0,43 |
| Metionina digestível (%) | 0,15 | 0,63 | 0,09 |
| Metionina + cisteína (%) | 0,29 | 1,28 | 0,14 |
| Treonina digestível (%) | 0,29 | 1,71 | 0,18 |
| Triptofano digestível (%) | 0,06 | 0,59 | 0,06 |
| Valina digestível (%) | 0,31 | 2,09 | 0,29 |

## 2.2 DESEMPENHO

Todas as aves e as sobras de ração foram pesadas 1, 21, e 42 dias de idade para calcular o consumo de ração (CR), ganho de peso (GP), e a conversão alimentar (CA) de 1 à 21 dias e de 22 à 42 dias de idade, corrigidos para o peso das aves mortas.

## 2.3 DIGESTIBILIDADE

Aos 21 e 42 dias de idade, 240 frangos de corte em cada d (60 por tratamento) foram selecionados aleatoriamente e eutanasiados por deslocação cervical, de acordo com a metodologia descrita por LUTDKE et al. (2010), e o conteúdo ileal foi recolhido para análises de digestibilidade. As aves foram evisceradas, e uma fração ileal foi separada para remoção do conteúdo, definida como 4 cm abaixo do divertículo de Meckel e 4 cm acima da junção íleo-ceco-cólon. O conteúdo ileal das cinco aves de cada repetição foi agrupado, colocado em recipientes plásticos identificados, e congelado a -18ºC.

As amostras foram subsequentemente descongeladas à temperatura ambiente e secas num forno de ventilação forçada a 55ºC até peso constante. As amostras da ração e do conteúdo ileal foram então moídas até à granulometria de 0,5 mm. O teor de matéria seca (MS) foi obtido por secagem das amostras em estufa a 105ºC durante 16 h, e o teor de proteína bruta (PB;

método 954.01), cinzas (método 942.05), cálcio (Ca; método 927.02), e fósforo (P; método 965.17) foram analisados de acordo com a metodologia pela AOAC (1995). A energia bruta (EB) das amostras foi determinada numa bomba calorimétrica (Ika Werke C2000 Control Oxygen Bomb Calorimeter - Ika-Werke GmbH&Co, Staufen, Alemanha). As cinzas insolúveis em ácido (CIA) foram utilizadas como um composto marcador insolúvel nos cálculos de digestibilidade, e o conteúdo de CIA nas amostras foi determinado de acordo com a metodologia de SCOTT & BOLDAJI (1997).

Com base nos resultados, o coeficiente de digestibilidade ileal aparente (CDIA) foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$CDIA\ (\%) = \frac{(Nutriente\ na\ dieta) - (nutriente\ na\ digesta\ ileal \times FI)}{Nutriente\ na\ dieta}$$

Onde FI (fator de indigestão) é a relação entre o conteúdo de CIA na dieta e CIA na excreta ou digesta ileal. A energia digestível ileal (EDI) foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$EDI\ (kcal/kg\ MS) = EB\ na\ dieta - (EB\ na\ digesta\ ileal\ \times FI)$$

## 2.4 MIO-INOSITOL PLASMÁTICO

Aos 21 e 42 dias de idade, duas aves por repetição foram escolhidas aleatoriamente para a coleta de 3 a 5 mL de amostras de sangue, mantidas em tubos com heparina (Vacutainer® Plus - BD, New Jersey, EUA). Imediatamente após a coleta de sangue, os tubos foram centrifugados a 3000 rpm durante 10 min para separar o plasma do sangue. Após a centrifugação, o plasma obtido foi mantido em microtubos graduados e congelado a -20ºC antes de ser enviado para análise. A concentração de mio-inositol (MIO) no plasma foi determinada por espectrometria de massa usando um sistema UPLC® (ACQUITY UPLC® System - Waters, Milford, US) de acordo com o método descrito por LEUNG et al. (2011).

## 2.5 LIBERAÇÃO DE FOSFATO ($PO_4^{-3}$) *IN VITRO*

Doze amostras de ração de cada tratamento e de cada fase (inicial e crescimento/terminação, totalizando 24 amostras de cada tratamento) foram separadas para testes *in vitro*, que foram conduzidos de acordo com a metodologia de ZYLA et al. (1999). Para o modelo de incubação *in vitro*, 2,25 g de cada amostra foram pesados e incubados a 40ºC com 12,75 g de soluções ácidas e alcalinas (15% de matéria seca) durante 15 minutos a pH 3,0 ± 0,25, seguido de 4 horas de incubação a pH 6,5 ± 0,25 com agitação (25 rpm, agitação do rotor tipo rotisserie), para simular o pH e a temperatura do papo e das fases da digestão intestinal, respectivamente. Uma solução de ácido clorídrico 0,065-0,085 M foi utilizada para atingir o pH 3,0 ± 0,25, após o que foi adicionada uma solução de bicarbonato de sódio 0,75M para ajustar a reação ao pH 6,5 ± 0,25. A reação foi realizada sem enzimas digestivas (pepsina ou pancreatina) a fim de avaliar apenas o efeito da fitase exógena nas dietas.

Uma vez finalizado o tempo de incubação, os sobrenadantes foram coletados, filtrados e diluídos. Cromatografia de troca aniônica de alto desempenho com detecção de condutividade (HPAEC-CD) foi usada para quantificar a quantidade de fosfato solúvel ($PO_4^{-3}$) usando séries de soluções padrão com flúor, cloreto, nitrito, sulfato, brometo, nitrato e fosfato em 6 níveis de concentração (0,0025-0,075 g/l). O $PO_4^{-3}$ foi quantificado em um ICS-5000 (Dionex™ ICS-5000+ Capilar HPIC™ System - Thermo Scientific, Walthams, MA, US) equipado com uma coluna IonPac AS11-HC (250 x 4 mm) e uma coluna de guarda IonPac AS11-HC (4 x 50 mm). Foi utilizada uma fase móvel de 30 mM de hidróxido de potássio com um fluxo de 1,5ml/min.

## 2.6 COMPOSIÇÃO MINERAL ÓSSEA

Aos 21 e 42 dias de idade, dois frangos por réplica, selecionados aleatoriamente entre os 5 frangos eutanizados para coleta de conteúdo ileal no mesmo dia de amostragem, tiveram suas pernas esquerdas removidas manualmente. Os ossos tibiais foram cortados da perna sem ferver e limpos dos restos da cama e dos excrementos. Os ossos foram então limpos com éter para remover quaisquer restos de gordura e músculo, e secos no forno a 105ºC por 12 horas. As medidas de comprimento e peso dos ossos foram então tomadas usando um paquímetro digital e uma balança digital a 0,0001 g, utilizada no cálculo do Índice Seedor (IS), dividindo o peso ósseo pelo seu comprimento, como um indicativo da densidade mineral óssea (SEEDOR,

1993). Os ossos secos foram lavados em uma mufla a 600ºC e o conteúdo de cinzas (método 942,05), Ca (método 927,02) e P (método 965,17) foram analisados de acordo com AOAC (1995). Também foram retirados os dedos dos mesmos frangos de 21 dias de idade eutanizados para a coleta da tíbia. O dedo médio do pé foi cortado e limpo; a pele, carne e unha do pé médio foram mantidas intactas; os dedos dos pés foram lavados para determinar o conteúdo de cinzas (método 942.05).

## 2.7 DESENHO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados coletados foram testados quanto à normalidade dos resíduos pelo teste Shapiro-Wilk, e após uma distribuição normal ter sido detectada, os dados foram usados para uma ANOVA bidirecional usando o modelo linear do pacote ExpDes (Pacote de Projetos Experimentais, E. B. Ferreira et al., Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil), incluindo 2 fatores principais e sua interação, no programa R (R Foundation for Statistical Computing, Viena, Áustria). Quando interações significativas foram observadas, sua implantação foi submetida ao teste Tukey com 5% de probabilidade para comparação da média.

# 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise da recuperação da fitase nas dietas experimentais mostrou uma baixa variação entre os valores declarados e analisados (TABELA 4), o que certifica que a atividade enzimática estava de acordo com cada proposta de tratamento dietético.

TABELA 4. ATIVIDADE DE FITASE ESPERADA E ANALISADA* RECUPERADA EM AMOSTRAS DE RAÇÃO.

| Tratamento | Fitase[1], FYT[2]/kg | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Dieta Inicial | | Dieta Crescimento/Terminação | |
| | Declarado | Analisado | Declarado | Analisado |
| FS 45% +1,000 FYT | 1.000 | 938 | 1.000 | 987 |
| FS 47% +1,000 FYT | 1.000 | 1.040 | 1.000 | 1.023 |
| FS 45% +2,500 FYT | 2.500 | 2.426 | 2.500 | 2.332 |
| FS 47% +2,500 FYT | 2.500 | 2.359 | 2.500 | 2.864 |

*Análise de recuperação realizada pela BioPract GmbH, Berlim, Alemanha

[1]A atividade enzimática é expressa como a quantidade de produto adicionado na ração.

[2]FYT = unidades de fitase por kg de ração.

FS = farelo de soja.

## 3.1 DESEMPENHO

Nenhuma interação entre fatores foi observada (P > 0,05) para variáveis de desempenho de 0 a 21 d e 22 a 42 d (TABELA 5).

TABELA 5. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA DO FARELO DE SOJA (FS) E DOSES DE FITASE SOBRE O CONSUMO DE RAÇÃO (CR), GANHO DE PESO (GP) E CONVERSÃO ALIMENTAR (CA) DE FRANGOS DE CORTE.

| FS (% PB) | Fitase (FYT/kg) | 0 à 21 d | | | 22 à 42 d | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | CR (g) | GP (g) | CA (g/g) | CR (g) | GP (g) | CA (g/g) |
| FS x Fitase | | | | | | | |
| 45 | 1.000 | 855,33 | 782,45 | 1,097 | 3.640,51 | 2.226,10 | 1,635 |
| 47 | | 866,00 | 784,27 | 1,093 | 3.699,28 | 2.274,33 | 1,626 |
| 45 | 2.500 | 881,24 | 808,40 | 1,083 | 3.638,52 | 2.215,35 | 1,642 |
| 47 | | 881,68 | 808,47 | 1,085 | 3.633,67 | 2.245,28 | 1,618 |
| SEM | | 11,135 | 6,744 | 0,005 | 37,085 | 22,060 | 0,004 |
| Efeito do FS (% PB) | | | | | | | |
| 45 | | 868,28 | 795,42 | 1,090 | 3.639,49 | 2.220,65 | 1,640 |
| 47 | | 873,84 | 796,37 | 1,089 | 3.666,39 | 2.259,74 | 1,622 |
| Efeito da fitase (FYT/kg) | | | | | | | |
| | 1.000 | 866,28 | 783,36 | 1,095 | 3.669,84 | 2.250,01 | 1,631 |
| | 2.500 | 881,46 | 808,43 | 1,084 | 3.636,05 | 2.230,22 | 1,630 |
| P-value | | | | | | | |
| FS | | 0,620 | 0,888 | 0,880 | 0.472 | 0.081 | 0.062 |
| Fitase | | 0,078 | 0,006 | 0,135 | 0.367 | 0.370 | 0.971 |
| Interação | | 0,648 | 0,896 | 0,678 | 0.395 | 0.680 | 0.386 |

SEM = erro padrão da média.
PB = Proteína bruta.

Ao avaliar os efeitos principais, a inclusão de 2.500 FYT/kg aumentou o GP de 0 a 21 d (P < 0,05) em 3,11% em comparação com as aves alimentadas com dietas contendo 1.000 FYT/kg. Os efeitos da fitase no desempenho são bem conhecidos, e parece haver uma resposta ainda maior com doses mais altas. Em um estudo recente, BROCH et al. (2018) avaliaram níveis crescentes de fitase de até 3.000 FYT para dietas de frangos de corte de 21 anos de idade e relataram uma resposta linear para todas as medidas de desempenho zootécnico. KIARIE et al. (2015) também observaram que a inclusão da fitase aumentou linearmente o desempenho de frangos de corte alimentados com uma dieta baixa de Ca e P suplementada com 2.000 FTU, já que o GP melhorou em 20% e a CAA em 7,4% em comparação com aves alimentadas com a mesma dieta sem fitase. De acordo com WALK et al. (2014), os benefícios da fitase no GP e CAA das aves estão associados a maior destruição de fitato e provisão de inositol em vez de diretamente maior liberação e níveis de Ca e P. Doses maiores de fitase testadas pelos autores

resultaram em hidrólise quase completa do IP6, aumentando a concentração de inositol na moela e melhorando o desempenho de crescimento.

A concentração de proteínas do FS não teve efeito significativo (P > 0,05) nas variáveis de desempenho zootécnico em ambas as idades avaliadas, ao contrário de outros estudos. PARK et al. (2001), por exemplo, obtiveram maior GP e eficiência alimentar em frangos de corte alimentados com FS com 48,3% de PB, em comparação com um FS com 45% de PB. GERBER et al. (2006) também observaram maior GP e CA em frangos de 21 dias de idade alimentados com FS com 48% de PB em comparação com um FS com 44% de PB. Estas melhorias no desempenho zootécnico podem ser associadas à composição nutricional do FS, pois o FS com maior conteúdo de PB, ou menos casca, contém relativamente menos fibra e maior energia metabolizável do que o FS não descascado (SWICK, 1998; IBÁÑEZ et al., 2020). Entretanto, a alteração do conteúdo de PB do FS neste estudo com as diferentes adições de casca não foi presumivelmente suficiente para causar efeitos significativos no desempenho zootécnico ou mesmo para gerar uma interação com as doses de fitase suplementadas nas variáveis de desempenho.

## 3.2 DIGESTIBILIDADE

Nenhuma interação foi observada entre fatores para variáveis CDIA a 21 d (P > 0,05; TABELA 6). Ao observar os principais efeitos separadamente, a concentração de proteína do FS teve um efeito significativo sobre a CDIA de P (P < 0,05), já que o FS com 45% de PB resultou em uma digestibilidade de P 3,92% maior em comparação com o FS com 47% de PB. A suplementação com fitase teve efeitos significativos no CDIA de MS, cinzas, P, e também EDI (P < 0,01) que foram respectivamente aumentados em 2,13%, 2,77%, 8,1%, e 175 kcal com a inclusão de 2.500 FYT em comparação com a dose de 1.000 FYT. Da mesma forma, COWIESON et al. (2006) e KIARIE et al. (2015) demonstraram que doses maiores de fitase (1.200 e 2.000 FTU/kg, respectivamente) melhoraram a digestibilidade aparente e total da P em comparação com doses menores de fitase, o que é devidamente esperado uma vez que mais fitato-P é liberado e absorvido.

TABELA 6. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO PROTEICA DO FARELO DE SOJA (FS) E DOSES DE FITASE NO COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDADE ILEAL APARENTE (CDIA) DE MATÉRIA SECA (MS), PROTEÍNA BRUTA (PB), CINZAS, CÁLCIO (Ca), FÓSFORO (P) E ENERGIA DIGESTÍVEL ILEAL (EDI) DE FRANGOS DE CORTE AOS 21 DIAS.

| FS (% PB) | Fitase (FYT/kg) | MS (%) | PB (%) | Cinzas (%) | Ca (%) | P (%) | EDI (kcal) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| FS x Fitase | | | | | | | |
| 45 | 1,000 | 70,79 | 81,89 | 51,62 | 63,05 | 71,53 | 3.472 |
| 47 | | 69,65 | 81,39 | 50,16 | 59,69 | 65,03 | 3.431 |
| 45 | 2,500 | 71,55 | 81,71 | 52,40 | 63,42 | 77,06 | 3.616 |
| 47 | | 73,25 | 82,88 | 54,92 | 62,50 | 75,70 | 3.639 |
| SEM | | 0,754 | 0,594 | 1,130 | 1,880 | 1,526 | 30.100 |
| Efeito do FS (% PB) | | | | | | | |
| 45 | | 71,17 | 81,80 | 52,01 | 63,23 | 74,29 | 3.544 |
| 47 | | 71,45 | 82,13 | 52,54 | 61,10 | 70,37 | 3.535 |
| Efeito da Fitase (FYT/kg) | | | | | | | |
| | 1,000 | 70,27 | 81,64 | 50,89 | 61,37 | 68,28 | 3.452 |
| | 2,500 | 72,40 | 82,30 | 53,66 | 62,96 | 76,38 | 3.627 |
| P-value | | | | | | | |
| FS | | 0,716 | 0,577 | 0,641 | 0,261 | 0,013 | 0,770 |
| Fitase | | 0,006 | 0,277 | 0,018 | 0,403 | <0,001 | <0,001 |
| Interação | | 0,070 | 0,165 | 0,086 | 0,519 | 0,100 | 0,297 |

SEM = erro padrão da média.

Embora o CDIA da PB e Ca não tenha sido afetado pela concentração de proteína do FS nem pela inclusão da fitase a 21 d ($P > 0,05$), foi observada uma interação para a digestibilidade ileal de todos os nutrientes avaliados e EDI a 42 d ($P < 0,05$; Tabela 7). Os maiores CDIA de MS, PB, cinzas, Ca e P, bem como EDI, foram obtidos de frangos de corte alimentados com 47% de PB e suplementados com 2.500 FYT quando comparados a tratamentos com menor concentração proteica (45%), e menor dose de fitase (1.000 FYT). Em relação ao Ca, níveis dietéticos mais elevados deste mineral podem contribuir para a formação de complexos estáveis entre Ca e fitato, inibindo a hidrólise deste último (AMERAH et al., 2014), mas RAVINDRAN et al. (2008) demonstraram que a suplementação com fitase (500 FTU/kg) pode melhorar eficientemente a disponibilidade ileal de Ca e outros minerais. Similar aos nossos resultados, SANTOS et al. (2008) verificaram que a digestibilidade de Ca não foi afetada pela fitase em frangos de corte de 21 dias, mas foi melhorada com o uso de 1.000 FTU em dietas de frangos de corte mais velhos (35 dias de idade). Os autores relacionaram este resultado com a razão Ca:P mais alta em suas dietas iniciais, embora no estudo atual a razão Ca:P tenha sido mantida em 2:1 em ambas as dietas. A falta de efeito sobre a digestibilidade de

Ca e também a digestibilidade de PB aos 21 d está mais provavelmente relacionada a fatores de idade, tais como o desenvolvimento intestinal, que podem afetar a eficácia da fitase, (BABATUNDE et al., 2019).

TABELA 7. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO PROTEICA DO FARELO DE SOJA (FS) E DOSES DE FITASE NO COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDADE ILEAL APARENTE (CDIA) DA MATÉRIA SECA (MS), PROTEÍNA BRUTA (PB), CINZAS, CÁLCIO (Ca), FÓSFORO (P), E ENERGIA DIGESTÍVEL ILEAL (EDI) DE FRANGOS DE CORTE AOS 42 DIAS.

| FS (% PB) | Fitase (FYT/kg) | MS (%) | PB (%) | Cinzas (%) | Ca (%) | P (%) | EDI (kcal) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| FS x Fitase* | | | | | | | |
| 45 | 1,000 | 67,61[b] | 80,54[b] | 49,77[b] | 59,49[b] | 75,90[b] | 3.155[c] |
| 47 | | 67,34[b] | 80,63[b] | 46,08[c] | 52,67[c] | 70,45[c] | 3.160[c] |
| 45 | 2,500 | 68,59[b] | 79,85[b] | 46,00[c] | 52,61[c] | 74,79[b] | 3.345[b] |
| 47 | | 76,42[a] | 84,08[a] | 54,03[a] | 64,82[a] | 81,22[a] | 3641[a] |
| SEM | | 0,654 | 0,352 | 0,606 | 1,183 | 0,843 | 31,271 |
| Efeito do FS (% PB) | | | | | | | |
| 45 | | 69,10 | 80,19 | 47,88 | 56,05 | 75,34 | 3.250 |
| 47 | | 71,80 | 82,30 | 50,06 | 58,74 | 75,83 | 3.401 |
| Efeito da Fitase (FYT/kg) | | | | | | | |
| | 1,000 | 67,47 | 80,58 | 47,92 | 56,08 | 73,17 | 3.158 |
| | 2,500 | 72,50 | 81,96 | 50,00 | 58,71 | 78,01 | 3.493 |
| *P*-values | | | | | | | |
| FS | | <0,001 | 0,647 | 0,001 | 0,313 | 0,845 | 0,030 |
| Fitase | | 0,061 | 0,837 | 0,008 | 0,070 | 0,006 | <0,001 |
| Interação | | 0,001 | 0,027 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 |

SEM = erro padrão da média.
*Os caracteres seguidos por letras minúsculas diferem na mesma coluna (P < 0,05).

Efeitos extra-fosfóricos foram observados neste estudo, pois a digestibilidade ileal da MS, Ca, e PB, e também a utilização de energia foram melhoradas pela maior dose de fitase. Outros estudos destacam o efeito de altas doses de fitase no aumento da energia dietética, digestibilidade e solubilidade de outros nutrientes além do P em dietas de frangos de corte (WALK e RAMA RAO, 2020; DERSJANT-LI & KWAKERNAAK, 2019; COWIESON et al., 2017; WALK et al., 2013). Como declarado por BEESON et al. (2017), maiores concentrações de fitase na dieta podem intensificar a desfosforilação do fitato, contribuindo para a eliminação do IP6 e de menores ésteres de fitato (IP5-IP1) do trato e, portanto, aumentando a disponibilidade de nutrientes anteriormente ligados ao fitato, além de melhorar a solubilidade geral dos nutrientes à medida que os efeitos antinutrientes causados pela presença do fitato são dificultados.

Os resultados de digestibilidade obtidos a partir da interação entre a concentração de fitase e proteínas do FS estão possivelmente relacionados à diferentes inclusões de casca da soja nas dietas, pois, como mencionado anteriormente, o FS descascado tem uma melhor

qualidade nutricional do que o FS não descascado (SWICK, 1998; IBÁÑEZ et al., 2020). Estudos demonstraram que a maior presença de carboidratos indigestíveis no FS, tais como fibras e oligossacarídeos, pode dificultar a utilização de proteínas dietéticas, AA e energia em dietas para aves (KOCHER et al., 2003; GERBER et al., 2006; CHOCT et al., 2010; SINGH et al., 2019), e isto porque as enzimas terão acesso limitado aos substratos mantidos na parede celular.

Outros parâmetros do FS também têm influência no valor nutricional, por exemplo, fonte e genótipo, que por sua vez afetam a digestibilidade dos nutrientes (COCA-SINOVA et al., 2008), e sua resposta às enzimas exógenas (SINGH et al., 2019). Além disso, 10% do conteúdo do fitato dos grãos estão localizados na casca (ABDELRAHMAN et al., 1984). Portanto, maior inclusão de casca também aumentaria a presença de fitato na dieta.

Não se sabe qual é a concentração de fitato em uma dieta necessária para obter uma resposta de alta dosagem de fitase, embora pareça haver um limiar particular acima do qual as respostas de fitase são elevadas, ou maiores concentrações de inclusão de fitase são justificadas (COWIESON et al., 2016). Neste estudo, o uso de um FS com maior concentração de PB (47%), ou menor inclusão de casca, juntamente com uma dose maior de fitase (2.500 FYT/kg), levou a melhorias na utilização de nutrientes e energia a 42 dias de idade.

## 3.3 MIO-INOSITOL

Não foram observadas interações para MIO no plasma ($P > 0,05$; Tabela 8) em 21 e 42 d. Esta variável não foi afetada pelo conteúdo de proteína do FS em nenhuma das idades avaliadas ($P > 0,05$), mas MIO no plasma, tanto das aves de 21 e 42 dias de idade foram respectivamente 26,76% e 9,97% maiores com o uso de 2.500 FYT em comparação com a dose mais baixa ($P < 0,01$). Ao potencializar a hidrólise de fitato, o uso de doses maiores de fitase também aumenta a concentração e absorção de MIO, que resulta da completa desfosforilação do fitato, como foi verificado por outros estudos (COWIESON et al., 2015; SOMMERFELD et al., 2018; WALK & OLUKOSI, 2019). Uma vez absorvida, a molécula de MIO parece participar de muitas funções metabólicas, tais como processos de transporte de glicose, atuando como insulino-mimético, metabolismo lipídico, equilíbrio osmótico em tecidos específicos, absorção mineral e funções antioxidantes (GONZALEZ-UARQUIN et al., 2020). Por esta razão, maiores concentrações de MIO no organismo de frangos de corte são frequentemente

associadas a um melhor desempenho de crescimento e disponibilidade de nutrientes (PIGORZLIEV et al., 2019; SOMMERFELD et al., 2018; PIRGOZLIEV et al., 2017). No estudo atual, entretanto, embora o plasma MIO tenha sido aumentado pela maior dose de fitase a 42 d, aparentemente não teve efeito no desempenho zootécnico entre 22 e 42 d.

TABELA 8. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DO FARELO DE SOJA (FS) E DOSES DE FITASE SOBRE OS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE MIO-INOSITOL (MIO) EM FRANGOS DE CORTE AOS 21 E 42 DIAS DE IDADE.

| FS (% PB) | Fitase (FYT/kg) | MIO (µmol/L) | |
|---|---|---|---|
| | | 21 d | 42 d |
| FS x Fitase | | | |
| 45 | 1,000 | 243.42 | 252.00 |
| 47 | | 209.33 | 240.25 |
| 45 | 2,500 | 286.25 | 266.83 |
| 47 | | 307.00 | 276.75 |
| SEM | | 16.188 | 11.487 |
| Efeito do FS (% PB) | | | |
| 45 | | 264.83 | 259.39 |
| 47 | | 258.17 | 258.44 |
| Efeito da fitase (FYT/kg) | | | |
| | 1,000 | 226.37 | 246.05 |
| | 2,500 | 296.33 | 271.78 |
| *P*-values | | | |
| FS | | 0.682 | 0.936 |
| Fitase | | 0.001 | 0.030 |
| Interação | | 0.104 | 0.350 |

SEM = erro padrão da média.
PB = Proteína bruta.

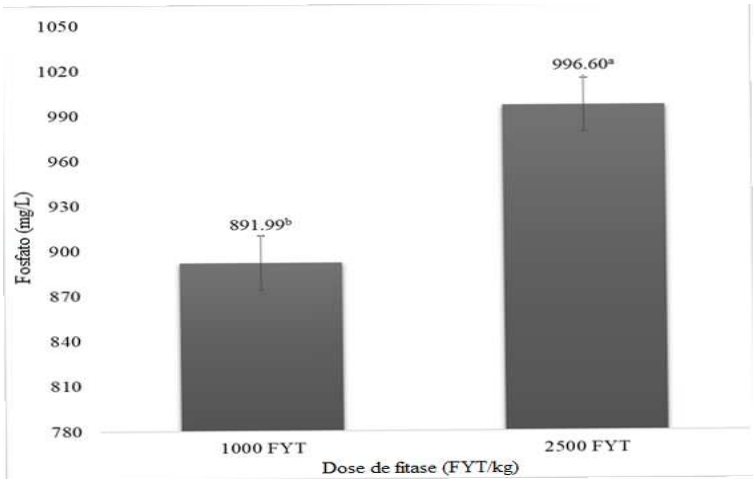
## 3.4 LIBERAÇÃO DE $PO_4^{-3}$ *IN VITRO*

A determinação do $PO_4^{-3}$ em amostras químicas foi realizada em muitos estudos com métodos de cromatografia iônica (KAISER et al., 2001; DEBORBA et al., 2004; GENG et al., 2008). TALAMOND et al. (2000) propuseram o uso da cromatografia de troca aniônica de alto desempenho com detecção de condutividade (HPAEC-CD) como uma técnica para determinar ácido fítico em amostras de alimentos, e foi comprovado pelos autores como sendo capaz de quantificar este analito de diferentes fontes, tais como cereais e oleaginosas. No estudo atual, a técnica HPAEC-CD foi utilizada para quantificar $PO_4^{-3}$ a partir de amostras de alimentos, medindo a condutividade gerada pelos grupos $PO_4^{-3}$ liberados da hidrólise IP6 e comparando-a com curvas padrão previamente definidas.

Nas dietas da fase inicial, a disponibilidade de $PO_4^{-3}$ foi maior na ração contendo 2.500 FYT/kg ao invés de 1.000 FYT/kg ($P < 0,01$; Figura 1), pois a liberação *in vitro* de $PO_4^{-3}$ foi aumentada em 11,07% com a dose de fitase mais alta. Este resultado é um resultado de uma maior taxa de desfosforilação do fitato, já que os grupos $PO_4^{-3}$ estão sendo liberados do anel de

MIO IP6. Outros estudos também utilizaram a cromatografia iônica para avaliar a eficácia da fitase *in vitro*, mas com diferentes métodos de detecção de fosfato ou fosfato de açúcar, ou seja, quantificando ésteres inferiores de fitato (IP5-IP1) em vez da presença de grupos $PO_4^{-3}$. MENEZES-BLACKBURN et al. (2015) compararam a eficácia de sete fitases comerciais em uma simulação *in vitro* do trato gastrointestinal de aves e observaram que o uso de doses crescentes de até 1.000 FTU resultou em maior presença de ésteres de fosfato de MIO em amostras de trigo em comparação com doses menores das enzimas. ZELLER et al. (2014) também detectaram maiores concentrações *in vitro* de IP5-IP1 em dietas completas de milho-FS com adição de três fitases comerciais (um *A. niger* e dois *E. coli*) nas mesmas doses (~450 U/kg) em comparação com a mesma dieta sem fitase. Da mesma forma, HIRVONEN et al. (2019) relataram redução do fitato alimentar e acúmulo de ésteres fosfatados inferiores no milho, FS e dietas completas de milho-FS, já que o IP6 de amostras de milho e FS, por exemplo, foi 100% hidrolisado com a adição de 1.500 e 2.000 FTU/kg de dose. Embora o método de detecção de fosfatos nestes estudos anteriores seja diferente do aplicado no estudo atual, eles provam igualmente a eficácia da enzima no hidrolisado de fitato, e como esta reação pode ser ainda mais potencializada com o uso de doses maiores, acima de 1.000 FTU/kg.

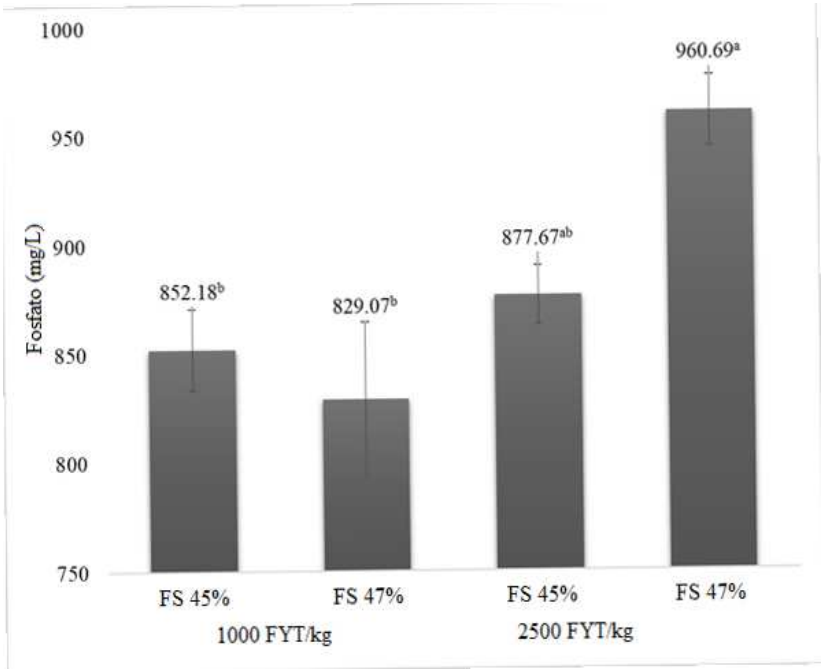
FIGURA 1. EFEITO DE DIFERENTES DOSES DE FITASE NA LIBERAÇÃO DE FOSFATO *IN VITRO* DE DIETAS INICIAIS DE FRANGO DE CORTE À BASE DE MILHO E FARELO DE SOJA (P < 0,01; SEM = 18,012).




Nas dietas de crescimento/terminação, houve interação entre as doses de fitase e o conteúdo proteico do FS (P > 0,05; Figura 2), já que a dieta com FS com 47% de PB e 2.500 FYT/kg resultou em maior liberação *in vitro* de $PO_4^{-3}$ em comparação com outros tratamentos. Este resultado pode ser comparado ao observado com a digestibilidade ileal dos nutrientes a 42

d, em que este mesmo tratamento teve os melhores resultados para o nutriente CDIA e EDI. Novamente, esta maior liberação de $PO_4^{-3}$ poderia estar ligada à melhor qualidade nutricional do FS (menos inclusão de casca, ou seja, menos fitato e maior concentração de PB), o que, juntamente com uma maior dose de fitase, levou a uma atividade de fitase mais eficiente.

FIGURA 2. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA DO FARELO DE SOJA (FS) E DIFERENTES DOSES DE FITASE NA LIBERAÇÃO *IN VITRO* DE FOSFATO EM DIETAS CRESCICMENTO/TERMINAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE A BASE DE MILHO E DE FARELO DE SOJA (P < 0,05; SEM = 22,670).




## 3.5 COMPOSIÇÃO MINERAL ÓSSEA E CINZAS DO DEDO

Uma mineralização óssea adequada é um reflexo de boa qualidade óssea, associada ao alto desempenho de crescimento animal, substancial para apoiar o desenvolvimento muscular (CARDOSO et al. 2010), e é comumente usada como um indicador de disponibilidade e absorção de P dietética adequada (WATKINS, 1992), daí sua importância em estudos envolvendo suplementação de fitase. Neste estudo, foi observado efeito de interação (P < 0,01) para o conteúdo de Ca no osso da tíbia aos 21 dias de idade (TABELA 9).

TABELA 9. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO PROTEICA DO FARELO DE SOJA (FS) E DE DOSES DE FITASE SOBRE AS CINZAS, CÁLCIO (Ca), PORCENTAGEM DE FÓSFORO (P) E ÍNDICE DE SEEDOR (IS) DO OSSO DA TÍBIA E CINZAS DOS DEDOS AOS 21-DIAS E OSSO DA TÍBIA DE FRANGOS DE CORTE AOS 42-DIAS DE IDADE.

| FS (% PB) | Fitase (FYT/kg) | 21 d | | | | | 42 d | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Cinzas (%) | Ca (%) | P (%) | IS (mg/mm) | Cinzas do dedo (%) | Cinzas (%) | Ca (%) | P (%) | IS (mg/mm) |
| Interação* | | | | | | | | | | |
| 45 | 1.000 | 56,06 | 19,81[b] | 10,02 | 25,74 | 42,44 | 44,39 | 15,64[ab] | 8,42 | 73,22 |
| 47 | | 56,58 | 22,03[a] | 10,13 | 25,31 | 43,70 | 44,36 | 15,41[ab] | 8,26 | 74,79 |
| 45 | 2.500 | 58,23 | 22,82[a] | 10,28 | 27,42 | 44,12 | 43,89 | 15,17[b] | 8,37 | 73,04 |
| 47 | | 58,56 | 21,50[a] | 10,14 | 27,66 | 44,14 | 44,83 | 15,85[a] | 8,63 | 75,23 |
| SEM | | 0,291 | 0,332 | 0,051 | 0,267 | 0,388 | 0,654 | 0,188 | 0,142 | 1,948 |
| Efeito do FS (% PB) | | | | | | | | | | |
| 45 | | 57,14 | 21,32 | 10,15 | 26,58 | 43,28 | 44,14 | 15,46 | 8,41 | 73,13 |
| 47 | | 57,57 | 21,75 | 10,13 | 26,48 | 43,91 | 44,60 | 15,69 | 8,45 | 75,01 |
| Efeito da fitase (FYT/kg) | | | | | | | | | | |
| | 1.000 | 56,30 | 20,90 | 10,07 | 25,52 | 42,44 | 44,38 | 15,92 | 8,36 | 74,00 |
| | 2.500 | 58,40 | 22,15 | 10,21 | 27,53 | 44,13 | 44,36 | 15,23 | 8,50 | 74,14 |
| P-value | | | | | | | | | | |
| FS | | 0,352 | 0,456 | 0,836 | 0,882 | 0,112 | 0,980 | 0,921 | 0,343 | 0,945 |
| Fitase | | <0,001 | 0,040 | 0,155 | 0,004 | 0,008 | 0,505 | 0,242 | 0,842 | 0,339 |
| Interação | | 0,837 | 0,003 | 0,161 | 0,619 | 0,116 | 0,479 | 0,020 | 0,120 | 0,874 |

SEM = erro padrão da média.
PB = Proteína bruta.
*Os caracteres seguidos de letras minúsculas diferem na mesma coluna ($P < 0,05$).

Frangos de corte alimentados com dieta formuladas com o FS com 45% de PB e 1.000 FYT apresentaram um conteúdo de Ca ósseo menor do que outros tratamentos. Ao aumentar a dose de fitase para 2.500 FYT, o conteúdo de Ca nos ossos foi estatisticamente similar para ambas as concentrações de proteína do FS. Possivelmente, o tratamento dietético com menor dose de fitase e qualidade nutricional inferior do FS (ou seja, maior adição de casca de soja) permitiu a formação de complexos de Ca-Fitato que prejudicaram a disponibilidade de Ca (AMERAH et al., 2014), o que poderia explicar a menor retenção de Ca no osso, embora a digestibilidade de Ca a 21 d não tenha sido significativamente afetada pelos tratamentos dietéticos. Aos 42 dias de idade, foi observada uma interação também para o conteúdo de Ca ($P < 0,05$). Nas dietas formuladas com o FS com 47% de PB e 2.500 FYT forneceu maior conteúdo de Ca na tíbia. A digestibilidade de Ca para o mesmo tratamento dietético aos 42 dias

também foi maior do que outros tratamentos, o que ajuda a explicar o aumento do conteúdo de Ca encontrado na tíbia. Os tratamentos não tiveram efeito sobre as variáveis de composição mineral da tíbia (Cinzas, P, e IS) aos 42 dias.

Considerando os principais efeitos observados aos 21 dias, a suplementação com uma dose maior de fitase (2.500 FYT) resultou em um teor de cinzas 2,10% maior no osso ($P < 0,001$), maior IS ($P < 0,01$), e 1,69% maior de cinzas do dedo do pé ($P < 0,01$) em comparação com a dose menor (1.000 FYT). Cinzas ósseas maiores estão associadas a um aumento na quantidade de P disponível (MITCHELL, 1996), e também é descrito como um parâmetro eficiente para estimar a quantidade de fitato-P liberado nas dietas à base de milho e FS (PEREIRA et al., 2012). Muitos estudos relataram similarmente um maior teor de cinzas na tíbia óssea de frangos de corte alimentados com dietas suplementadas com fitase (CAMDEN et al., 2001; HAN et al., 2009; SOUSA et al., 2015; WALK & RAMA RAO, 2020). A cinza da tíbia é também representada como equivalente à cinza da tíbia como um meio de determinar a qualidade óssea (FRITZ & ROBERTS, 1968; YOSHIDA & HOSHII, 1983; YAN et al., 2005), e também foi aumentada com o uso de uma dose maior de fitase. IS leva em consideração o volume ósseo, e um maior valor IS significa uma maior densidade mineral óssea (SEEDOR, 1993), possivelmente um reflexo de um maior conteúdo de cinzas ósseas.

A concentração de proteína do FS não teve efeito significativo nas variáveis de composição mineral óssea ($P > 0,05$), e os tratamentos não afetaram o conteúdo de P ósseo ($P > 0,05$) em nenhuma das idades. Como o conteúdo de cinzas era significativamente maior com o uso de uma dose maior de fitase, esperava-se que o conteúdo de P no osso também aumentasse. WALK & RAMA RAO (2020) explica, entretanto, que variações aleatórias ou diferenças no conteúdo de Ca e P na matriz óssea poderiam explicar as variabilidades em relação aos resultados da composição mineral óssea.

## 4 CONCLUSÃO

A suplementação de uma dose maior de fitase (2.500 FYT/kg) tanto na fase inicial quanto na fase de crescimento/terminação promoveu efeitos positivos na digestibilidade ileal de nutrientes, energia digestível e mineralização óssea, além de uma maior provisão de mio-inositol e liberação de fosfato *in vitro*. Embora a concentração de proteína do FS não tenha tido efeitos significativos per se, as interações detectadas mostraram que o uso de um FS de

qualidade nutricional superior combinada com maiores doses de fitase aumenta a digestibilidade da dieta, a utilização de energia e a hidrólise de fitato, embora o desempenho zootécnico não tenha sido alterado pelos diferentes tratamentos.

## 5 REFERÊNCIAS

ABDELRAHMAN, A. et al. The proportions and chemical compositions of hand-dissected anatomical parts of pearl millet. **Journal Cereal Science**. 2:127-133. 1984.

AMERAH, A. M. et al. Effect of calcium level and phytase addition on ileal phytate degradation and amino acid digestibility of broilers fed corn-based diets1. **Poultry Science** 93:906–915. 2014.

ANGEL, C. R. et al. Non-phytin phosphorus requirement of broilers fed a four-phytase feeding program. Pages 416–427 in **Addressing Anim. Prod. Environ. Issues. Research** Triangle Park, Durham, NC. 2001.

AOAC International. 1995. **Official and tentative methods of analysis**. 16th ed. Arlington, Virginia.

BABATUNDE, O. O. et al. Influence of age and duration of feeding low-phosphorus diet on phytase efficacy in broiler chickens during the starter phase. **Poultry Science** 98:2588-2597. 2019.

BEESON, L. A. et al. Hydrolysis of phytate to its lower esters can influence the growth performance and nutrient utilization of broilers with regular or super doses of phytase. **Poultry Science** 96:2243–2253. 2017.

BROCH, J. et al. Effect of dietary phytase superdosing on broiler performance. **Animal Feed Science and Technology**. 2018:56-65. 2018.

CAMDEN, B. J. et al. Effectiveness of exogenous microbial phytase in improving the bioavailabilities of phosphorus and other nutrients in maize-soya-bean meal diets for broilers. **Animal Science** 73:2089-297. 2001.

CARDOSO JÚNIOR, A. et al. Levels of available phosphorus and calcium for broilers from 8 to 35 days of age fed rations containing phytase. **Revista Brasileira de Zootecnia** 39:1237–1245. 2010.

CHOCT, M. et al. Soy oligosaccharides and soluble non-starch polysaccharides: a review of digestion, nutritive and anti-nutritive effects in pigs and poultry. **Asian-Australasian Journal Animal Science** 23:1386–1398. 2010.

COCA-SINOVA, A. et al. Apparent ileal digestibility of energy, nitrogen, and amino acids of soybean meals of different origin in broilers. **Poultry Science** 87:2613-2623. 2008.

COWIESON, A. J. et al. Phytic acid and phytase: Implications for protein utilization by poultry. **Poultry Science** 85:878–885. 2006.

COWIESON A. J. et al. Possible involvement of myo-inositol in the physiological response of broilers to high doses of microbial phytase. **Animal Prod. Science** 55:710–719. 2015.

COWIESON, A. J. et al. Phytate-free nutrition: A new paradigm in monogastric animal production. **Animal Feed Science and Technology**. 222:180-189. 2016.

COWIESON, A. J. et al. A systemic view on the effect of phytase on ileal amino acid digestibility in broilers. **Animal Feed Science and Technology** 225:182-194, 2017.

DEBORBA, B. M. et al. Development and validation of an assay for citric acid/citrate and phosphate in pharmaceutical dosage forms using ion chromatography with suppressed conductivity detection. **J. Pharm. Biomed**. 36:517-524. 2004.

DERSJANT-LI, Y.; KWAKERNAAK, C. Comparative effects of two phytases versus increasing the inorganic phosphorus content of the diet, on nutrient and amino acid digestibility in boilers. **Animal Feed Science and Technology** 253:166-180. 2019.

ENGELEN, A. J. et al. Simple and rapid determination of phytase activity. **J. AOAC Int**. 77:760-764. 1994.

FRITZ, J. C.; ROBERTS, T. Use of toe ash as a measure of calcification in the chick. **J. Assoc. Official Agr. Chem**. 51:591–594. 1968.

GENG, X. et al. Determination of organic acids in the presence of inorganic anions by ion chromatography with suppressed conductivity detection. **J. Chromatography A** 1192:187-190. 2008.

GERBER, L. F. P. et al. Effect of soybean meal composition on broiler performance and metabolism. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 35:1359-1365. 2006.

GONZALEZ-UARQUIN, F. M. et al. Myoinositol: its metabolism and potential implications for poultry nutrition – a review. **Poultry Science** 99:893–905. 2020.

HAN, J. C. et al. Evaluation of equivalency values of microbial phytase to inorganic phosphorus in 22- to 42-day-old broilers. **Journal Applied Poultry Research** 18:707–715. 2009.

HIRVONEN, J. et al. Effect of phytase on *in vitro* hydrolysis of phytate and the formation of myo-inositol phosphate esters in various feed materials. **Journal Agriculture Food Chemistry** 67:11396-11402. 2019.

Hurrell, R. F. 2003. Influence of vegetable protein sources on trace element and mineral bioavailability. **Journal Nutrition** 133:2973-2977.

IBÁÑEZ, M. A., et al. Chemical composition, protein quality and nutritive value of commercial soybean meals produced from beans from different countries: A meta-analytical study. **Animal Feed Science and Technology** 267:1-15. 2020.

KAISER, E. et al. Determination of trace anions in high-nitrate matrices by ion chromatography. **J. Chromatography A** 920:127-133. 2001.

KIARIE, E. et al. Efficacy of new 6-phytase from Buttiauxella spp. on growth performance and nutrient retention in broiler chickens fed corn soybean meal-based diets. **Asian Australasian Journal Animal Science** 28:1479-1487. 2015.

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

LEUNG K.Y. et al. Quantitative analysis of myo-inositol in urine, blood and nutritional supplements by high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **J. Chromatography, Analyt. Tech. Biomed. Life Sci**. 879:2759-2763. 2011.

LUDTKE, C.B. et al. Abate humanitário de aves. **World Society for the Protection of Animals**, 1st ed. Copacabana, Rio de Janeiro, Brazil. 2010.

MENEZES-BLACKBURN, D. et al. Performance of seven commercial phytases in an *in vitro* simulation of poultry digestive tract. **Journal Agric. Food Chemistry** 63:6142-6149. 2015.

MITCHELL, R. D.; EDWARDS JR, H. M. Effects of phytase and 1,25-dihydroxycholecalciferol on phytate utilization and the quantitative requirement for calcium and phosphorus in young broiler chickens. **Poultry Science** 75:95–110. 1996.

National Research Council. **Nutrient Requirements of Poultry**. 9th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC. 1994.

PARK, Y. H. et al. Effects of three different soybean meal sources on layer and broiler performance. **Journal Animal Science** 15:254-265. 2001.

PIRFOZLIEV, V. R. et al. Phosphorus utilisation and growth performance of broiler chicken fed diets containing graded levels of supplementary myo-inositol with and without exogenous phytase. **Journal World Poultry Research** 7:1–7. 2017.

PIRFOZLIEV, V. R. et al. Manipulation of plasma myo-inositol in broiler chickens: effect on growth performance, dietary energy, nutrient availability, and hepatic function. **Poultry Science** 98:260–268. 2019.

PEREIRA, R. et al. Efficiency of a bacterial phytase to release phytate phosphorus in broiler chicken diets. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**. 64:137-144. 2012.

RAVINDRAN, V., Phytases in poultry nutrition. An overview. **Poultry Science** 7, 135–139. 1995.

RAVINDRAN, V. et al. Influence of dietary electrolyte balance and microbial phytase on growth performance, nutrient utilization, and excreta quality of broiler chickens. **Poultry Science** 87:677-688. 2008.

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

SANTOS, F. R. et al. Effect of phytase supplementation in diets on nutrient digestibility and performance in broiler chicks. **Journal Applied Poultry Research** 17:191-201. 2008.

SANTOS, T. T. Phytate: anti-nutrient for poultry and swine. **Feedstuffs** 84:1-3. 2012.

SEEDOR, J. G. The biophosphanate alendronate (MK-217) inhibit bone loss due to ovariectomy in rats. **Journal Bone Min. Res**. 4:265-270. 1993.

SINGH, A. K. et al. Effects of a combination of xylanase, amylase and protease, and probiotics on major nutrients including amino acids and non-starch polysaccharides utilization in broilers fed different level of fibers. **Poultry Science** 98:5571-5581. 2019.

SOMMERFELD, V. et al. Influence of phytase or myo-inositol supplements on performance and phytate degradation products in the crop, ileum, and blood of broiler chickens. **Poultry Science** 97:920-929. 2018.

SOUSA, J. P. L. et al. The effect of dietary phytase on broiler performance and digestive, bone, and blood biochemistry characteristics. **Revista Brasileira de Ciência Avícola** 17:69-76. 2015.

SWICK, R. A. US soybean meal: Present Quality and Future Trends. **ASA Technical Bulletin**. MITA No. 096/11/97. AN14- 1998. ASA. Singapore. 1998.

TALAMOND, P. et al. Anion-exchange high-performance liquid chromatography with conductivity detection for the analysis of phytic acid in food. **J. Chromatography A** 871:7-12. 2000.

VAN SOEST, P. J. et al. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal Dairy Scienc**e 74:3583–3597. 1991.

WALK, C. L. et al. Extra-phosphoric effects of superdoses of a novel microbial phytase. **Poultry Science** 92:719-725. 2013.

WALK, C. L.; OLUKOSI, O. A. Influence of graded concentrations of phytase in high-phytate diets on growth performance, apparent ileal amino acid digestibility, and phytate concentration in broilers from hatch to day 28 post-hatch. **Poultry Science** 98:1-10. 2019.

WALK, C. L. et al. Influence of superdoses of a novel microbial phytase on growth performance, tibia ash, and gizzard phytate and inositol in young broilers. **Poultry Science** 93:1172–1177. 2014.

WALK, C. L.; RAMA RAO, S. V. Dietary phytate has a greater anti-nutrient effect on feed conversion ratio compared to body weight gain and greater doses of phytase are required to alleviate this effect as evidenced by prediction equations on growth performance, bone ash and phytate degradation in broilers. **Poultry Science** 99:246-255. 2020.

YAN, F. et al. Comparison of methods to evaluate bone mineralization. **Journal Applied Poultry Research** 14:492-498. 2005.

YOSHIDA, M.; HOSHII, H. Relationship between ash contents of the tibia bone and the toe of chicks. **Japanese Poultry Science** 20:51–54. 1983.

ZELLER, E. et al. Hydrolysis of phytate and formation of inositol phosphate isomers without or with supplemented phytases in different segments of the digestive tract of broilers. **Journal Nutrition Science**. 4:1-12. 2015.

ZYLA, K. et al. Simultaneous application of phytase and xylanase to broiler feeds based on wheat: *in vitro* measurements of phosphorus and pentose release from wheats and wheat-based feeds. **Journal of Science Food and Agriculture**. 79:1832-1840. 1999.

# CAPÍTULO III – EFEITO DA INCLUSÃO DE UMA PROTEASE MONOCOMPONENTE EM DIETAS COM DIFERENTES NÍVEIS DE PROTEÍNA E AMINOÁCIDOS SOBRE DESEMPENHO E RENDIMENTO DE CARCAÇA DE FRANGOS DE CORTE E SOLUBILIDADE *IN VITRO* DE PROTEÍNA

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de diferentes níveis de proteína bruta e aminoácidos em dietas de frangos de corte com ou sem inclusão de uma protease exógena. Um total de 1200 frangos de um dia de idade foram distribuídos de 1 a 42 dias em um delineamento fatorial 2x2 inteiramente casualizado com: uma dieta basal e uma dieta reduzida (com redução dos níveis de proteína bruta e aminoácidos) com ou sem a suplementação exógena de 15000 unidades de protease (PROT)/kg, totalizando 4 tratamentos com 12 repetições de 25 frangos cada. As variáveis avaliadas *in vivo* incluíram: consumo de ração, ganho de peso corporal (GP) e taxa de conversão alimentar (CA) nas fases iniciais (1 a 21 d), crescimento (22 a 35 d), e final (36 a 42 d); rendimento de carcaça, peito, coxa e sobrecoxa, e percentual de gordura abdominal aos 42 dias. Foi realizado um teste *in vitro* para avaliar a solubilidade proteica das dietas. Dietas reduzidas resultaram em ganho de peso inferior ($P < 0,05$) nas fases iniciais e crescimento, e ganho de peso e conversão inferiores ($P < 0,01$) no período total avaliado (1 a 42 d). A redução dos níveis de proteína bruta e aminoácidos também reduziu o rendimento de peito e aumentou a gordura abdominal ($P < 0,01$), além de apresentar uma tendência para menor rendimento de carcaça ($P = 0,07$). A suplementação de protease não teve efeito sobre o desempenho de crescimento e as variáveis de carcaça. A protease melhorou o conteúdo de proteína solúvel ($P < 0,05$) das dietas em cada fase no teste *in vitro*, mas a solubilidade da proteína não diferiu entre dietas basais e reduzidas. Em conclusão, a suplementação de dietas com uma protease aumentou a solubilidade proteica, mas não correspondeu com efeitos positivos no desempenho e rendimento de carcaça de frangos de corte.

**Palavras-chave**: Aminoácido, Carcaça, Frango de corte, Protease, Proteína bruta

**EFFECT OF INCLUSION OF A MONO-COMPONENT PROTEASE ON DIETS WITH DIFFERENT PROTEIN AND AMINO ACID LEVELS ON GROWTH PERFORMANCE AND CARCASS YIELD OF BROILERS, AND *IN VITRO* PROTEIN SOLUBILITY**

## ABSTRACTS

The objective of this study was to evaluate the effect of different contents of crude protein and amino acids of broiler diets with or without the inclusion of a mono-component protease. A total of 1,200 one-d-old broilers were distributed from 1 to 42 days in a 2x2 completely randomized factorial arrangement with: a basal diet and a reduced diet (with reduction of crude protein and amino acid levels) with or without the exogenous supplementation of 15,000 protease units (PROT)/kg, totaling 4 treatments with 12 replicates of 25 broilers each. Evaluated *in vivo* variables included: feed intake, body weight gain, and feed conversion ratio on starter (1 to 21 d), grower (22 to 35 d), and finisher phases (36 to 42 d); carcass yield, breast yield, thigh and drumstick yield, and abdominal fat percentage at 42 days. An *in vitro* test was conducted to evaluate protein solubility. Reduced diets resulted in lower body weight gain ($P < 0.05$) on starter and grower phases, and impaired body weight gain and feed conversion ($P < 0.01$) on the total evaluated period (1 to 42 d). Reduction of crude protein and amino acid levels also reduced breast yield and increased abdominal fat ($P < 0.01$), showing a trend of lower carcass yield ($P = 0.07$). Protease supplementation had no effect on growth performance and carcass variables. Protease improved the soluble protein content ($P < 0.05$) of the diets in each phase in the *in vitro* test, but protein solubility did not differ between basal and reduced diets. In conclusion, supplementation of diets with a protease increased protein solubility, but did not correspond with positive effects on growth performance and carcass variables of broiler chickens.

**Key words:** Amino acid, Broilers, Carcass, Crude protein, Protease

# 1 INTRODUÇÃO

A redução do teor de proteína bruta (PB) e aminoácidos (AA) na dieta para frangos de corte é objeto de vários estudos, visando não apenas a redução de custos, mas também a mitigação de problemas ambientais relacionadas à poluição por N e altas emissões de amônia. Aproximadamente 70 a 75% do N que é ingerido pelos animais pode ser perdido em processos metabólicos ou ser excretado devido à metabolização ineficiente dos AA absorvidos ou à oxidação do excesso de AA na dieta (NAHM, 2007).

A inclusão de AA sintéticos e enzimas exógenas (como proteases) são ferramentas comuns usadas para reduzir o conteúdo de PB na dieta, reduzindo consequentemente a inclusão de farelo de soja (FS). Dietas contendo menos FS e com níveis reduzidos de PB requerem uma maior variedade de AA sintéticos, necessária para não comprometer o desempenho de crescimento do animal (SELLE et al., 2020) - níveis de AA não essenciais também são reduzidos, a exemplo de glicina e serina (DEAN et al., 2006) – e para tanto, AA sintéticos são usados para suprir as exigências de AA e proteases exógenas são usadas para melhorar a utilização de proteínas da dieta.

O FS é considerado um ingrediente altamente digestível para aves, porém existem oportunidades de melhorar seu valor nutricional. Tido como uma importante fonte de proteína, o FS também contém componentes antinutrientes e uma alta variação de características químicas e físicas (DOZIER e HESS, 2011). As altas temperaturas empregadas durante o processamento do FS podem não ser suficientes para inativar todos os fatores antinutrientes que levam a inibição de enzimas pancreáticas, como a tripsina (CLARKE & WISEMAN, 2005), deste modo tanto a redução da inclusão de FS em dietas quanto a melhoria de sua digestibilidade por meio do uso de proteases são cruciais para melhorar a utilização da dieta por frangos de corte.

As enzimas exógenas não somente promovem melhor utilização dos nutrientes contidos nos ingredientes, mas aumentam a flexibilidade de estratégias de formulação para nutricionistas (ANGEL et al., 2011). Também se postula que as enzimas exógenas podem apresentar uma oportunidade de minimizar a produção de enzimas endógenas e reduzir o gasto energético do sistema secretor, assim melhorando o desempenho de crescimento (ISAKSEN et al., 2010).

Após o trabalho pioneiro de LEWIS et al. (1955) e BAKER et al. (1956), que foram capazes de mostrar o potencial de fontes exógenas de protease em suínos, os benefícios específicos da protease para dietas baseadas em FS não foram demonstrados de forma conclusiva até o início dos anos 90 (COWIESON & ROOS, 2016). A protease exógena oferece um valor considerável na redução do custo da ração, sustentabilidade ambiental e melhoria do desempenho de crescimento, valor este que provavelmente aumentará no futuro próximo à medida que a potencialidade desta enzima alimentar for compreendida.

Baseado nas considerações acima, o objetivo deste estudo foi avaliar a redução de níveis de PB e AA de dietas para frangos de corte com ou sem a suplementação de uma protease exógena sobre desempenho, rendimento de carcaça e solubilidade proteica.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil, com número de protocolo 071/2018.

### 2.1 ANIMAIS E INSTALAÇÕES

Um total de 1200 pintos de corte machos de um dia de idade (Cobb 500) foram alojados em boxes experimentais de 2,06 $m^2$ (densidade de 11,6 aves/$m^2$), sob cama de maravalha, equipados com bebedouros do tipo nipple e comedouros tubulares. A temperatura inicial foi ajustada para 30ºC e gradualmente reduzida para 20ºC até os 42 dias de idade. Durante os primeiros 10 dias, foi fornecida continuamente luz incandescente (24 h), após o qual foi aplicado um programa de iluminação de 9 h de escuridão por dia. Os boxes eram verificados diariamente para a remoção de aves mortas. Alimento e água foram oferecidos *ad libitum* durante todo o período experimental.

## 2.2 DELINEAMENTO E DIETAS EXPERIMENTAIS

Os tratamentos com os pintinhos foram distribuídos em um arranjo fatorial 2x2 inteiramente casualizado. Os fatores avaliados consistiram em 2 dietas: uma dieta basal e uma dieta reduzida (com redução dos níveis de PB e AA); e 2 doses de suplementação de protease: com ou sem a suplementação exógena de 15000 unidades de protease (PROT)/kg; totalizando 4 tratamentos com 12 repetições de 25 aves cada. As dietas foram baseadas em milho e FS e ofertadas na forma farelada (TABELA 1), e o programa de alimentação foi dividido em 3 fases: inicial (1 a 21 d), crescimento (22 a 35 d), e final (36 a 42 d). Todas as dietas continham 1500 unidades de fitase - FYT (RONOZYME® HiPhos Granulated Thermostable - DSM, Kaiseraugst, Suíça) e 80 unidades de amilase/kg de ração - KNU (RONOZYME® HiStarch - DSM, Kaiseraugst, Suíça).

TABELA 1. COMPOSIÇÃO E ANÁLISE CALCULADA DAS DIETAS EXPERIMENTAIS

| Ingredientes (%) | Inicial (1 a 21 d) | | Crescimento (22 a 35 d) | | Final (36 a 42 d) | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Basal | Reduzida[1,2] | Basal | Reduzida | Basal | Reduzida |
| Milho | 57,060 | 59,120 | 67,190 | 69,380 | 68,250 | 70,310 |
| Farelo de soja | 38,500 | 36,800 | 27,800 | 25,800 | 27,000 | 25,300 |
| Óleo de soja | 1,000 | 0,700 | 1,700 | 1,400 | 2,000 | 1,700 |
| Calcário | 1,170 | 1,170 | 1,150 | 1,160 | 1,010 | 1,010 |
| Fosfato bicálcico | 1,000 | 1,000 | 0,900 | 1,000 | 0,700 | 0,700 |
| Sal comum | 0,510 | 0,510 | 0,460 | 0,460 | 0,390 | 0,390 |
| L-Lisina HCl | 0,111 | 0,111 | 0,182 | 0,192 | 0,122 | 0,123 |
| L-Treonina | 0,032 | 0,006 | 0,055 | 0,033 | 0,034 | 0,007 |
| DL-Metionina | 0,264 | 0,239 | 0,211 | 0,189 | 0,183 | 0,158 |
| Cloreto de colina | 0,100 | 0,100 | 0,120 | 0,130 | 0,085 | 0,095 |
| Premix vitamínico[3] | 0,130 | 0,130 | 0,130 | 0,130 | 0,130 | 0,130 |
| Premix mineral[4] | 0,050 | 0,050 | 0,050 | 0,050 | 0,050 | 0,050 |
| Monensina sódica | 0,030 | 0,030 | 0,030 | 0,030 | 0,030 | 0,030 |
| Protease[5] | 0,020 | 0,020 | 0,020 | 0,020 | 0,020 | 0,020 |
| Fitase[6] | 0,015 | 0,015 | 0,015 | 0,015 | 0,015 | 0,015 |
| Amilase[7] | 0,005 | 0,005 | 0,005 | 0,005 | 0,005 | 0,005 |
| Composição química calculada | | | | | | |
| Energia metabolizável (kcal) | 2950 | 2950 | 3120 | 3120 | 3150 | 3150 |
| Proteína bruta (%) | 22,00 | 21,327 | 19,000 | 18,327 | 17,500 | 16,827 |
| Cálcio (%) | 0,893 | 0,893 | 0,860 | 0,860 | 0,730 | 0,730 |
| Fósforo disponível (%) | 0,448 | 0,448 | 0,420 | 0,420 | 0,380 | 0,380 |
| Lisina digestível (%) | 1,324 | 1,284 | 1,000 | 0,960 | 0,930 | 0,890 |
| Metionina digestível (%) | 0,596 | 0,583 | 0,503 | 0,490 | 0,438 | 0,425 |
| Metionina + cisteína digestível (%) | 0,963 | 0,924 | 0,770 | 0,731 | 0,706 | 0,667 |
| Treonina digestível (%) | 0,888 | 0,839 | 0,700 | 0,651 | 0,624 | 0,575 |
| Valina digestível (%) | 1,031 | 0,999 | 0,762 | 0,730 | 0,723 | 0,691 |
| Leucina digestível (%) | 1,848 | 1,826 | 1,522 | 1,500 | 1,323 | 1,301 |
| Isoleucina digestível (%) | 0,952 | 0,925 | 0,704 | 0,677 | 0,682 | 0,655 |
| Sódio (%) | 0,218 | 0,218 | 0,195 | 0,195 | 0,171 | 0,171 |
| Cloro (%) | 0,379 | 0,379 | 0,348 | 0,348 | 0,307 | 0,307 |

[1]Redução de proteína bruta, lisina digestível, metionina+cisteína, metionina, treonina, valina, leucina e isoleucina, conforme disponibilizados por 15000 PROT/kg de dieta.
[2]Somente quando os tratamentos continham protease. Para dietas sem protease, a inclusão de milho foi aumentada em 0,02%.
[3]Fornecido por quilograma de produto: vitamina A, 11.000.000 UI; vitamina D3, 4.000.000 UI; vitamina E, 55.000 UI; vitamina K3, 3g; vitamina B1, 2,3g; vitamina B2, 7g; ácido pantotênico, 12g; vitamina B6, 4g; vitamina B12, 25mg; ácido nicotínico, 60g; ácido fólico, 2g; biotina, 250mg; selênio, 300mg.
[4]Fornecido por quilograma de produto: cobre, 20g; ferro, 100g; iodo, 2g; manganês, 130g; zinco, 130g.
[5]RONOZYME® ProAct com 75.000 PROT/g (DSM Nutritional Products - Kaiseraugst, Suíça)
[6]RONOZYME® HiPhos GT com 20.000 FYT/g (DSM Nutritional Products - Kaiseraugst, Suíça)
[7]RONOZYME® HiStarch com 600 KNU/g (DSM Nutritional Products - Kaiseraugst, Suíça)

Para o preparo das dietas reduzidas, os níveis dietéticos de proteína bruta, lisina total, metionina+cisteína, metionina, treonina, valina, leucina e isoleucina foram reduzidos em diferentes graus por meio de menor inclusão de FS. A redução proposta correspondeu aos níveis de PB e AA disponibilizados pela matriz nutricional da protease quando incluída na dose de 15.000 PROT/kg. A protease utilizada neste estudo foi a RONOZYME® ProAct (DSM, Kaiseraugst, Suíça), produzida por fermentação submersa de *Bacillus licheniformis* contendo genes transcritos de *Nocardiopsis prasine*, com uma atividade mínima de 75.000 PROT/g de produto. Uma unidade de protease (PROT) é definida como a quantidade de enzima que libera 1 µmol de p-nitroanilina de 1 µM de substrato (Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilina) por minuto a pH 9,0 e 37°C. As análises de atividade enzimática (TABELA 2) foram medidas na Biopract GmbH, Berlim, Alemanha. A recuperação enzimática foi calculada como a porcentagem da atividade enzimática medida na dieta para a atividade enzimática esperada estimada a partir da quantidade e atividade mínima das enzimas adicionadas às dietas.

TABELA 2. NÍVEIS DE ATIVIDADE DE FITASE E PROTEASE RECUPERADOS* NAS AMOSTRAS DA DIETA.

| Tratameto | Fitase, FYT[1]/kg | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Dieta inicial | | Dieta crescimento | | Dieta final | |
| | Declarado | Analisado | Declarado | Analisado | Declarado | Analisado |
| Dieta basal | 1500 | 1176 | 1500 | 1690 | 1500 | 1932 |
| Dieta reduzida | 1500 | 2266 | 1500 | 2050 | 1500 | 2004 |
| Dieta basal + protease | 1500 | 2217 | 1500 | 1307 | 1500 | 1786 |
| Dieta reduzida + protease | 1500 | 2335 | 1500 | 2216 | 1500 | 1684 |
| | Protease, PROT[2]/kg | | | | | |
| | Dieta inicial | | Dieta crescimento | | Dieta final | |
| | Declarado | Analisado | Declarado | Declarado | Analisado | Declarado |
| Dieta basal | 0 | <LDD[3] | 0 | <LDD | 0 | <LDD |
| Dieta reduzida | 0 | <LDD | 0 | <LDD | 0 | <LDD |
| Dieta basal + protease | 15000 | 14310 | 15000 | 14320 | 15000 | 13250 |
| Dieta reduzida + protease | 15000 | 20640 | 15000 | 16825 | 15000 | 14450 |

**Análise de recuperação feita pela BioPract GmbH, Berlin, Germany*
*[1]FYT = unidades de fitase por kg de dieta.*
*[2]PROT = unidades de protease por kg de dieta.*
*[3]LDD = limite de detecção*

## 2.3 DESEMPENHO, RENDIMENTO DE CARCAÇA E RENDIMENTO DE CORTES

As aves foram pesadas por box nos dias 1, 21, 35 e 42 para determinar o peso corporal médio para cálculo do ganho de peso corporal (GP). O consumo de ração (CR) foi calculado pela pesagem da oferta de ração e sobras de ração nos dias 1, 21, 35 e 42. A taxa de conversão alimentar (CA) foi calculada como a divisão entre CR e GP. Aves mortas e removidas foram pesadas e as variáveis de desempenho foram ajustadas para seu peso.

Aos 42 dias, 24 aves por tratamento (n = 96) foram selecionadas aleatoriamente, devidamente identificadas e pesados no galpão experimental. Após 12 horas de jejum, os frangos foram sacrificados por deslocamento cervical. As carcaças foram depenadas, evisceradas, pesadas e cortadas, após o qual foram pesados os cortes do peito, perna (coxa e sobrecoxa) e gordura abdominal. O rendimento da carcaça foi calculado como a porcentagem do peso da carcaça em relação ao peso corporal, e o rendimento de cada corte foi calculado como peso do corte em relação ao peso da carcaça. O rendimento foi expresso como porcentagem, de acordo com o procedimento descrito por DAHLKE et al. (2001).

## 2.4 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA PROTEASE

A avaliação *in vitro* da RONOZYME® ProAct envolveu a incubação de FS, milho e a combinação destes ingredientes de acordo com as proporções estabelecidas pelas dietas formuladas em cada período na presença (15.000 PROT/kg; 200 ppm) ou ausência de protease. Esta avaliação foi baseada no método previamente descrito por SYMBAYA et al. (1996).

Para o ensaio *in vitro*, 2,25g de substrato (FS, milho ou sua combinação) foram pesados em tubos de centrifugação de 50 ml e incubados a 40ºC durante 4h com 12,75 g de solução alcalina (15% de matéria seca). Uma solução de hidróxido de sódio 0,5 M foi utilizada para ajustar a reação ao pH 6,5 ± 0,25. A reação foi realizada sem enzimas digestivas (pepsina ou pancreatina) a fim de se avaliar apenas o efeito da protease exógena nos ingredientes. A incubação foi conduzida sob mistura contínua em uma incubadora Combi-D24 (Fine PCR®, Gyeonggi-do, Coréia do Sul). Ao final da incubação, as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm durante 10 min, e os sobrenadantes foram coletados para análise posterior. Os resíduos insolúveis foram então lavados com 50 mL de água destilada e o conteúdo foi centrifugado sob as mesmas condições. O procedimento de lavagem foi repetido 5 vezes para assegurar que o material solúvel fosse completamente removido, após o qual o material insolúvel foi seco em

estufa a 45 ºC de um dia para o outro. Os resíduos insolúveis foram analisados quanto ao conteúdo de PB pelo método de combustão Dumas (AACC, 2009) em um analisador de nitrogênio (FP-628, Leco Corporation, St. Joseph, MI, EUA).

A proteína *in vitro* solúvel (%) foi calculada pela subtração da quantidade de proteína nos resíduos insolúveis remanescentes pela quantidade no substrato original, em relação à quantidade de proteína no substrato original, seguindo a fórmula:

$$\frac{Proteína\ bruta\ no\ subtrato - Proteína\ bruta\ no\ resíduo\ insolúvel}{Proteína\ bruta\ no\ subtrato}$$

## 2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados coletados foram testados quanto à normalidade dos resíduos pelo teste Shapiro-Wilk, e após uma distribuição normal ter sido detectada, os dados foram submetidos a uma ANOVA de duas vias incluindo os dois fatores principais e sua interação, utilizando o modelo linear do R® (R® - R Core Team, Viena, Áustria). Quando interações significativas foram observadas, as médias do desdobramento foram comparadas por teste de Tukey com 5% de probabilidade.

# 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 3.1 DESEMPENHO

Os dados de desempenho são apresentados na TABELA 3. Não foram observadas interações entre os níveis de PB e AA e a inclusão de protease em nenhum período avaliado. Um efeito principal dos níveis de PB e AA foi detectado ($P < 0,05$) para GP de 1 a 21 d e 22 a 35 d: os frangos alimentados com a dieta reduzida obtiveram menor GP menor em comparação com a dieta basal. Ao se analisar o período cumulativo (1 a 42 d), a dieta reduzida teve um impacto negativo sobre o desempenho de crescimento ao diminuir GP e aumentar o CA ($P < 0,01$).

TABELA 3. CONSUMO DE RAÇÃO (CR; g), GANHO DE PESO (GP; g), E CONVERSÃO ALIMENTAR (CA; g/g) DE FRANGOS DE CORTE ALIMENTADOS COM DIETAS COM NÍVEIS BASAIS OU REDUZIDOS DE PROTEÍNA BRUTA E AMINOÁCIDOS E SUPLEMENTADOS COM PROTEASE.

| Tipo de dieta | Protease (PROT[2]/kg) | 1 to 21 d | | | 22 to 35 d | | | 36 to 42 d | | | 1 to 42 d | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | CR | GP | CA | CR | GP | CA | CR | GP | CA | CR | GP | CA |
| Efeito de interação | | | | | | | | | | | | | |
| Basal | 0 | 1,215 | 864 | 1,407 | 2,313 | 1,436 | 1,611 | 1,063 | 565 | 1,884 | 4,541 | 2,807 | 1,617 |
| Reduzida[1] | | 1,213 | 844 | 1,437 | 2,286 | 1,411 | 1,621 | 1,081 | 566 | 1,954 | 4,557 | 2,769 | 1,645 |
| Basal | 15.000 | 1,239 | 868 | 1,428 | 2,327 | 1,462 | 1,591 | 1,096 | 584 | 1,863 | 4,625 | 2,867 | 1,613 |
| Reduzida | | 1,224 | 849 | 1,441 | 2,284 | 1,426 | 1,604 | 1,081 | 568 | 1,909 | 4,550 | 2,782 | 1,636 |
| EPM | | 10,45 | 7,76 | 0,015 | 19,21 | 13,28 | 0,014 | 15,85 | 14,61 | 0,040 | 36,37 | 22,48 | 0,001 |
| Efeito do tipo de dieta | | | | | | | | | | | | | |
| Basal | | 1,227 | 866 | 1,418 | 2,320 | 1450 | 1,601 | 1,072 | 575 | 1,874 | 4,583 | 2,837 | 1,615 |
| Reduzida | | 1,218 | 847 | 1,439 | 2,285 | 1418 | 1,612 | 1,088 | 567 | 1,931 | 4,553 | 2,775 | 1,641 |
| Efeito da protease | | | | | | | | | | | | | |
| | 0 | 1,214 | 854 | 1,423 | 2,300 | 1423 | 1,616 | 1,080 | 565 | 1,919 | 4,549 | 2,788 | 1,631 |
| | 15.000 | 1,232 | 859 | 1,435 | 2,305 | 1444 | 1,598 | 1,081 | 576 | 1,886 | 4,588 | 2,824 | 1,625 |
| P-valores | | | | | | | | | | | | | |
| Dieta | | 0,409 | 0,016 | 0,173 | 0,086 | 0,023 | 0,454 | 0,306 | 0,599 | 0,157 | 0,426 | 0,008 | 0,002 |
| Protease | | 0,094 | 0,526 | 0,406 | 0,769 | 0,127 | 0,200 | 0,936 | 0,475 | 0,410 | 0,287 | 0,109 | 0,409 |
| Interação | | 0,547 | 0,978 | 0,585 | 0,677 | 0,647 | 0,922 | 0,290 | 0,577 | 0,761 | 0,219 | 0,301 | 0,723 |

[1]Redução de proteína bruta, lisina total, metionina+cisteína, metionina, treonina, valina, leucina e isoleucina, conforme disponibilizados por 15000 PROT/kg de dieta.
[2]Unidades de protease.

O desempenho dos frangos de corte depende drasticamente da ingestão e absorção de proteínas e AA. Dietas com altos níveis de AA podem melhorar a eficiência alimentar, aumentando o GP e rendimento de carcaça por meio de uma síntese otimizada de proteína no músculo (ZHAI et al., 2013; JOHNSON et al., 2020). Por outro lado, um fornecimento inadequado de AA limitará o crescimento das aves (EVERAERT et al., 2009; BELLOIR et al., 2017), o que foi observado no estudo atual, uma vez que GP e CA foram prejudicados pela redução de PB e AA dietéticos, independentemente da suplementação com protease. O desempenho de crescimento de 36 a 42 d não foi afetado por nenhum tratamento, semelhante a ZHANG et al. (2020), que também não observaram nenhum efeito da redução de AA na CA de frangos de corte mais velhos (41 a 55 d). Como os autores sugerem, o fornecimento de AA tem um efeito menos impactante sobre o crescimento de aves mais velhas em comparação com mais novas.

Na literatura, a suplementação de protease está geralmente ligada a uma melhora na disponibilidade e digestibilidade de AA da dieta e, portanto, a um desempenho de crescimento aprimorado em frangos de corte de diferentes idades (BERTECHINI et al., 2009; MAIORKA et al., 2009; ANGEL et al., 2011; COWIESON & ROOS, 2014; COWIESON et al., 2019; ADERIBIGBE et al. 2020). Entretanto, neste estudo a suplementação de protease não teve efeito sobre as variáveis de desempenho de crescimento em nenhuma das fases avaliados. Outros estudos também relataram ausência de efeito positivo de protease exógena sobre o GP de frangos de corte, embora a CA tenha sido melhorada (GHAZI et al., 2002; FREITAS et al., 2011). ADERIBIGBE et al. (2020) testaram a mesma dose de 15.000 PROT/kg avaliada neste estudo e observaram aumento de GP e ganho para CA em frangos de corte com 21 anos de idade. Também foram descritos efeitos positivos da protease no desempenho de frangos de corte alimentados com dietas com PB e AA reduzidos (ABUDABOS, 2012; COWIESON et al., 2018; COWIESON et al., 2019).

Em concordância com nossos resultados, LAW et al. (2019) não observaram efeitos significativos da suplementação de protease a dietas de baixa proteína/energia no desempenho de frangos de corte na fase final. Os autores ressaltam que as discrepâncias entre os estudos com protease podem estar relacionadas ao tipo de protease utilizada, o que também foi mencionado previamente por ANGEL et al. (2011) e COWIESON et al. (2019). De acordo com estes estudos, o preparo de complexos enzimáticos no lugar do uso de proteases monocomponentes pode explicar a variabilidade de resultados relatados na literatura (ABUDABOS, 2012; BAREKATAIN et al., 2013; WALK & POERNAMA, 2018), uma vez que a atividade da protease pode ser dificultada pela presença de outras enzimas nestes complexos enzimáticos, a exemplo de fitases e várias carboidrases. O efeito oposto também pode ser verificado, quando a protease somente pode não ser tão eficaz quanto um composto enzimático (TORRES-PITARCH et al., 2018). No presente estudo, a dieta reduzida foi formulada utilizando uma matriz de AA adequada para a protease em particular. Embora a redução nos níveis de PB e AA tenha prejudicado o desempenho de crescimento, a suplementação de protease não restaurou a GP e CA.

## 3.2 RENDIMENTO DE CARCAÇA E CORTES

Os resultados do rendimento de carcaça e cortes são apresentados na TABELA 4. Não foi observada nenhuma interação entre os fatores para estas variáveis. Separadamente, dietas reduzidas resultaram em menor rendimento de peito (P < 0,001) e maior percentual de gordura abdominal (P < 0,05). A análise dos dados também sugeriu uma tendência (P = 0,07) para menor rendimento de carcaça com dietas reduzidas. Os tratamentos não exerceram efeito sobre o rendimento de coxa e sobrecoxa.

TABELA 4. RENDIMENTO DE CARCAÇA, PEITO, COXA COM SOBRECOXA E PORCENTAGEM DE GORDURA ABDOMINAL DE FRANGOS DE CORTE ALIMENTADOS COM DIETAS COM NÍVEIS BASAIS OU REDUZIDOS DE PROTEÍNA BRUTA E AMINOÁCIDOS E SUPLEMENTADOS COM PROTEASE.

| Tipo de dieta | Protease (PROT[2]/kg) | Rendimentos (%) | | | Gordura abdominal (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Carcaça | Peito | Coxa com sobrecoxa | |
| Efeito de interação | | | | | |
| Basal | 0 | 77,31 | 39,39 | 27,88 | 1,55 |
| Reduzida[1] | | 76,67 | 38,21 | 27,76 | 1,67 |
| Basal | 15000 | 77,48 | 40,36 | 27,64 | 1,41 |
| Reduzida | | 76,85 | 38,18 | 28,34 | 1,65 |
| EPM | | 0,35 | 0,45 | 0,25 | 0,06 |
| Efeito do tipo de dieta | | | | | |
| Basal | | 77,40 | 39,87 | 27,76 | 1,47 |
| Reduzida | | 76,76 | 38,19 | 28,07 | 1,66 |
| Efeito da protease | | | | | |
| | 0 | 76,99 | 38,81 | 27,82 | 1,61 |
| | 15000 | 77,17 | 39,26 | 28,08 | 1,53 |
| *P*-value | | | | | |
| Dieta | | 0,075 | <0,001 | 0,214 | 0,002 |
| Protease | | 0,629 | 0,305 | 0,453 | 0,172 |
| Interação | | 0,982 | 0,267 | 0,090 | 0,359 |

[1]Redução de proteína bruta, lisina total, metionina+cisteína, metionina, treonina, valina, leucina e isoleucina, conforme disponibilizados por 15000 PROT/kg de dieta.
[2]Unidades de protease.

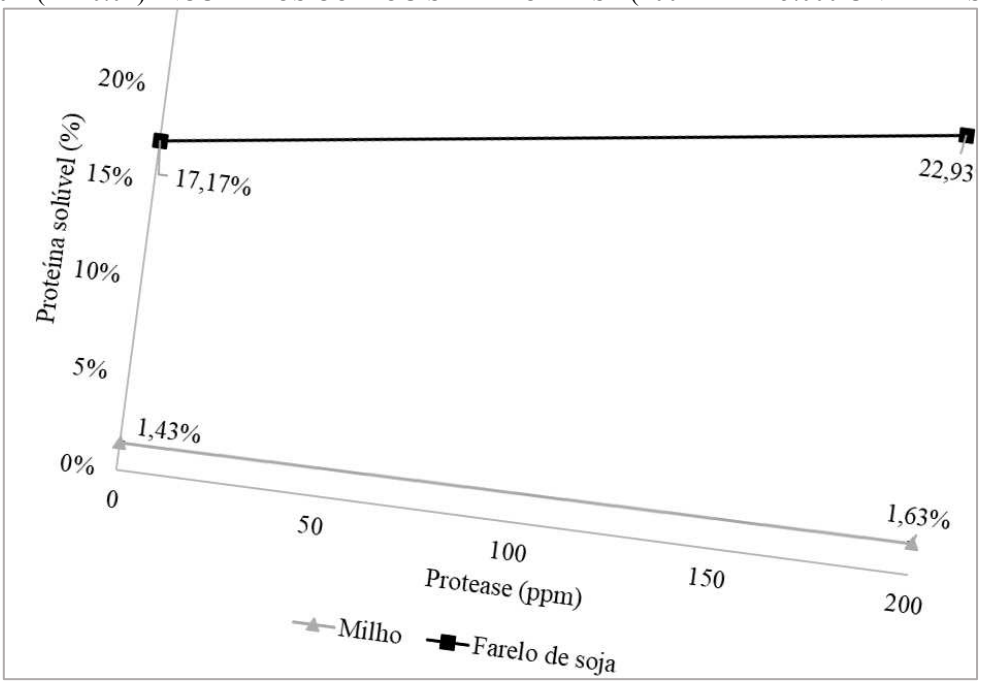
Tipicamente, o conteúdo dietético de PB e AA influencia o rendimento e composição da carcaça de frangos de corte. Como visto em trabalhos anteriores, o fornecimento de maiores quantidades de PB e AA aumenta o rendimento de carne magra e reduz a deposição de gordura (CORZO et al., 2010; NASR, 2011), em concordância com as observações deste estudo. A suplementação com AA sintético precursores de proteína também tem efeitos positivos no rendimento e composição da carcaça, como por exemplo L-Lisina (MENDES et al., 2014) e L-Leucina (ERWAN et al., 2011). O rendimento de carcaça e carne de frangos de corte está intimamente relacionado ao desempenho de crescimento, e assim como as variáveis de GP e CA foram prejudicadas neste estudo com a oferta de dietas reduzidas, também houve queda no rendimento de carcaça e peito. Notavelmente, altos níveis dietéticos de PB e AA também podem acarretar efeitos negativos sobre o rendimento de carcaça, como mostrado por EBLING et al. (2013) no qual frangos alimentados com altas concentrações de AA até 21 dias tinham carcaças menores do que aqueles alimentados com concentrações mais baixas de AA. Como salientado pelos autores, qualquer desequilíbrio na suplementação de AA - deficiência ou excesso - levará a perdas de energia e limitará o crescimento de tecido magro; no caso de um excesso de AA, a energia será obtida via deaminação deste excesso, e a cadeia de carbono será armazenada como gordura, aumentando a concentração de gordura na carcaça.

A inclusão ou ausência de protease exógena não exerceram efeitos sobre o rendimento da carcaça ou cortes nem sobre percentual de gordura abdominal. Da mesma forma, MAHMOOD et al. (2017) relataram a falta de efeito de 2 proteases diferentes (ácida e neutra) no rendimento de carcaça de frangos de corte de 35 dias; SANTOS et al. (2017) avaliaram a interação entre xilanase, fitase e protease em dietas para frangos de corte, e embora xilanase e fitase tenham melhorado o rendimento de carcaça e peito de frangos de corte de 42 dias, a protease não teve influência nas variáveis de carcaça. Como a protease pode aumentar a digestibilidade ileal de AA (COWIESON & ROOS, 2016), eram esperados resultados positivos para as variáveis de carcaça avaliadas, assim como para as variáveis de desempenho; novamente, embora a redução de PB e AA da dieta piorou o rendimento da carcaça, peito e aumento de gordura - da mesma forma que GP e CA - a protease exógena não restaurou essas variáveis.

## 3.3 ENSAIO *IN VITRO*

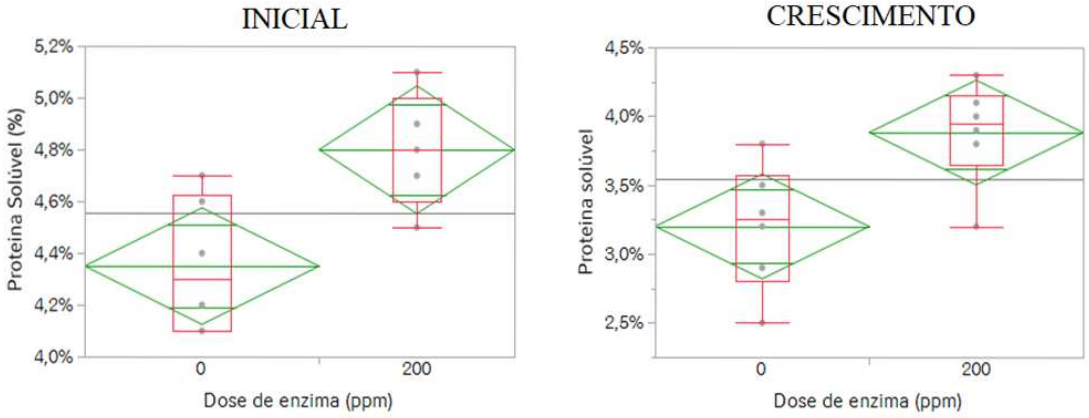
O efeito da protease sobre a solubilidade da proteína *in vitro* do milho e do FS é mostrado na FIGURA 1. A incubação com 15000 PROT/kg de protease aumentou com sucesso o conteúdo de proteína solúvel em ambos os ingredientes. A solubilidade proteica é um importante índice de qualidade da soja processada, uma vez que a soja sabidamente apresenta fatores antinutrientes em sua composição que podem inibir a atividade de proteases endógenas, embora a maioria desses fatores sejam termolábeis e desativados durante o processamento do FS (CAPRITA et al., 2013). Complementarmente, a solubilidade proteica do FS pode ser melhorada por tratamento com protease, como demonstrado anteriormente por CAINE et al. (1998) e GHAZI et al. (2002), e também pelos resultados deste estudo. Embora o milho não seja considerado uma fonte de proteína, contendo de 8 a 9% de proteína no endosperma e gérmen (BURGE & DUENSING, 1989) seu conteúdo proteico pode ser relevante devido a sua grande inclusão em dietas para aves; como observado neste estudo, o tratamento com protease teve efeitos positivos sobre a solubilidade da proteína do milho.

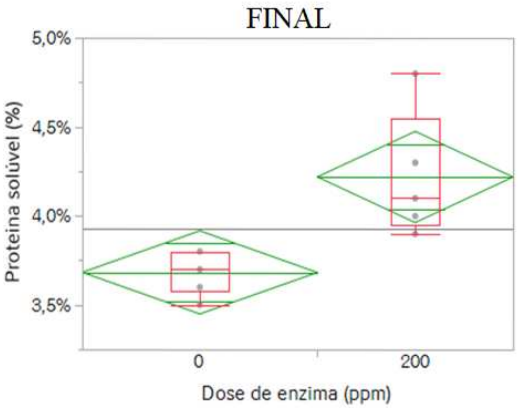
FIGURA 1. CONTEÚDO DE PROTEÍNA SOLÚVEL *IN VITRO* DO MILHO ($P < 0.001$) E FARELO DE SOJA ($P = 0.01$) INCUBADOS COM OU SEM PROTEASE (200 PPM – 15.000 UNIDADES/kg).



A solubilidade da proteína *in vitro* das dietas iniciais, de crescimento e final são mostradas na FIGURA 2. Não foi detectada nenhuma interação entre os fatores, assim como a solubilidade proteica não foi afetada pelo tipo de dieta (basal ou reduzida). A incubação com protease aumentou o conteúdo de proteína solúvel na dieta, independentemente da fase (P < 0,01). As diferentes inclusões de milho ou FS - ou diferentes conteúdos de PB e AA na dieta - não afetaram a solubilidade da proteína.

FIGURA 2. CONTEÚDO DE PROTEÍNA SOLÚVEL *IN VITRO* DE DIETAS INICIAIS, CRESCIMENTO E FINAL DE FRANGOS DE CORTE COM DIFERENTES NÍVEIS DE PROTEÍNA BRUTA E AMINOÁCIDOS, INCUBADAS COM OU SEM PROTEASE (200 PPM – 15.000 PROT/kg).




| *P*- valor | Inicial | Crescimento | Final |
|---|---|---|---|
| Dieta | 0.362 | 0.155 | 0.651 |
| Protease | 0.013 | 0.017 | 0.006 |
| Interação | 0.256 | 0.294 | 0.762 |
| EPM | 0.368 | 0.223 | 0.213 |

GHAZI et al. (2002) compararam duas proteases diferentes (isoladas das espécies *Bacillus* ou *Aspergillus*) e relataram efeitos positivos do pré-tratamento com ambas as proteases em dietas contendo diferentes quantidades de FS. Curiosamente, os autores relataram que a protease de *Bacillus* não afetou o desempenho *in vivo* de frangos de corte. Da mesma forma que o estudo atual, o desempenho *in vivo* não foi influenciado pela suplementação com protease, apesar de que a solubilidade da proteína dietética tenha sido aumentada no teste *in vitro*. TORRES-PITARCH et al. (2018) demonstraram que um

complexo enzimático de fitase, xilanase + β-glucanase, e protease aumentou a digestibilidade de PB e matéria seca *in vitro*, mas falhou em melhorar o desempenho *in vivo* de suínos na fase crescimento-final. Além disso, os autores relataram que a protease por si só não melhorou a digestibilidade *in vitro* ou o desempenho *in vivo*. O estudo sugere que fatores tais como a microbiota intestinal e absorção de outros nutrientes - não contabilizados pela simulação de digestão *in vitro* - podem afetar a suplementação enzimática *in vivo*. Finalmente, a inconsistência entre as avaliações de proteases exógenas - tanto *in vitro* quanto *in vivo* - estão amplamente associadas a diferenças nos ingredientes da ração; metodologias distintas; as características da protease *per se*; e o uso de complexos enzimáticos versus proteases monocomponentes.

## 4 CONCLUSÃO

As dietas à base de milho e farelo de soja com menor teor de PB e AA tem efeitos negativos sobre o GP e CA de frangos de corte de 1 a 42 dias de idade. Aos 42 dias, o rendimento de carcaça e de peito é reduzido, e a porcentagem de gordura abdominal aumentada com dietas com baixos níveis de PB e AA. A inclusão de 15000 PROT/kg de uma protease exógena não tem efeito sobre o desempenho e variáveis de carcaça, mas melhora a solubilidade da proteína dietética *in vitro*.

## 5 REFERÊNCIAS

AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS. **AACC Approved Methods of Analysis**, 11th ed. Cereals & Grains Association, St. Paul, MN, USA. 2009.

ABUDABOS, A. M. Effect of enzyme supplementation to normal and low density broiler diets based on corn-soy- bean meal. **Asian J. Anim. Vet. Adv**. 7:139–148. 2012.

ADERIBIGBE, A. et al. Growth performance and amino acid digestibility responses of broiler chickens fed diets containing purified soybean trypsin inhibitor and supplemented with a monocomponent protease. **Poultry Science** 99:5007-5017. 2020.

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

BAKER, R. O. et al. Supplementation of baby pig diets with enzymes. **J. Anim. Sci.** 15: 1245. 1956.

BAREKATAIN, M. R. et al. Interaction between protease and xylanase in broiler chicken diets containing sorghum distillers dried grains with solubles. **Anim. Feed Sci. Technol**. 182:71–81. 2013.

BELLOIR, P. et al. Reducing the CP content in broiler feeds: impact on animal performance, meat quality and nitrogen utilization. **Animal Sience**11:1881-1889. 2017.

BERTECHINI, A. G. et al. Use of a protease to enhance the utilization of soybean meal amino acids by broilers. **Poultry Science** 88(Suppl. 1):69. (Abstr.). 2009.

BURGE, R. M.; DUENSING, W. J. Processing and dietary fiber ingredient applications of corn bran. **Cereal Foods World** 34:535-538. 1989.

CAINE, W. R. et al. Effect of protease treatment of soybean meal on content of total soluble matter and crude protein and level of soybean trypsin inhibitors. **Anim. Feed Sci. Tech.** 71:177-183. 1998.

CAPRITA, R. et al. Protein solubility as quality index of processed soybean. **Anim. Sci. Biotech.** 43:375-378. 2010.

CLARKE, E.; WISEMAN, J. Effects of variability in trypsin inhibitor content of soya bean meals on true and apparent ileal digestibility of amino acids and pancreas size in broiler chicks. **Anim. Feed Sci. Tech.** 121:125- 138. 2005.

CORZO, A. et al. Responses of Cobb × Cobb 500 broilers to dietary amino acid density regimens. **J. Appl. Poult. Res**. 19:227–236. 2010.

COWIESON, A. J.; ROSS, 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. **J. Appl. Poult. Nutr.** 2:1-8. 2014.

COWIESON, A. J.; ROSS, F. F. Toward optimal value creation through the application of exogenous mono-component protease in the diets of non-ruminants. **Anim. Feed Sci. Tech**. 221:331-340. 2016.

COWIESON, A. J. et al. A mono-component microbial protease improves performance, net energy, and digestibility of amino acids and starch, and upregulates jejunal expression

of genes responsible for peptide transport in broilers fed corn/wheat-based diets supplemented with xylanase and phytase. **Poultry Science** 98:1321-1332. 2018.

COWIESON, A. J. et al. Efficacy of a mono-component exogenous protease in the presence of a high concentration of exogenous phytase on growth performance of broiler chickens. **J. Appl. Poult. Res.** 28:638-646. 2019.

DEAN, D. W.; BIDNER, T. D.; SOUTHERN, L. L. Glycine supplementation to low protein, amino acid-supplemented diets supports optimal performance of broiler chicks. **Poultry Science** 85:288–296. 2006.

DOZIER, W. A.; HESS, J. B. Soybean Meal Quality and Analytical Techniques. In: **El-Shemy, H.** (Ed.), Soybean and Nutrition, IntechOpen, London, UK. 2011.

EBLING, P. D. et al. Effect of different dietary concentrations of amino acids on the performance of two different broiler strains. **Braz. J. Poult. Sci.** 15:339-346. 2013.

ERWAN, R. et al. Effects of levels of l-leucine supplementation with sub-optimal protein in the diet of grower-finisher broiler chickens on carcass composition and sensory characteristics. **Asian-Aust. J. Anim. Sci**. 24:650-654. 2011.

EVERAERT, N. et al. The effect of the protein level in a pre-starter diet on the post-hatch performance and activation of ribosomal protein S6 kinase in muscle of neonatal broilers. **Brit. J. Nutri**. 103:206-211. 2009.

FREITAS, D. M. et al. Performance and nutrient utilization of broilers fed diets supplemented with a novel mono component protease. **J. Appl. Poult. Res.** 20:347–352. 2011.

GHAZI, S. et al. The potential for the improvement in the nutritive value of soya-bean meal by different proteases in broiler chicks and broiler cockerels. **Br. Poult. Sci.** 43:70–77. 2002.

ISAKSEN, M. F.; COWIESON, A. J.; KRAGH, K. M. Starch- and protein-degrading enzymes: biochemistry, enzymology and charachteristics relevant to animal feed use. In: Bedford, M.R., Partridge, G.G. (Eds.), **Enzymes in Farm Animal Nutrition**., 2nd ed. CAB International, Cambridge, MA, USA. 2010.

JOHNSON, C. A. et al. Increasing amino acid density improves growth performance and processing yield in Cobb 700 X MV broilers. **J. Appl. Poult. Res.** 29:465-478. 2020.

LAW, F. L. et al. Effects of protease supplementation of low protein and/or energy diets on growth performance and blood parameters in broiler chickens under heat stress condition**. Ital. J. Anim. Sci.** 18:679-689. 2019.

LEWIS, C. J. et al. Enzyme supplementation of baby pig diets. **Agr. Food Chem**. 3:1047-1050. 1955.

MAIORKA, A. et al. Broiler chicken performance and ileal digestibility is improved by a protease used in corn/soybean meal/meat bone meal diet. **Poultry Science** 88(Suppl. 1):33. (Abstr.). 2009.

MAHMOOD, T. et al. Effect of different exogenous proteases on growth performance, nutrient digestibility, and carcass response in broiler chickens fed poultry by-product meal-based diets. **Livest. Sci.** 200:71-75. 2017.

MENDES, A. S. et al. Effects of dietary lysine on broiler performance and carcass yield – meta-analysis. **Braz. J. Poult. Sci.** 16:425-430. 2014.

NAHM, K. H. Efficient phosphorus utilization in poultry feeding to lessen the environmental impact of excreta. **World Poult. Sci. J.** 63:625-654. 2007.

NASR, J. Effect of different levels of amino acids on carcass composition and yield in broilers. **Anim. Prod. Sci.** 51:1123–1126. 2011.

SANTOS, T. T. et al. Xylanase, protease and superdosing phytase interactions in broiler performance, carcass yield and digesta transit time. **Anim. Nutr.** 3:121-126. 2017.

SIMBAYA, J. et al. The effects of protease and carbohydrase supplementation on the nutritive value of canola meal for poultry: *In vitro* and *in vivo* studies. **Anim. Feed Sci. Tech.** 61:219-234. 1996.

TORRES-PITARCH, A. et al. Effect of phytase, carbohydrase, and protease addition to a wheat distillers dried grains with solubles and rapeseed based diet on *in vitro* ileal digestibility, growth, and bone mineral density of grower-finisher pigs. **Livest. Sci.** 216:94-99. 2018.

WALK, C. L.; POERNAMA, F. Evaluation of phytase, xylanase, and protease in reduced nutrient diets fed to broilers. **J. Appl. Poult. Res.** 28:85-93. 2018.

ZHAI, W. et al. Effects of dietary amino acid density regimens on growth performance and meat yield of Cobb × Cobb 700 broilers. **J. Appl. Poult. Res.** 22:447-460. 2013.

ZHANG, B. et al. Effects of broiler genetic strain and dietary amino acid reduction on (part I) growth performance and internal organ development. **Poultry Science** 99:3266-3279. 2020.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O farelo de soja, mesmo sendo reconhecido mundialmente como a principal fonte de proteína bruta na alimentação de frangos de corte, muitas vezes ainda é tratado como um "sub-produto da indústria de óleo de soja. O processo industrial ainda é o mesmo de décadas passadas. Somando a esta característica há também a variabilidade natural do grão de soja, com isso, o controle de qualidade e formulação de ração têm uma grande dificuldade para ajustarem as formulações das rações com base na variação da qualidade deste tão importante ingrediente. Outro fator impactante, é que não são monitorados rotineiramente os fatores antinutrientes presentes no farelo de soja, aumentando os riscos de problemas ou variações não explicadas do desempenho zootécnico.

As enzimas nutricionais possuem um papel fundamental nas estratégicas nutricionais para frango de corte. Não somente são importantes para a melhoria de digestibilidade, mas também são uma ferramenta para redução de custo e melhoria dos indicadores ambientais.

A fitase foi a primeira enzima exógena utilizada em larga escala pela indústria de nutrição animal. Seus benefícios como "liberadora" de fósforo estão bem descritos na literatura. A nova fronteira para esta enzima é descobrir até qual dose podemos ir e quais resultados são esperados. Sabemos que para cada produto comercial há uma resposta técnica diferente com doses diferentes, e essas estratégias que deverão ser pesquisado e trabalhado no futuro, sendo que este foi um dos objetivos deste trabalho, é conhecer a resposta em diferentes qualidades ou características de ingredientes. A resposta é a mesma quando utilizamos diferentes farelos de soja? Não e é essa foi uma das conclusões deste trabalho pois conforme varia a proteína bruta do farelo de soja, muda a sua composição química, com mais ou menos casca, mais ou menos fitato, alterando também a sua inclusão na formulação.

Conhecendo a resposta da fitase sobre uma matéria prima, no caso deste trabalho, do farelo de soja, podemos estimar uma resposta da enzima por fase de produção. Pelos níveis maiores de proteína bruta nas fases iniciais, temos uma inclusão maior de farelo de soja nestas fases comparando as fases de crescimento e final, consequentemente teremos uma maior participação do fitato deste ingrediente naquelas fases. Trabalhos futuros

deverão explorar a dinâmica de inclusões diferentes de fitase nas diferentes fases de produção.

A protease tem um papel importante para a nutrição animal, mas a sua utilização é mais recente em rações de frango de corte. Muitos nutricionistas ainda possuem algum tipo de restrição em relação a utilização desta enzima pois acreditam que ao utilizar fitase ou mesmo carboidrases nas rações, não há espaço para a atuação da protease. Recentemente, foram publicados muitos trabalhos avaliando os efeitos de proteases monocomponente em rações que continham fitase (em doses crescentes ou não) e carboidrases, e de forma geral o resultado foi positivo.

Para que se tenha sucesso na utilização de protease, deve ser bem construída a matriz nutricional, baseada em trabalhos de digestibilidade e que consigam representar bem os variados tipos de formulação. Neste trabalho não conseguimos verificar diferenças estatísticas no desempenho e rendimento de carcaça com a utilização da protease. Por outro lado, o custo das rações é reduzido, não ocorrendo redução nos indicadores técnicos, é um objetivo buscado pela indústria ao utilizar esta tecnologia.

A adoção de novas tecnologias e conceitos em nutrição animal é fundamental para que possamos acompanhar o desenvolvimento genético dos animais. Mesmo em produtos já consolidados como as enzimas, temos que buscar novas formas de aplicação e conhecer melhor as estratégias hoje utilizadas para que a atividade continue sustentável, tanto do ponto de vista econômico quanto social e ambiental.