

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

**ENZIMAS EXÓGENAS EM DIETAS PARA FRANGOS DE
CORTE**

Leilane Rocha Barros Dourado
Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL
2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

ENZIMAS EXÓGENAS EM DIETAS PARA FRANGOS DE CORTE

Leilane Rocha Barros Dourado

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Nilva Kazue Sakomura

Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias
do Campus de Jaboticabal, Unesp,
como parte das exigências para a
obtenção do título de Doutor em
Zootecnia.

Jaboticabal – São Paulo – Brasil
Fevereiro – 2008

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Leilane Rocha Barros Dourado - filha de Lenisse Helena Rocha Barros e Antônio de Pádua Pereira Dourado, nasceu em Brasília, DF, no dia 16 de Abril de 1980. Em março de 1998 ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Piauí, em Teresina-PI, onde foi bolsista de iniciação científica sob orientação do professor Dr. João Batista Lopes e no ano de 2003 graduou-se no referido curso. Em março de 2003, ingressou no curso de mestrado em Zootecnia na Universidade Federal da Paraíba, na cidade de Areia – PB, sob orientação do professor Dr. Fernando Guilherme Perazzo Costa, defendendo sua dissertação em Dezembro de 2004. Em março de 2005, ingressou no curso de Doutorado da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, sob orientação da professora Dr^a Nilva Kazue Sakomura, defendendo esta tese em fevereiro de 2008.

APRENDER

Depois de algum tempo você aprende a diferença, a sutil diferença entre dar a mão e acorrentar a alma. E começa a aceitar suas derrotas com a cabeça erguida e olhos adiante. E aprende a construir todas as suas estradas no hoje, porque o terreno do amanhã é incerto demais para os seus planos. Descobre que se levam anos para se construir confiança e apenas segundos para destruí-la.

Aprende que verdadeiras amizades continuam a crescer mesmo a longas distâncias.

Aprende que as circunstâncias e os ambientes têm influência sobre nós, mas nós somos responsáveis por nós mesmos.

Aprende que não importa aonde já chegou, mas onde está indo.

Aprende que heróis são pessoas que fizeram o que era necessário fazer, enfrentando as conseqüências.

Aprende que maturidade tem mais a ver com os tipos de experiência que se teve e o que você aprendeu com elas do que com quantos aniversários você celebrou.

Aprende que com a mesma severidade com que julga você será em algum momento condenado.

Aprende que o tempo não é algo que possa voltar para trás. Portanto, plante seu jardim e decore sua alma, ao invés de esperar que alguém lhe traga flores. E você aprende que realmente pode suportar... Que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais. E que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida.

“Shakespeare”

DEDICATÓRIA

À professora Nilva Kazue Sakomura, por acreditar em meu potencial, me incentivando e ajudando nos momentos em que precisei. Por compartilhar seus conhecimentos e oferecer oportunidades, que às vezes mais parecem sacrifícios, mas que no fundo só nos fazem crescer. Com ela aprendi a ser mais paciente e principalmente a respeitar as diferenças de opiniões e a olhar o lado bom das pessoas, pois poucos sabem que atrás da capa de “durona” existe uma mulher sensível que ajuda direta ou indiretamente seus orientados, e que se preocupa com eles de maneira especial, porém é preciso conhecê-la bem para poder entendê-la.

OFERECIMENTO

A todos os meus familiares, em especial minha avó, Delite Lobato, minha mãe, Lenisse Helena, e a minha madrinha Delitinha, por me incentivarem a estudar desde pequena, pelo esforço e dedicação para financiar meus estudos, pela educação, amor, carinho que sempre me proporcionaram.

A Daniel, pelo amor incondicional que tem demonstrado e pela paciência, carinho, amizade e sacrifícios que faz para me ajudar e estar ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo que faz na minha vida e principalmente por colocar em meu caminho pessoas maravilhosas e especiais, que me ensinaram muito sobre a vida e mostraram sempre os melhores caminhos a seguir.

A professora Nilva Kazue Sakomura, por ter confiado em mim, desde o momento em que participou da minha banca de mestrado, mesmo sem me conhecer direito. Pelos esforços que fez, para que os experimentos fossem realizados da melhor maneira possível. Por me proporcionar oportunidades que jamais imaginei ter e, principalmente, pelo carinho e respeito que sempre me tratou. Obrigada por tudo professora!

A FCAV-UNESP e ao programa de Pós-graduação em Zootecnia pela oportunidade de realização do curso.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

À Danisco Animal Nutrition pelo financiamento dos experimentos.

À granja Planalto pela doação dos galos.

À Albino da Diacel pelo fornecimento do celite em todos os experimentos.

À Nutron pelo fornecimento dos microminerais, vitamina e coccidiostáticos.

Aos professores, Renato Luis Furlan, Elisabeth Gonzales, Maria Cristina Thomaz e Vera Maria Barbosa de Moraes pelas contribuições dadas no exame de qualificação e à Alice Eiko Murakami, Nilce Maria Queiroz, Euclides Braga Malheiros e Aulus Cavalieri Carciofi pelas contribuições dadas na defesa de tese. Vocês foram muito importante para que esse trabalho fosse melhor explicado e entendido. Também a todos os amigos e colegas que leram e contribuíram para melhorar essa tese (Nei, Juliana, Daphinne e Aderbal).

Aos funcionários do Setor de Avicultura Robson, Vicente, Izildo e João, obrigada por toda ajuda, compreensão, amizade e apoio, vocês são verdadeiros heróis para mim.

A Nei André por me acompanhar em todos os experimentos e me ensinar várias coisas na qual eu ainda não tinha experiência e também pelo carinho e respeito que sempre teve. Aos irmãos de orientação, Simara, Ellen, César, Daphinne, Nei, Sandra, Jefferson, Íris e Mel, não sei o que seria de mim e dos

experimentos sem vocês. Obrigada pela contribuição nos experimentos e pelos momentos de descontração e diversão que tivemos. Vou ter muitas saudades de vocês.

Aos orientados de iniciação científica e estagiários que passaram pelo aviário, Dito, Íris, Mel, Kakareco, Perna, Cravo, Stink, Ligia, Ricardo, Samuel, Renato, Juliana de Minas, Randi, Ana Luisa, Juliana, Gustavo, Poliana, Vitor, Soslaio, Suzana, Maira e outros que não lembro o nome agora. Obrigada pela grande contribuição que deram para que os experimentos se realizassem e paciência que tiveram comigo.

A Ana Paula, Sr. Orlando e Magali do LANA, muito obrigada pela ajuda, ensinamentos, confiança e disponibilidade dos equipamentos do laboratório, para determinação da energia e amido das minhas amostras.

Aos orientados da professora Jane, Rose, Josemir e Viviane que me auxiliaram e me ensinaram bastante sobre metodologias, principalmente pelo auxílio nos materiais para determinação do amido.

A Sandra, Sr. Osvaldo e Elinho da fábrica de ração, pela paciência e ajudar na fábrica de ração.

A Gilberto da Embrapa de São Carlos por me socorrer nas análises de energia e minerais, quando não era possível fazer no LANA. Ao Gabriel por me socorrer nas análises finais após a qualificação.

À Fátima, funcionária da tecnologia, pessoa sensível e amiga que fiz durante a disciplina de Técnicas de purificação de biomoléculas.

Aos funcionários do departamento de Zootecnia em especial ao Fieno, Adriana, Renata, Cássia e Dona Maria, pela ajuda e amizade.

Às funcionárias da Pós-graduação, pela paciência e compreensão com meus documentos. Também aos Funcionários da FUNEP pela paciência e prestatividade a minhas solicitações.

A Aderbal, meu anjo quando cheguei em Jaboticabal. Me ajudou muito em tudo. Aprendi e sorri muito com ele. Obrigada por tudo meu amigo.

A Nilce Maria, que me abraçou como se fosse uma filha ou melhor irmã, me estimulando e incentivando muito, e principalmente me contagiando com seu alto astral. Te admiro muito!

As grandes amigas que fiz aqui, Juliana, Simara e Daphinne, cada uma com sua particularidade, mas todas grandiosas. Tiveram papel essencial na minha vida em Jaboticabal, me ajudaram e me socorreram em todos os momentos que precisei. Foram companheiras nas alegrias, tristezas, expectativas, farras, empréstimos, nas viagens, em casa, nas conversas e conselhos, e até mesmo nas diferenças, pois com tudo isso, aprendemos muito juntas. Amo demais vocês, não tem como expressar a imensa falta que sentirei de vocês e de tudo que passamos juntas.

Aos companheiros do “Temático Fibras” (prof^a Nilva, César, Ellen, prof^a Jane, Rose, prof^a Cristina, Leo, Pedro, prof. João Batista, Laurindo, Thiago, prof^a Elma, prof. Matheus e prof. Pablo). Obrigada por tudo, foi um ano de muito aprendizado com vocês. Aos companheiros do “Temático Aminoácidos” (Melina e Jefferson), vocês não imaginam como admiro vocês, obrigada pelo aprendizado, convivência e principalmente pela paciência que tiveram comigo.

A meu irmãozinho Leo, desde o mestrado, que sempre me incentiva a crescer e dá conselhos maravilhosos, desde o momento em que tentamos o doutorado aqui em Jaboticabal. Obrigada, amigo, pela amizade e carinho que espero sempre ter.

Aos amigos dos almoços na casa Azul e das festanças nas Repúblicas dos colegas, sem esses momentos e amizades, teria sido difícil conseguir continuar.

Aos amigos especiais da UNESP e UFPB, Aluska Daniele, Marcos, Leo, Cleujosi, Aderbal, Pedro, Maria Fernanda, Expedita, Rose, Josemir, enfim todos os amigos que participaram deste trabalho e de minha vida neste período. Aos amigos da avicultura UNESP, pelas viagens até Apinco, reuniões de estudos e amizade.

A todos os profissionais que contribuíram para minha formação antes e quando estive aqui, em especial ao professor João Batista Lopes (UFPI) e Ferenando Guilherme Perazzo Costa (UFPB) e Nilva Kazue Sakomura (UNESP).

A toda a minha família, em especial minha Mãe, tia Delitinha e minha avó, que sempre me apoiaram em todas as minhas decisões e me guiaram pelos melhores caminhos. Obrigada pela confiança, orações e pelo amor que sempre tiveram. Obrigada também ao meu pai, por permitir-se participar da minha vida assim que comecei o doutorado.

A Daniel, amor que encontrei aqui, e que pretendo ter pelo resto da minha vida. Te amo muito e obrigada por tudo!

Aos todos os funcionários e professores da FCAV, colegas e amigos que contribuíram para conclusão de mais uma etapa importante na minha vida.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	iii
SUMMARY	iv
CAPÍTULO 1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	1
1. Importância do Milho e da Soja na Alimentação de Aves	1
2. Determinação da Energia dos Alimentos para Aves.....	5
3. Enzimas para melhorar o aproveitamento dos ingredientes.....	6
4. Referências	17
CAPÍTULO 2. ENERGIA METABOLIZÁVEL DO MILHO E FARELO DE SOJA COM ADIÇÃO DE ENZIMAS EXÓGENAS	24
RESUMO.....	24
SUMMARY	25
Introdução.....	26
Material e Métodos	27
Resultados.....	29
Discussão	31
Conclusões.....	35
Referências	35
CAPÍTULO 3. COMPLEXO ENZIMÁTICO EM DIETAS COM REDUÇÃO NA ENERGIA METABOLIZÁVEL PARA FRANGOS DE CORTE.....	39
RESUMO.....	39
SUMMARY	40
Introdução.....	41
Material e Métodos	42
Resultados.....	47
Discussão	51
Conclusões.....	54
Referências	54

CAPÍTULO 4. COMPLEXO ENZIMÁTICO EM DIETAS PARA FRANGOS DE CORTE	
.....	57
RESUMO.....	57
SUMMARY	58
Introdução.....	59
Material e Métodos	60
Resultados.....	67
Discussão	70
Conclusões.....	75
Referências	75
CAPÍTULO 5 - IMPLICAÇÕES	80

ENZIMAS EXÓGENAS EM DIETAS PARA FRANGOS DE CORTE

RESUMO - Foram conduzidos quatro ensaios para avaliar o uso de enzimas exógenas para frangos de corte. No primeiro ensaio foi avaliada a energia metabolizável verdadeira (EMV) do milho e do farelo de soja com a adição ou não de complexo enzimático xilanase, amilase, protease (XAP), de xilanase e de fitase, utilizando o método de alimentação precisa com galos. Foi verificada melhoria de 2,3% na EMV do milho com adição de fitase. No segundo ensaio foi avaliada a energia metabolizável aparente (EMA) do milho com a adição ou não de amilase, xilanase, fitase, complexo XAP, combinação de XAP e fitase e com adição de complexo xilanase/pectinase/ β -glucanase (XPBG), utilizando o método de coleta total (pintos). O milho foi suplementado com macro e microminerais. A adição das enzimas promoveu melhoria na EMA do milho entre 1,26 a 2,11%, exceto com o complexo XPBG. No terceiro ensaio foi avaliado o efeito do tipo de milho (seco no campo e artificialmente) e a eficiência de utilização de XAP em dietas com redução de 125kcal na EMA, comparada a dietas formuladas para atender as exigências das aves, sobre a digestibilidade ileal e desempenho de frangos. A adição de enzimas não promoveu respostas sobre o desempenho, entretanto, melhorou a digestibilidade de alguns nutrientes e a energia digestível das dietas. As aves alimentadas com dietas contendo milho seco artificialmente tiveram melhor ganho de peso. No quarto ensaio foi avaliado o efeito do tipo de milho (seco no campo e artificialmente) e de cinco dietas (um controle positivo - sem redução nutriente (CP), dois controles negativo - formulados com reduções nos valores de energia metabolizável da dieta através de predições para a EMA do milho (CN1 e CN2) e duas dietas com suplementação de 250g/ton e 500g/ton, do complexo enzimático (XAP) sobre os respectivos controles negativos). Neste estudo, a adição das enzimas restabeleceu a conversão alimentar das aves, na fase inicial. Não houve efeito da adição das enzimas sobre a digestibilidade dos nutrientes e desempenho das aves, no período total.

ENZYMES ADDITION IN BROILERS DIETS

SUMMARY- Four trials were conducted to evaluate enzymes use for broilers. In the first trial the true metabolizable energy (TME) of corn and soybean meal was evaluated with or without addition of enzymatic blend (xylanase, amylase, protease - XAP), of xylanase and of fitase, using the forced feeding method with roosters. The improvement of 2.3% was observed in corn TME with fitase addition. In the second trial the apparent metabolizable energy (AME) of corn (supplied with macro and micro minerals) with or without enzyme addition using total collection technique. The enzymes were: amylase; xylanase; phytase; XAP; XAP and phytase combination; xylanase/pectinase/ β -glucanase (XPBG) blend. The enzymes addition provided increase on corn AME between 1.26% to 1.66%, except with XPBG addition. In the third trial, was evaluated the effect of the corn type (field dried and oven dried) and the efficiency of use of XAP in diets with reduction of 125kcal in EMA (NC), compared to diets formulated to assist the birds requirements (PC), under nutrient digestibility and performance of broilers. The effect of enzyme addition and corn type in digestibility coefficient of minerals was observed. The birds fed oven dried corn showed better digestibility results in all evaluated variables. In conclusion, the nutrients digestibility showed the positive effect with enzyme addition on NC. However no improvement on performance was observed. In the fourth trial, was evaluated the effect of the corn type (field dried and oven dried) and five diets: one Positive control- without nutrient reduction (PC), two Negative controls – formulated with two metabolizable energy of corns (NC1 and NC2) and two levels of xylanase, amylase and protease blend supplementations on the NC1 (250g/t) and NC2 (500g/t) respectively. The reduction of nutrients in the NC diets promoted decrease in body weight gain (BWG), but the enzyme supplementation on these diets recovered the BWG of birds from 1 to 21 days. However, no effect of enzyme addition was observed from 1 to 42 days.

CAPÍTULO 1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. Importância do Milho e da Soja na Alimentação de Aves

A produção de ração para animais é um dos segmentos mais importantes da agropecuária brasileira. Em 2007, foram produzidas 53 milhões de toneladas de ração, e cerca de 56% desta foi destinada à avicultura (SINDIRAÇÕES, 2007).

A desuniformidade e as alterações na qualidade das matérias-primas existentes no mercado brasileiro são alguns dos principais problemas enfrentados pela indústria de alimentos, comprometendo a qualidade das rações e, consequentemente, interferindo no desempenho animal (CARVALHO, 2002).

As variabilidades nos valores nutritivos do milho e da soja estão relacionadas com a presença de fatores anti-nutricionais protéicos (inibidores de tripsina, lectinas, fatores antigênicos), oligossacarídeos e polissacarídeos não amiláceos e também em função de mudanças estruturais dos nutrientes (HRUBY & PIERSON, sd).

Estes fatores, geralmente, são decorrentes de infestação por insetos, da proliferação de fungos, da colheita, secagem, armazenamento e processamento inadequados, o que altera a composição química e reduz a disponibilidade de alguns nutrientes (MAZZUCO et al., 2002). Desta forma, deve-se proceder à correção nutricional dos ingredientes de acordo com a qualidade dos grãos, o que em muitos casos, não é efetuada (STRINGHINI et al., 2000).

O milho é o cereal mais importante na alimentação animal (SUMMERS, 2001), com maior representatividade para avicultura (HRUBY & PIERSON, 2005), pois contribui com 65 a 70% da energia (SUMMERS, 2001; COWIESON, 2005) e, apesar do baixo conteúdo protéico, fornece cerca de 20% da proteína dietética (COWIESON, 2005). Sua composição química e valor nutricional variam em função do seu conteúdo em amido, óleo, proteína e antinutrientes, principalmente fitato, inibidores de enzimas e amido resistente (COWIESON, 2005).

Na avaliação de diferentes híbridos ou variedades de milho da mesma região podem ser encontradas variações na digestibilidade dos nutrientes para aves, sem que sejam evidentes as variações na composição percentual (RODRIGUES et al., 2001a,b). Além disso, diferenças no tipo de adubação podem alterar a composição nutricional de

uma mesma variedade de milho (LIMA, 2002). Outro fator que afeta a qualidade do milho é a infestação por insetos ou fungos. STRINGHINI et al. (2000) identificaram o aumento da frequência de problemas de pernas e lesões hepáticas de aves que consumiram milho infestado por insetos ou fungos.

A época de colheita e o processo de secagem também podem afetar a qualidade do milho. A escolha do momento certo para a colheita deve levar em consideração a necessidade e disponibilidade de secagem, o risco de deterioração, o gasto de energia na secagem industrial e o preço do milho na época da colheita (BRÁS, 2002; CRUZ et al., 2007). Já a colheita tardia com objetivo de reduzir a umidade do grão traz como consequência o aumento do ataque de insetos nos grãos e também a possibilidade de maior contaminação por fungos (LIMA, 2002).

Desta forma, o processo de secagem é aplicado para reduzir o teor de umidade dos grãos, promovendo redução na disponibilidade de água para o desenvolvimento de fungos e bactérias (MAZZUCO et al., 2002) e para execução de reações bioquímicas que promovem a auto-degeneração do produto (SILVA, 2005), evitando, assim, o surgimento de grãos ardidos e micotoxinas. A secagem, porém, é uma operação crítica que pode causar danos expressivos na qualidade dos grãos, com reflexos sobre o valor nutritivo e o rendimento industrial (Wasserman et al., 1983, citados por PORTELLA & EICHELBERGER, 2002), podendo ser realizada naturalmente no campo ou por meio de secadores industriais.

A secagem do milho no campo promove benefícios no sentido de economizar energia e propiciar menor ocorrência de grãos trincados e/ou quebrados, apesar de ser dependente de condições climáticas. Entretanto, à medida que o milho seca no campo, aumenta a incidência de plantas daninhas, podendo estas provocarem embuchamento das colhedoras, diminuindo o desempenho das máquinas (SILVA, 2005; CRUZ et al., 2007).

A secagem de grãos em secadores é uma técnica que visa preservar as qualidades do milho colhido antecipadamente. A temperatura de secagem deve variar de acordo com a utilização final do grão. Assim, não deve exceder os seguintes valores: 45° C para semente, 70° C para a indústria dos amidos e 120° C para a alimentação animal (BRÁS, 2002). Todavia, essas informações são incompletas, uma vez que o

tempo de exposição do produto ao ar de secagem é um fator a ser considerado. Sem o controle rígido da temperatura e tempo de secagem, o uso de elevada temperatura pode afetar as características biológicas, químicas e físicas do grão, como germinação, vigor, conteúdo energético, consistência, cor e umidade de equilíbrio (PORTELLA & EICHELBERGER, 2002).

A temperatura na secagem do milho depende do sistema de secagem, do tipo de secador, do tempo de exposição do produto a essa temperatura e do método de resfriamento (lento ou rápido), além da presença ou não de câmaras de descanso nos secadores, do fluxo de grãos e do nível de umidade inicial (PORTELLA & EICHELBERGER, 2002)

A qualidade final dos grãos de milho está, portanto, em função da umidade de colheita, da temperatura e do tempo de secagem. De acordo com ALVES et al. (2001), o milho apresenta melhor qualidade quando colhido com conteúdo de umidade variando de 15 a 16,5% e temperatura do ar de secagem entre 40 e 60 °C. Para a alimentação de aves, há evidências que a temperatura de secagem do milho afeta a composição e a disponibilidade de nutrientes, alterando consequentemente o desempenho dos animais (CARVALHO, 2002; MAZZUCO et al., 2002; IJI et al., 2003; CARVALHO et al., 2004).

Conhecendo esses fatores que afetam a qualidade do milho, torna-se evidente a busca por grãos de melhor qualidade e com garantia de que o processamento adotado não tenha prejudicado o valor nutritivo, de forma a assegurar competitividade do setor (CARVALHO, 2002).

O padrão de qualidade estabelecido pelo MAPA, por meio da portaria Nº 11, de 12 de Abril de 1996, varia de acordo com a classificação do milho. O SINDIRAÇÕES considera adequado o máximo de 13% de umidade, 3,5% de fibra e 20ppb de aflatoxina, e um mínimo de 7,5% de proteína bruta e 3,0% de extrato etéreo. Além disso, os grãos devem possuir coloração amarelo alaranjado, brilhante e maior número de grãos íntegros (HONMA, 2007).

A soja é, sem dúvida, a leguminosa de maior importância econômica no mundo. Com origem na China, é um dos mais antigos produtos cultivados pelo homem (VIOLA, 1999), e atualmente o Brasil, China e Argentina são os principais produtores mundiais (USDA, 2008).

A composição e a qualidade do grão dependem de fatores como genética das sementes, práticas culturais, condições climáticas durante o desenvolvimento, colheita, recebimento, processamento e armazenamento. A comercialização do produto depende dos fatores de qualidade do grão de soja, que podem ser agrupados em: qualidade física (integridade do grão, matérias estranhas e impurezas), qualidade sanitária (doenças e contaminantes) e qualidade nutricional (composição do grão), devendo estes fatores, ser bem avaliados na hora de adquirir o produto (LAZZARI, 1999).

O grão de soja apresenta alguns fatores anti-nutricionais, destacando-se os inibidores de tripsina, as hemaglutininas (lecitinas) e as saponinas que atuam no trato digestório das aves, dificultando os processos de digestão e absorção de nutrientes (VIOLA, 1999). Entretanto alguns destes podem ser inativados por processos térmicos.

Os principais objetivos do tratamento com calor para os grãos de soja são destruir os inibidores de tripsina e a hemaglutinina tóxica, aumentando a disponibilidade dos nutrientes (YU & CHUNG, 2004). Porém alguns fatores anti-nutricionais como saponinas, isoflavonas e fitato não são removidos por processos térmicos (ANDERSON & WOLF, 1995). Além disso, os polissacarídeos não amiláceos (PNAs) do farelo de soja são potencialmente antagônicos à utilização dos nutrientes e podem afetar negativamente a morfologia intestinal (YU & CHUNG, 2004).

A principal forma de utilização da soja na alimentação animal é como farelo (LIMA, 1999). Para isso, o grão passa por uma série de processos até a obtenção do farelo de soja (BELLAYER & SNIZEK, 1999).

Para avaliar o adequado processamento da soja integral, são utilizadas metodologias como a solubilidade da proteína em hidróxido de potássio (KOH), com padrão entre 75 e 90%, e a atividade da urease, com padrão entre 0,05 a 0,30. Valores acima ou abaixo destes padrões indicam processamento inadequado (BRITO et al., 2006).

O farelo obtido a partir do processamento do grão de soja é a fonte de proteína mais usada na nutrição animal e, surpreendentemente, este ingrediente não é tão bem utilizado pelas aves. A energia metabolizável do farelo de soja é baixa em relação à sua energia bruta, principalmente devido aos carboidratos não digeríveis, tais como a rafinose, estaquiose etc. (BORGES, 2005). Além disso, a qualidade da proteína e a

energia metabolizável estão diretamente relacionadas com as variações na quantidade de casca presente no farelo e do grau de inativação de certos fatores anti-nutricionais termolábeis (HONMA, 2007).

2. Determinação da Energia dos Alimentos para Aves

O conhecimento do valor energético dos alimentos é de fundamental importância nutricional e econômica para a formulação de rações que resultem em ótimo desempenho dos animais (SAKOMURA & ROSTAGNO, 2007). De acordo com o NRC (1994), a energia não é um nutriente, mas um produto resultante da oxidação dos nutrientes durante o metabolismo, sendo liberada na forma de calor ou armazenada para uso posterior nos processos metabólicos do organismo animal e, portanto, considerada o principal componente de origem nutricional da ração, afetando diretamente o desempenho das aves e os custos com a alimentação das mesmas (SILVA et al., 2003). É um dos fatores limitantes do consumo, pois é utilizada nos mais diferentes processos, que envolvem desde a manutenção até o máximo potencial produtivo da ave (RODRIGUES et al., 2002).

O valor de energia dos alimentos para as aves pode ser obtido por vários métodos, gerando diferentes terminologias para expressar tais valores, sendo a energia metabolizável (EM) a mais utilizada na formulação das dietas para aves (FREITAS, 2003). Existem vários métodos para determinar os valores de EM, entre eles, a coleta total de excretas com pintos de corte (SAKOMURA & ROSTAGNO, 2007) que, apesar de mais utilizado, apresenta alguns contratempos, como a interferência da idade das aves nos valores de energia. As aves mais jovens possuem menores capacidades de digestão e absorção dos nutrientes, visto que o sistema digestório encontra-se ainda em desenvolvimento (BRUMANO et al., 2006).

O método de alimentação precisa ou forçada geralmente utiliza galos através do fornecimento de uma quantidade exata do ingrediente, diretamente no papo das aves, que devem estar com o trato digestório sem ração (jejum de 48 horas aproximadamente). As excretas devem ser coletadas por um período de aproximadamente 48 horas, com avaliação das perdas endógenas de grupo mantido

em jejum (SAKOMURA & ROSTAGNO, 2007), obtendo-se, assim, a energia metabolizável verdadeira (EMV).

O método de coleta parcial de excretas ou digesta utiliza um indicador na dieta, o qual possibilita o cálculo do fator de indigestibilidade (FI), por meio da determinação da concentração do indicador na dieta e nas excretas. Com essa metodologia não é necessário quantificar o consumo de ração bem como a produção total de excretas (ZANELLA, 1998). A utilização de cinza insolúvel em ácido (CIA) vem sendo amplamente realizada nos últimos anos para determinação das energias digestível e metabolizável, bem como para a digestibilidade dos nutrientes (SCOTT & HALL, 1998; RAVINDRAN et al., 2001; SANTOS, 2005; BARBOSA, 2006).

A avaliação do aproveitamento da energia pelas aves é imprescindível para obtenção de valores mais acurados e melhor adequação na formulação das rações, principalmente com o uso de enzimas exógenas.

3. Enzimas para melhorar o aproveitamento dos ingredientes

Enzimas são produtos de origem biológica que catalisam reações bioquímicas envolvidas na vida da célula. São proteínas de alto peso molecular (entre 10000 e 500000 daltons), que podem ser precipitadas em álcool, acetona e sulfato de amônia (SABATIER & FISH, 1996). As enzimas, como todas as proteínas, são formadas por cadeias de aminoácidos e aceleram ou catalisam reações em um curto tempo, devido à suas altas especificidade e afinidade (SABATIER & FISH, 1996; SHEPPY, 2001).

Ao completar o ciclo da reação, a molécula de enzima pode não perder a atividade, voltando a atuar sobre uma nova reação da mesma forma. Por esta razão, as quantidades de enzimas necessárias para incorporação a um substrato são muito pequenas (CUTAIT et al., 2005; LIMA, 2005).

As enzimas podem ser divididas em classes (Oxidoreductases, Transferases, Hidrolases, Liasas, Isomerases, Ligases), entretanto, na nutrição animal, utilizam-se exclusivamente as hidrolases, como as fosfatases, glicosídeos e proteases (CLARKSON et al., 2001; CUTAIT et al., 2005).

Os primeiros estudos envolvendo o uso de enzimas exógenas na alimentação datam da década de 1920, porém avanços mais notáveis ocorreram na década de 80,

com o esclarecimento do papel das enzimas na fisiologia da digestão, na redução de problemas digestivos e nas limitações associadas a alguns tipos de alimento. Nos últimos 15 anos foram aperfeiçoadas técnicas industriais para purificação de enzimas (LIMA, 2005).

As características desejáveis na produção de enzimas são: atividade altamente específica, altos níveis de resistência à inativação por calor, baixo pH ou enzimas proteolíticas, segurança toxicológica, baixo custo de produção, boa vida de prateleira, ausência de interações com a matriz do alimento para facilitar a determinação quantitativa de enzima na dieta completa e especificidade em promover os efeitos esperados (MARQUARDT & BEDFORD, 2001; LIMA, 2005).

De acordo com LIMA (2005), a utilização de enzimas na alimentação de aves é preconizada visando reduzir os fatores anti-nutricionais que estão presentes em muitos ingredientes, aumentar a disponibilidade dos nutrientes encapsulados dentro da parede celular ou ligados em uma estrutura química que o animal é incapaz de digerir, degradar estruturas químicas específicas em matérias-primas que as enzimas digestivas endógenas não conseguem atuar (fitases, β -glucanases, α -galactosidases e pentosanases) e suplementar a atividade enzimática do trato gastrointestinal (amilase, proteases, lipases).

Esses efeitos, então, levariam à melhor utilização da dieta, podendo promover redução na variabilidade do valor nutritivo entre os ingredientes e melhorando, desta forma, a precisão na formulação de rações (SHEPPY, 2001; BORGES, 2005).

As enzimas são usadas na elaboração de rações pela adição direta (forma granular) ou por incorporação pela indústria em pré-misturas (premixes). A utilização de enzimas via água ou ração depende de alguns fatores como qualidade da água e processo térmico ao qual a ração é submetida. O desenvolvimento de equipamentos de aspersão de enzimas com boa precisão e baixo custo viabilizou o uso de enzimas líquidas (FERNANDES & MALAGUIDO, 2004), que, segundo STEEN (2001), podem resolver problemas de termoestabilidade quando adicionadas após processamento térmico.

Os benefícios com o uso de enzimas podem ser obtidos também no custo, através da redução na quantidade de ingredientes caros e inclusão de ingredientes

baratos à ração (LIMA, 2005). Segundo Wyatt & Bedford (1998), citados por SAKOMURA & BARBOSA (2006), existem duas abordagens econômicas ao considerar a incorporação de enzimas exógenas nas formulações das dietas. Uma aplicação mais prática, chamada de “over the top”, que consiste em suplementar com as enzimas uma formulação padrão, sem alterar os níveis nutricionais, com intuito de melhorar o desempenho. A segunda alternativa seria alterar a formulação da ração reduzindo os nutrientes e adicionando enzimas exógenas para restaurar o valor nutricional da dieta padrão, visando o mesmo desempenho de uma dieta com os níveis nutricionais normais, de forma mais econômica.

Após a suplementação nas dietas, a ação catalítica das enzimas depende de uma série de fatores, tais como: concentrações do substrato e da enzima, temperatura, variação do pH, umidade e da presença de co-enzimas e inibidores no local em que ocorrerá a reação (pois enzima é substrato dependente). Se a enzima não for protegida, principalmente para temperatura e pH, o seu uso será limitado, pois ocorrerá alteração significativa na estrutura da enzima ativa, resultando em perda da sua atividade (SABATIER & FISH, 1996; OFFICER, 2000; SHEPPY, 2001; BORGES, 2005; LIMA, 2005). A termoestabilidade da enzima é outro fator que afeta sua ação catalítica, pois depende do tipo de microrganismo que produz a enzima, sendo menos resistentes (até 75°C) aquelas produzidas por fungos e mais resistentes (80 a 90°C) as produzidas por bactérias (OFFICER, 2000).

A estabilidade e a atividade da enzima são pontos cruciais para preparação de enzimas alimentares. É difícil determinar a atividade da enzima, uma vez que, as condições *in vitro* não representam claramente as condições *in vivo*. As influências sobre os valores obtidos podem ser decorrentes de variações no pH, força iônica, ambiente químico, concentração, qualidade do substrato e aparelhos utilizados durante a reação, além da origem da enzima (SABATIER & FISH, 1996). Existem vários métodos para determinação da atividade de uma enzima, os quais podem refletir em resultados numericamente diferentes, podendo ter interferência do tipo de material a ser analisado, pois já foram evidenciadas diferenças nos resultados de atividade da

enzima, quando a mesma foi analisada incorporada à dieta e isoladamente (SABATIER & FISH, 1996; MCCLEARY, 2001), além de diferenças devido a fatores analíticos.

A utilização de enzimas na produção de aves é amplamente aceita e embasada cientificamente, pois, dependendo do tipo de enzima utilizada, podem-se observar melhorias no desempenho, digestibilidade dos nutrientes, morfometria intestinal, saúde e imunidade das aves. Embora as dietas compostas por milho e farelo de soja possuam alta digestibilidade, esses ingredientes ainda possuem alguns fatores anti-nutricionais (OLUKOSI et al., 2007), passíveis de degradação pelo uso de enzimas exógenas. O milho e o farelo de soja possuem 9,7% e 21,7% de polissacarídeos não amiláceos totais (KNUDSEN, 1997) e 0,24% e 0,39% de fósforo fítico (KORNEGAY, 2001), respectivamente. Podem também apresentar outros fatores anti-nutritivos que variam de acordo com as condições de produção da planta, colheita, secagem e armazenamento, além da idade e espécie animal, o que, de maneira geral, limita a disponibilidade dos nutrientes (KOZLOWSKA, 2000; THORPE & BEAL, 2001) ou reduz o consumo de alimentos (D'MELLO, 2000).

Muitas pesquisas, atualmente, vêm demonstrando que a associação de diferentes enzimas em dietas para aves promove melhores resultados de desempenho, pois elas atuam de forma sinérgica, de maneira que algumas enzimas degradam componentes dos alimentos, que sofrerão posteriormente ação de outras enzimas adicionadas no complexo, ou até mesmo das enzimas endógenas, melhorando o aproveitamento geral dos nutrientes pela ave.

De forma geral, a adição das enzimas em dietas para aves promove uma digestão mais eficiente com redução das exigências de energia para manutenção. Reduz também a quantidade de substrato que entra no intestino grosso, melhorando a utilização dos mesmos no intestino delgado e alterando, conseqüentemente, a população microbiana no íleo terminal (BEDFORD & APAJALAHTI, 2001).

Atualmente, estão sendo pesquisadas novas gerações de enzimas, com foco para a melhoria na qualidade e segurança dos alimentos, no potencial de atividade em diferentes idades da ave, com diversos locais de ação e em diferentes doses, com intuito de promover melhor preditibilidade do efeito destas enzimas no organismo da ave, de acordo com o tipo de alimento utilizado (COWIESON et al., 2006a).

Fitase

A fitase é uma fosfatase que catalisa o desdobramento do ácido fosfórico do inositol liberando o grupo fosfato. Promove redução na suplementação de fósforo na dieta e na excreção de fósforo no ambiente. Pertence à família das histidinas fosfatase ácidas e podem ser produzidas a partir de microrganismos ou plantas (JERMUTUS et al., 2001).

No Brasil, mais de 50% do plantel de frangos de corte recebe fitase nas dietas (DARI, 2004). A principal finalidade desta enzima é melhorar a disponibilidade do fósforo, contudo, sabe-se que a mesma pode melhorar também a disponibilidade de outros minerais, bem como de proteínas e energia das dietas (KORNEGAY, 2001)

Três terminologias são usadas na literatura para descrever o substrato para a enzima fitase, que são: fitato, fitina e ácido fítico. O termo mais utilizado é o fitato, que é uma mistura de sais de ácido fítico (hexafosfato de myo-inositol; IP6), ou seja, ocorre quando o ácido fítico se liga a íons de Na, Mg, K, Ca e Zn, dentre outros. O termo fitina refere-se especificamente ao complexo depositado de IP6 com potássio, magnésio e cálcio como acontece em plantas, considerando que ácido fítico é a forma livre de IP6. Os minerais e outros nutrientes, uma vez ligados à molécula de ácido fítico, tornam-se indisponíveis ao animal, ou seja, não são digeridos (DARI, 2004; SELLE & RAVINDRAN, 2007).

A maioria das sementes ou produtos de sementes possui cerca de 60-80% de fósforo sob a forma de fitato. A molécula de ácido fítico contém, aproximadamente 28,2% de fósforo e possui propriedade anti-nutricional pelo não-aproveitamento do fósforo (KORNEGAY, 2001), além de complexar-se com proteínas, aminoácidos, cátions, amido e enzimas, como a pepsina, tripsina, alfa-amilase e cofatores de enzimas (RAVINDRAN et al., 1999; KORNEGAY, 2001; MAENZ, 2001; ANGEL et al., 2002; LIMA, 2005; COWIESON et al., 2006c; SELLE & RAVINDRAN, 2007). Desse modo, a solubilidade e a digestibilidade da dieta são drasticamente reduzidas pela formação de complexos insolúveis entre o ácido fítico e as substâncias acima citadas.

Outro problema verificado devido ao IP6 é o aumento das perdas endógenas, devido a elevação no *turnover* dos enterócitos e na secreção de mucina, ocasionando, por sua vez, um aumento nos requerimentos energéticos, com aumento do catabolismo

(COWIESON et al., 2006c). Além disso, os grupos de fosfato carregados do ácido fítico podem também formar associações eletrostáticas com grupos amino terminal de proteínas ou com o grupo amino livres da lisina e resíduos de arginina dentro de moléculas de proteína, podendo também inibir a ação de enzimas (Cheryan, 1980, citado por MAENZ, 2001).

As fitases podem ser originadas a partir da mucosa intestinal, dos vegetais ou de microrganismos (bactérias, fungos e leveduras). Os conteúdos do papo e do intestino possuem quantidades desconsideráveis de fitase, e sua atividade sobre o aproveitamento do fósforo é desconhecida (MAENZ, 2001; DARI, 2004).

As fitases alimentares estão divididas em duas categorias, que dependem do local onde é iniciada a hidrólise da molécula de fitato. São denominadas de 3 ou 6 fitases pois começam a hidrólise a partir dos carbonos 3 e 6, respectivamente. Teoricamente, a hidrólise deveria render seis moléculas inorgânicas de fósforo e um inositol, entretanto a adição de fitases exógenas hidrolisa menos que 35% do fitato dietético, isso por que o tempo de trânsito e as limitações de pH no trato digestório da ave não permitem a completa defosforilação do ácido fítico em inositol e fosfatos (SELLE & RAVINDRAN, 2007).

Alguns fatores podem interferir na hidrólise do fitato durante sua passagem intestinal. Dentre eles citam-se a estabilidade e atividade da enzima sobre o fitato, quantidade de enzima adicionada, nível de nutrientes da ração, concentração de ácido fítico no ingrediente utilizado, concentração de minerais e vitamina D, balanço eletrolítico, pH, temperatura e tempo de retenção, dentre outros (KORNEGAY 2001; MAENZ, 2001; DARI, 2004; SANTOS, 2005; SELLE & RAVINDRAN, 2007).

Consequentemente, o tipo de benefício promovido pela enzima também pode ser alterado, apresentando ou não efeito completo sobre o desempenho, disponibilidade de minerais, proteínas e energia, ou apenas sobre uma destas variáveis.

Há também o benefício ambiental, pois o fósforo fítico, juntamente com o excesso de fósforo inorgânico adicionado às rações, é eliminado nas fezes, provocando sérios problemas para o meio ambiente devido à ocorrência dos processos de eutroficação e nitrificação, que diminuem a quantidade de oxigênio existente nas águas

dos rios e lagos, além de contaminarem o solo (JERMUTUS et al., 2001; MAENZ, 2001).

Amilase

O amido é o principal nutriente responsável pelo conteúdo energético dos ingredientes em dietas para monogástricos, com maior impacto sobre o balanço energético, motivo pelo qual é um dos principais fatores utilizados em equações de predição para a energia metabolizável aparente (WISEMAN, 2006).

Como as aves não secretam a-amilase salivar, a a-amilase pancreática é a maior enzima responsável pela digestão do amido (WISEMAN, 2006). A a-amilase é uma enzima endógena secretada pelo pâncreas, que degrada o amido, liberando oligossacarídeos, que são hidrolisados pela ação complementar de três enzimas da borda em escova, integrantes da superfície intestinal, que são as glicoamilases (maltase–glicoamilases, amiloglucosidase), as sacarases (maltase–sacarase) e a a-dextrinase (isomaltase). A glicose é o produto final da digestão do amido, estando disponível para a absorção (KOZLOWSKA et al., 2000; VIEIRA, 2002). Entretanto qualquer modificação na superfície da membrana pode alterar a atividade das enzimas responsáveis pela sua disponibilidade (NIR, 1998).

A amilase exógena é produzida a partir de diferentes microrganismos, como fungos e bactérias (principalmente do gênero *Bacillus*). De acordo com SHEPPY (2001), a adição de amilase em dietas animais ajuda a expor o amido mais rapidamente à digestão no intestino delgado, conduzindo ao aumento na utilização do nutriente, com conseqüente melhoria nas taxas de crescimento.

RITZ et al. (1995) relataram que a adição de a-amilase aumenta o comprimento do vilo dentro do jejuno e íleo de perus, e como o jejuno é o local de maior digestão e o íleo de absorção (LEESON & SUMMERS, 2001), isso poderia levar à melhoria no aproveitamento dos nutrientes de uma maneira geral, com reflexos sobre o desempenho.

MONTEIRO et al. (2006) relataram que a atividade enzimática da a-amilase é dependente de íons Ca^{2+} e Cl^- . O cátion Ca^{2+} é firmemente ligado à molécula da enzima, auxiliando em sua atividade. A perda de Ca^{2+} causa várias mudanças

conformacionais que aumentam a sensibilidade da digestão da enzima pela tripsina. O ânion Cl^- também é necessário para a atividade da α -amilase, no entanto, não está ligado à molécula como o Ca^{2+} . Outros íons podem suprir a necessidade para atividade da α -amilase em frangos, mas o Cl^- é o mais eficiente (Moran Jr, 1982 citado por MONTEIRO et al., 2006).

Outro fator que afeta a atividade da α -amilase é a presença dos polissacarídeos não amiláceos, que, não parecem estar diretamente relacionado à sua quantidade total, mas sim à sua localização no endosperma da parede celular, impedindo e reduzindo a digestão de nutrientes (WISEMAN, 2006). Entretanto, alguns grãos de cereais apresentam inibidores de amilase ou mesmo a presença de fatores anti-nutricionais (CLASSEN, 1996), dificultando assim a ação da enzima.

O amido resistente pode potencialmente apresentar uma oportunidade para suplementação de amilase exógena. No milho, diferença na digestibilidade do amido é um dos principais fatores que contribui para a variabilidade na EMA entre diferentes partidas (YU & CHUNG, 2004).

O amido é composto por polímeros de amilose (cadeias retas) e amilopectina (cadeias ramificadas). Todavia, pode ser caracterizado com base na taxa e no grau da sua digestão em amido rapidamente digerido, amido lentamente digerido e amido resistente (SUMMERS, 2001; DARI, 2006). Este último pode ainda ser caracterizado em AR1 (amido resistente tipo 1), cujos grânulos são fisicamente inacessíveis; o AR2, quando sua resistência está relacionada com a estrutura e conformação dos grânulos de amido nativo e o AR3, que seria o amido retrógrado, formado após processamento do ingrediente, o qual pode variar significativamente com relação à suscetibilidade enzimática (SUMMERS, 2001; ENGLYST & ENGLYST, 2005). TESTER et al. (2004) consideram ainda a existência de um amido resistente tipo 4, no qual ocorreria a formação de novas ligações químicas, diferentes das α -1-4 e α -1-6.

A forma mais comum de amido resistente na dieta e o mais importante do ponto de vista tecnológico é o amido tipo I, devido aos processos de moagem dos ingredientes. Entretanto, o amido retrogradado vem apresentando relativa importância nos últimos anos. A formação de AR3 é influenciada pelas condições de solubilização do amido e processos de retrogradação (temperatura e pressão), pela presença de

lipídios ou açúcares e pelo conteúdo de amilose no amido. A relação amilose/amilopectina afeta a digestibilidade do amido, pois a amilose tende a formar estruturas secundárias que são difíceis de degradar (ENGLYST & ENGLYST, 2005), sendo necessárias enzimas mais eficientes a fim de melhorar o processo de digestão.

Xilanases e Celulases

Apesar de no Brasil a maioria das dietas ser constituída por ingredientes altamente digestíveis como o milho e farelo de soja, estes ainda são passíveis de melhoria a partir do uso de enzimas exógenas como as celulases e hemicelulases. De acordo com MALATHI & DEVEGOWDA (2001), o milho possui 5,32% de pentosanas totais, 3,12% de celulose; 1,00% de pectinas e 9,34% de polissacarídeos não amiláceos totais, enquanto o farelo de soja possui 4,21% de pentosanas totais, 5,75% de celulose; 6,16% de pectinas e 29,02% de polissacarídeos não amiláceos totais. Acredita-se que os componentes insolúveis dos polissacarídeos não amiláceos presentes no milho podem encapsular os nutrientes, que poderiam ser liberados pelas xilanases e celulases (CLASSEN, 1996; GRACIA et al., 2003).

A celulose é um polímero linear de glicose unido por ligações α -1,4-glicosídicas tendo estruturas primárias simples e terciárias complexas (BHAT & HAZLEWOOD, 2001). É uma fonte de carboidratos indesejável, podendo reter em sua estrutura física uma série de outros nutrientes e evitar o contato de enzimas endógenas com o alimento (FERNANDES & MALAGUIDO, 2004). Já a hemicelulose apresenta-se em associação com a celulose nas paredes da maioria das espécies de planta. Baseadas nos principais resíduos de açúcares presentes como polímeros da cadeia principal, as hemiceluloses podem ser chamadas de xilanas, glucomananas, galactanas ou arabinanas (BHAT & HAZLEWOOD, 2001). Os oligossacarídeos, tais como estaquiase e rafinose, presentes em muitas leguminosas, não são absorvidos no intestino delgado. A utilização destes carboidratos, portanto, só é possível após a quebra dos oligossacarídeos em monossacarídeos, mediante ação de enzimas exógenas (BORGES, 2005), do contrário serão fermentados no intestino grosso.

As carboidrases endógenas produzidas são específicas para carboidratos com ligações alfa, como o amido, não atuando sobre carboidratos com ligações betas e

oligossacarídeos contendo galactose, encontrados em várias sementes de plantas (FERNANDES & MALAGUIDO, 2004). As celulasas e xilanases são produzidas por uma grande variedade de fungos e bactérias, porém são frequentemente inibidas pela presença de seus produtos de hidrólise. O modo de ação destas enzimas é dependente do microrganismo que a produziu, podendo liberar diferentes produtos conforme o tipo de reação catalítica (BHAT & HAZLEWOOD, 2001).

Os efeitos benéficos das xilanases na utilização de nutrientes estão relacionados à redução da viscosidade da digesta, resultando em aumento da depolimerização de arabinoxilanas em componentes de menor peso molecular (RAVINDRAN et al., 1999) ou a partir da liberação dos nutrientes encapsulados nas estruturas da parede celular, favorecendo o contato dos nutrientes com as enzimas endógenas. Previnem, ainda, distúrbios digestórios resultantes da presença de material fibroso não digerido no trato gastrointestinal de aves (LIMA, 2005). COWIESON (2005), contudo, acredita que o uso de xilanase, isoladamente, sem emprego de outras enzimas exógenas como proteases, amilases ou fitase, não produz resposta semelhante às obtidas com a combinação das enzimas.

Em geral, xilanases são específicas para ligações internas β -1,4 de polímero de xilanas, ou seja, a hidrólise de arabinoxilanas é realizada principalmente pela atividade de uma endo-1,4- β -xilanase, que quebra as ligações (1,4) da cadeia central das xilanas (CLASSEN, 1996; BHAT & HAZLEWOOD, 2001). A destruição de β -glucanas é realizada principalmente por enzimas que contenham atividade endo- β -glucanase. Ainda que a endo-atividade seja de importância primária, outras enzimas com atividade secundária são conhecidas por aumentar o efeito benéfico (CLASSEN, 1996).

O conhecimento da eficiência da aplicação de glucanase e xylanase justifica e possibilita o desenvolvimento de complexos multienzimáticos, substrato-específico para dietas compostas por milho e farelo de soja (YU & CHUNG, 2004).

A utilização de enzimas que degradem os polissacarídeos não amiláceos (PNAs) vem sendo preconizada, isso por que os PNAs interferem bastante no processo digestivo das aves. O modo de ação é diferente entre os PNA solúveis e insolúveis e vai depender da quantidade dos mesmos presente no alimento, podendo ser

considerado nutriente diluente ou fator anti-nutritivo, de acordo com sua solubilidade (HETLAND et al., 2004).

As leguminosas, como a soja, possuem estrutura de PNAs mais complexas que os cereais, contendo principalmente uma mistura de polissacarídeos coloidais, chamadas substâncias pécticas (galacturanas, galactanas e arabananas), além de polissacarídeos neutros como xiloglucanas e galactomananas (VAHJEN et al., 2005; CHOCT, 2006). Os PNAs neutros como celulose e xilanos, principais compostos dos PNAs em grãos de cereais, são encontrados somente na casca da maioria das leguminosas (NAGASHIRO, 2007).

Deve-se, no entanto, considerar também o efeito adverso que a hidrólise dos PNAs da soja podem exercer sobre a liberação de alguns oligossacarídeos, os quais podem ser fermentados e, desta forma, aumentar a pressão osmótica intestinal, interferindo na absorção de nutrientes (VAHJEN et al., 2005).

Protease

As proteases também são enzimas endógenas, com ação proteolítica, e podem ser classificadas como endopeptidases ou exopeptidases. Ambos os tipos de enzimas atacam ligações peptídicas de proteínas e polipeptídeos. A diferença entre elas é que as endopeptidases limitam seu ataque a ligações de dentro (endo, dentro) da molécula protéica, quebrando grandes cadeias de peptídeos em segmentos de polipeptídeos menores (MOREIRA et al., 2004). Já as proteases exógenas podem ser produzidas por microrganismos ou plantas, entretanto as proteases bacterianas parecem ser mais efetivas em degradar inibidores de tripsina do que as proteases fúngicas (THORPE & BEAL, 2001)

A adição de proteases exógenas pode representar um potencial desejável para a inativação de fatores anti-nutritivos, tais como lecitinas, proteínas antigênicas e inibidores de tripsina, presentes em determinados alimentos, particularmente em leguminosas (CLASSEN, 1996; OFFICER, 2000; THORPE & BEAL, 2001; COWIESON et al., 2006a), podendo também suplementar a atividade proteolítica em animais jovens, liberando peptídeos menores e facilitando a ação das enzimas endógenas (LIMA, 2005). Além de auxiliar na inativação de fatores proteínáceos anti-nutritivos, podem

ainda degradar proteínas da soja, especificamente as de armazenamento (SHEPPY, 2001), como a conglícina, β -conglícina (Garcia, 1997, citado por SAKOMURA & BARBOSA, 2006), zeína e kafirina (DARI, 2006).

4. Referências

- ALVES, W.M. et al. Qualidade dos grãos de milho em função da umidade de colheita e da temperatura de secagem. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.5, n. 3, p. 469-474, 2001.
- ANDERSON, R. L.; WOLF, W. J. Compositional changes in trypsin inhibitors, phytic acid, saponins and isoflavones related to soybean processing. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 125, n. 3, suppl., p. 581S-588S, 1995.
- ANGEL, R. et al. Phytic acid chemistry: influence on phytin-phosphorus availability and phytase efficacy. **Journal of Applied Poultry Research**, Savoy, v. 11, n. 4, p. 471-480, 2002.
- BARBOSA, N. A. **A Avaliação de enzimas exógenas nas dietas a base de milho e soja sobre o desempenho e a digestibilidade ileal de nutrientes em frangos de corte**. 2006. 59 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.
- BEDFORD, M. R.; APAJALAHTI, J. Microbial Interactions in the Response to exogenous Enzyme Utilization. In: BEDFORD, M. R.; PARTRIDGE, G. G. **Enzymes in farm nutrition**. Londres: Cab International, 2001. p. 299-314.
- BELLAVER, C.; SNIZEK JR, P. N. Processamento da soja e suas implicações na alimentação de suínos e aves. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA/FÓRUM DA SOJA NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL E QUALIDADE DO GRÃO PARA A INDÚSTRIA. 1., 1999, Londrina. **Anais...** Londrina: Embrapa, 1999, p.183-199.
- BHAT, M. K.; HAZLEWOOD, G. P. Enzymology and other characteristics of cellulases and xylanases. In: BEDFORD, M. R.; PARTRIDGE, G. G. **Enzymes in farm nutrition**. Londres: Cab International, 2001. p.11-60.
- BORGES, C. A. Q. Avanços nutricionais para otimização de resultados na avicultura. In: FÓRUM INTERNACIONAL DE AVICULTURA, 1., 2005, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu: Editora Animalworld, 2005. p. 185-193.
- BRAS, A. Colheita e conservação do milho-grão. **Ficha técnica nº 30**. MAPA/D.R.A.E.D.M. 2002
- BRITO, C. O. et al. Adição de complexo multienzimático em dietas à base de soja extrusada: valores energéticos e digestibilidade de nutrientes em pintos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.35, n. 3, p.1047-1055, 2006.

BRUMANO, G. et al. Composição química e valores de energia metabolizável de alimentos protéicos determinados com frangos de corte em diferentes idades. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 35, n. 6, p. 2297-2302, 2006.

CARVALHO, D. C. O. **Valor nutritivo do milho para aves, submetido a diferentes temperaturas de secagem e tempo de armazenamento**. 2002. 90f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002.

CARVALHO, D. C. O. et al. Composição química e energética de amostras de milho submetidas a diferentes temperaturas de secagem e períodos de armazenamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.33, n. 2, p.358-364, 2004.

CHOCT, M. Enzymes for the feed industry: past, present and future. **World's Poultry Science Journal**, Beekbergen, v. 62, n. 2, p. 5-15, 2006.

CLARKSON, K. et al., Enzymes: screening, expression, design and production. In: BEDFORD, M. R.; PARTRIDGE, G. G. **Enzymes in farm nutrition**. Londres: Cab International, 2001. p.315-352.

CLASSEN, H. L. Cereal grain starch and exogenous enzymes in poultry diets. **Animal Feed Science Technology**, Davis, v. 62, n. 1-2, p. 21-27, 1996.

COWIESON, A. J. Factors that affect the nutritional value of maize for broilers. **Animal Feed Science and Technology**, Davis, n. 3-4, v. 119, n. p. 293–305, 2005.

COWIESON, A. J.; HRUBY, M.; PIERSON, E. E. M. Evolving enzyme technology: Impact on commercial poultry nutrition. **Nutrition Research Reviews**, Cambridge, v. 19, n. 1, p. 1-15, 2006a.

COWIESON, A. J.; ACAMOVIC, T.; BEDFORD, M. R. Phytic acid and phytase: implications for protein utilization by poultry. **Poultry Science**, Savoy, v. 85, n.5, p.878–885, 2006c.

CRUZ, J. C.; FERREIRA, A. S.; MELHORANÇA, A. L. et al. **Cultivo do Milho**. Embrapa Milho e Sorgo - Sistemas de Produção, 2. Versão Eletrônica – 3. 2007. Disponível em: <<http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho/index.htm>>, Acessado em: 22 set 2007.

CUTAIT, M. S.; BERCOVICI, D. ; CASTRO, F. F. et al. Guia de Aditivos. **SINDIRAÇÕES**, 2005. Disponível em:<http://www.sindiracoes.org.br/imagens/UserFiles/Image/Sindiraes/Guias/Sindiracoes_Guia_Aditivos_Pag_Pag.pdf> Acessado em: 22 set 2007.

D´MELLO, J. P. F. Anti-nutritional Factors and Mycotoxins. In: D´MELLO, J. P. F. **Farm animal metabolism and nutrition**. Edinburgh: Cab International, 2000. p. 386 - 404.

DARI, R. L. Utilização de fitase na alimentação de aves. In: CONFERENCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIAS AVÍCOLAS, 2004, Santos. **Anais...**Santos: FACTA, 2004. p. 127-143.

DARI, R. L. Porque utilizar um blend de enzimas e não apenas uma? In: SEMINÁRIOS TÉCNICOS NUTRON, 2006, Campinas. **Anais...** Campinas: Nutron, 2006. CD-ROM.

ENGLYST, K. N.; ENGLYST, H. N. Horizons in nutritional science: Carbohydrate bioavailability. **British Journal of Nutrition**, v. 94, n. 1, p. 1-11, 2005.

FERNANDES, P. C. C.; MALAGUIDO, A. Uso de enzimas em dietas de frangos de corte In: CONFERENCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIAS AVÍCOLAS, 2004, Santos. **Anais...**Santos: FACTA, 2004. p. 117-126.

FREITAS, E. R. **Avaliação nutricional de alguns alimentos processados para aves por diferentes metodologias e suas aplicações na formulação de rações para frangos de corte.** 2003. 129 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Ciência Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

GRACIA, M. I.; ARANÍBAR, M. J.; LÁZARO, R. a-Amylase supplementation of broiler diets based on corn. **Poultry Science**, Savoy, v. 82, n. 3, p. 436–442, 2003.

HETLAND, H.; CHOCT, M.; SVIHUS, B. Role of insoluble no-starch polysaccharides in poultry nutrition. **World's Poultry Science Journal**, Beekbergen, v.60, n. 4, p.415-422, 2004.

HONMA, N. H. Controle de qualidade das matérias primas na pré-fabricação da ração. **Avicultura Industrial**, Itu, n. 7, p. 16-20, 2007.

HRUBY, M.; PIERSON, E. E. M. The use of enzymes in broiler nutrition. In: Fórum Internacional de Avicultura, 1., 2005, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu: Editora Animalworld, 2005. p. 142-147.

HRUBY, M.; PIERSON, E. E. M. Implications of enzyme use in corn/sorghum/soy poultry diets on performance, nutrient utilization and gut microflora. Disponível em: <<http://ag.ansc.purdue.edu/poultry/multistate/HrubyPiersonFinnfeeds.pdf>>, Acessado em: 7 jun 2007.

IJI, P. A.; KHUMALO, K.; SLIPPERS, S., et al. Intestinal function and body growth of broiler chickens on diets based on maize dried at different temperatures and supplemented with a microbial enzyme. **Reproduction Nutrition Development**, França, v. 43, n.1, p. 77–90, 2003.

JERMUTUS, L. et al. Structure-based chimeric enzymes as an alternative to directed enzyme evolution: phytase as a test case. **Journal of Biotechnology**, Bielefeld, v. 85, n. 1, p. 15–24, 2001.

KNUDSEN, K. E. B. Carbohydrate and lignin contents of plant materials used in animal feeding. **Animal Feed Science Technology**, Davis, v. 67, n. 4, p. 319-338, 1997.

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. **Enzymes in farm nutrition**. Londres: Cab International, 2001. p. 237-271.

KOZLOWSKA, H. et al. Nutrition. In: HEDLEY, C. L. **Carbohydrates in grain legume seeds: improving nutritional quality and agronomic characteristics**. Norwich: Cab International, 2000. p.15 -60.

LAZZARI, F. A. Fatores de qualidade do grão de soja. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA; FÓRUM DA SOJA NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL E QUALIDADE DO GRÃO PARA A INDÚSTRIA, 1999, Londrina. **Anais...** Londrina: Embrapa, 1999. p. 205-210.

LEESON, S.; SUMMERS, J. D. **Nutrition of Chickens**. 4^a edição. Guelph: University Books, 2001. 482 p.

LIMA, F. R. Aditivos zootécnicos: enzimas. In: PALERMO NETO, J.; SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. I. **Farmacologia aplicada à avicultura**. São Paulo: ROCA, 2005. p. 239-248.

LIMA, G. J. M. M. Importância da qualidade nutricional da soja e de seus subprodutos no mercado de rações: situação atual e perspectivas futuras. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA; FÓRUM DA SOJA NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL E QUALIDADE DO GRÃO PARA A INDÚSTRIA, 1999, Londrina. **Anais...** Londrina: Embrapa, 1999. p.165-175.

LIMA, G. J. M. M.; SOUZA, O. W. Importância da qualidade de grãos na produção de suínos. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE PRODUÇÃO, MERCADO E QUALIDADE DE CARNE DE SUÍNOS - AVESUI. 2002, Florianópolis. **Anais...** Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2002. p. 45-62.

MAENZ, D. D. Enzymatic characteristics of phytases as they relate to their use in animal feeds. In: BEDFORD, M. R.; PARTRIDGE, G. G. **Enzymes in farm nutrition**. Londres: Cab international, 2001. p. 61-84.

MALATHI,V.; DEVEGOWDA, G. *In Vitro* evaluation of nonstarch polysaccharide digestibility of feed ingredients by enzymes. **Poultry Science**, Savoy, v. 80, n. 3, p.302–305, 2001.

MARQUARDT, R. R.; BEDFORD, M. R. Future horizons. In: BEDFORD, M. R.; PARTRIDGE, G. G. **Enzymes in farm nutrition**. Londres: Cab International, 200. p.389-398.

MAZZUCO, H. et al. Composição química e energética do milho com diversos níveis de umidade na colheita e diferentes temperaturas de secagem para frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.31, n. 6, p.2216-2220, 2002.

McCLEARY, B. V. Analysis of feed enzymes In: BEDFORD, M. R.; PARTRIDGE, G. G. **Enzymes in farm nutrition**. Londres: Cab International, 2001. p. 85-107.

MONTEIRO, M. P. et al. Alfa-amilase em frangos de corte: efeitos do balanço eletrolítico e do nível protéico da dieta. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.35, n. 3, supl., p.1070-1076, 2006.

MOREIRA, I.; SCAPINELLO, C.; SAKAMOTO, M. U. Fisiologia da digestão e absorção de proteínas em aves. In: SAKOMURA, N. K. et al. **Curso de fisiologia da digestão e metabolismo dos nutrientes em aves**. Jaboticabal. 2004. CD-ROM.

NAGASHIRO, C. Enzimas na nutrição de aves. In: CONFERENCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLA, 2007, Santos. **Anais...** Santos: FACTA, 2007. p. 307-327.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. NRC, Board on Agriculture. Committee on Animal Nutrition. Subcommittee on Poultry Nutrition. 9.ed. Washington D.C: National Academy Press, 1994. 155p.

OFFICER, D. I. Feed enzymes. In: D´MELLO, J. P. F. **Farm animal metabolism and nutrition**. Edinburgh: Cab International, 2000. p. 405-426.

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

PORTELLA, J. A.; EICHELBERGER, L. **Parâmetros para secagem de milho em secador estacionário, usando gás liquefeito de petróleo**. Passo Fundo: Embrapa Trigo (Circular técnica on line), 2002. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_ci09.htm> Acessado em: 03 jun 2007.

RAVINDRAN, V. et al. Microbial phytase improves performance, apparent metabolizable energy and ileal amino acid digestibility of broilers fed a lysine-deficient diet. **Poultry Science**, Savoy, v. 80, n.3, p.338-344, 2001.

RAVINDRAN, V.; HEW, L. I., RAVINDRAN, G. Influence of xylanase supplementation on the apparent metabolizable energy and ileal amino acid digestibility in a diet containing wheat and oats, and on the performance of three strains of broiler chickens. **Australian Journal Agriculture Research**, Collingwood, v. 50, n. 7, p. 1159-1163, 1999.

RITZ, C. W. et al. Growth and intestinal morphology of male turkeys as influenced by dietary supplementation of amylase and xylanase. **Poultry Science**, Savoy, v. 74, n. 10, p. 1329–1334, 1995.

RODRIGUES, P. B.; ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; et al. Aminoácidos Digestíveis verdadeiros do milho, do milho e subprodutos do milho, determinados com galos adultos cecectomizados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.30, supl., p.2046-2058, 2001a.

RODRIGUES, P. B.; ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; et al. Valores energéticos do milho, do milho e subprodutos do milho, determinados com frangos de corte e galos adultos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.30, n. 6, p.1767-1778, 2001b.

RODRIGUES, P. B.; ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T. et al. Aminoácidos Digestíveis Verdadeiros da Soja e Subprodutos, Determinados com Galos Cecectomizados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, n. 4, v.31, p.970-981, 2002.

SABATIER, A. M. FISH, N. M. Method of analysis for feed enzymes: methodological problems? **Journal of Applied Poultry Research**, Savoy, v. 5, n. 4, p. 408-413, 1996.

SAKOMURA, N. K.; BARBOSA, N. A. A. Avaliação das enzimas em dietas de frangos de corte. In: SEMINÁRIOS TÉCNICOS NUTRON, 2006, Campinas. **Anais...** Campinas: Nutron, 2006. CD-ROM.

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

SANTOS, F.R. **Efeito da suplementação com fitase sobre o desempenho e digestibilidade de nutrientes para frangos de corte**. 2005. 99 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005.

SCOTT, T. A.; HALL, J. W. Using acid insoluble ash marker ratios (diet:digesta) to predict digestibility of wheat and barley metabolizable energy and nitrogen retention in broiler chicks. **Poultry Science**, Savoy, v. 77, n. 5, p. 674–679, 1998.

SELLE, P. H.; RAVINDRAN, V. Microbial phytase in poultry nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, Davis, v. 135, n. 1-2, p. 1–41, 2007.

SHEPPY, C. The current feed enzyme market and likely trends. In: BEDFORD, M. R.; PARTRIDGE, G. G. **Enzymes in farm nutrition**. Londres: Cab International, 2001. p. 1-10.

SILVA, J. H. V. et. al. Energia Metabolizável de Ingredientes Determinada Com Codornas Japonesas (*Coturnix coturnix japonica*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 32, n. 6, p. 1912-1918, 2003.

SILVA, L. C. Secagem de Grãos. **Boletim técnico AG**, 2005. Disponível em: <http://www.agais.com/ag0405_secagem.pdf> Acessado em: 06 dez 2007.

STEEN, P. Liquid application systems for feed enzymes In: BEDFORD, M. R.; PARTRIDGE, G. G. **Enzymes in farm nutrition**. Londres: Cab international, 2001. p. 353-376.

STRINGHINI, J. H. et al. Efeito da qualidade do milho no desempenho de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 29, n. 1, p.191-198, 2000.

SUMMERS, J. D. Maize: factors affecting its digestibility and variability in its feeding value In: BEDFORD, M. R.; PARTRIDGE, G. G. **Enzymes in farm nutrition**. Londres: Cab International, 2001. p. 109-124.

TESTER, R.F., KARKALAS, J., QI, X., Starch structure and digestibility enzyme-substrate relationship. **World's Poultry Science Journal**, v. Beekbergen, 60, n. 2, p.186–195, 2004.

THORPE, J.; BEAL, J. D. Vegetable protein meals and the effects of enzymes. In: BEDFORD, M. R.; PARTRIDGE, G. G. **Enzymes in farm nutrition**. Londres: Cab International, 2001. p. 125-143.

VAHJEN, W.; BUSCH, T.; SIMON, O. Study on the use of soya bean polysaccharide degrading enzymes in broiler nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, Davis, v. 120, n. 3-4, p. 259–276, 2005.

VIEIRA, S. L. Carboidratos: digestão e absorção. In: MACARI, M.; FURLAN, R. L.; GONZALES, E. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. 2. ed. Jaboticabal: Funep, 2002. p. 279-298.

VIOLA, E. S. Uso da soja integral em dietas de suínos e aves: oportunidades e entraves. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA; FÓRUM DA SOJA NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL E QUALIDADE DO GRÃO PARA A INDÚSTRIA. 1999, Londrina. **Anais...** Londrina: Embrapa, 1999. p.175-182.

WISEMAN, J. Variations in starch digestibility in non-ruminants. **Animal Feed Science and Technology**, Davis, v. 130, n. 1-2, p.66 – 77, 2006.

YU, B.; CHUNG, T. K. Effects of multiple-enzyme mixtures on growth performance of broilers fed corn-soybean meal diets. **Journal Applied Poultry Research**, Savoy, v. 13, n. 2, p.178–182, 2004.

ZANELLA, I. **Efeito da suplementação de enzimas em dietas a base de milho e sojas processadas sobre a digestibilidade e desempenho de frangos de corte**. 1998, 179 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Ciência Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1998.

CAPÍTULO 2. ENERGIA METABOLIZÁVEL DO MILHO E FARELO DE SOJA COM ADIÇÃO DE ENZIMAS EXÓGENAS

RESUMO: Foram conduzidos dois ensaios de metabolismo para determinar a energia metabolizável do milho e farelo de soja, promovido pela adição de diferentes enzimas. No primeiro ensaio, foram usados 35 galos para cada alimento estudado (milho e farelo de soja), distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 4 tratamentos e 7 repetições de um galos cada. Um grupo de 7 galos foi mantido em jejum para coleta das perdas endógenas. Os tratamentos avaliados foram o ingrediente (milho ou farelo de soja) sem adição de enzima, com adição de complexo enzimático (xilanase, amilase, protease - XAP), de xilanase e de fitase. Neste ensaio foi utilizada a técnica de alimentação precisa para a determinação da energia metabolizável verdadeira (EMV). No segundo ensaio, foram utilizados 280 pintos de corte machos Cobb®, com sete dias de idade distribuídos em um DIC, com sete tratamentos, cinco repetições de 8 aves cada, alojadas em baterias de metabolismo. Os tratamentos foram milho sem adição de enzima, com adição de amilase, de xilanase, de fitase, de complexo XAP, da combinação de XAP+fitase e da adição de complexo xilanase/pectinase/ β -glucanase. O milho foi suplementado com macro e microminerais. Neste ensaio foi utilizado o método de coleta total de excretas para determinação da energia metabolizável aparente (EMAn). No primeiro ensaio a utilização de enzimas não proporcionou diferenças ($P>0,05$) sobre a EMV do farelo de soja, entretanto a adição de fitase melhorou a EMV do milho em 2,3% ($P=0,004$). No segundo ensaio houve diferença ($P=0,08$) para a EMAn e para o coeficiente de digestibilidade da matéria seca ($P=0,03$). A combinação entre XAP e fitase proporcionaram aumento de 2,11% nos valores de EMAn do milho, e as demais enzimas proporcionaram incrementos que variaram entre 0,86% e 1,66%.

Palavras chave: amilase, alimentação forçada, galos, protease, xilanase

METABOLIZABLE ENERGY OF CORN AND SOYBEAN MEAL WITH ENZYME ADDITION

SUMMARY: Two trials were led to determine the metabolizable energy values (ME) of the corn and soybean meal with addition of different enzymes. In the first trial 35 roosters were used for each studied feed (corn and soybean meal), distributed in a completely randomized design with four treatments seven replicates of a rooster each. A group of seven roosters was maintained in fast for collection of the endogenous losses. The treatments were the feed with or without enzyme addition. The enzymes were XAP (xylanase, amylase and protease), xylanase and phytase. The true metabolizable energy (TME) was obtained through feeding forced technique. In the second trial, 280 Cobb, males chicks were used with seven days of age distributed in an completely randomized design, with seven treatments and five replicates of 8 chicks each. The treatments were with or without enzyme addition. The enzymes were: amylase; xylanase; phytase; XAP; XAP and phytase combination; xylanase/pectinase/ β -glucanase blend. The corn used in this trial was supplied with macro and micro minerals and the apparent metabolizable energy (AME) was obtained through *ad libitum* feeding and total collection technique. In the first trial, the use of enzymes didn't provide significant differences ($P>0.05$) on soybean meal TME; however the phytase addition improved 2,3% corn TME ($P=0.004$). In the second trial were observed an effect ($P=0.08$) for AMEn and for the dry matter digestibility coefficient ($P=0.03$). The XAP and Phytase combination provided an improvement of 2.11% in the corn AMEn. The other enzymes provided increase on corn AMEn between 0.86% to 1.66%.

Key words: amylase, feeding forced technique, protease, roosters, xylanase,

Introdução

A utilização de enzimas tem sido proposta para melhorar a digestibilidade dos nutrientes em dietas para aves. A maioria dos trabalhos tem determinado o efeito das enzimas sobre a energia das dietas (ZANELLA et al., 1999; DOUGLAS et al., 2000; KOCHER et al., 2003; BRITO et al., 2006; OLUKOSI et al., 2007). Poucos trabalhos, no entanto, foram realizados para determinação do efeito das enzimas sobre os ingredientes. O conhecimento do valor nutricional dos ingredientes com adição de enzimas exógenas é imprescindível para estabelecer a matriz nutricional dos mesmos.

Dentre os métodos utilizados para determinação da energia metabolizável dos ingredientes, o de coleta total, com o uso de dieta teste e dieta referência, tem sido o mais utilizado (SAKOMURA & ROSTAGNO, 2007). Mas essa técnica não permite a determinação do efeito de enzimas sobre a energia metabolizável do alimento isoladamente, pois não só o alimento teste, mas também toda a dieta poderia sofrer ação da enzima, dificultando o estabelecimento das alterações promovidas apenas no ingrediente.

Na avaliação do ingrediente isoladamente, utilizando a técnica de coleta total, torna-se difícil obter estimativas corretas, um vez que a deficiência ou excesso de alguns nutrientes poderia ser limitante, e, portanto, para avaliar o ingrediente puro por essa técnica, tornam-se necessários alguns ajustes. Por outro lado, a técnica de alimentação precisa, com fornecimento de uma quantidade exata do ingrediente, diretamente no papo das aves em jejum, permite determinar a energia do alimento com facilidade, assim como a administração de pequenas quantidades do ingrediente puro, em um curto período, possibilita isolar o efeito das enzimas sobre os substratos específicos de cada ingrediente.

Desta forma, a determinação da energia dos ingredientes com adição de enzimas poderá ser utilizada para melhor adequar as dietas das aves. BEDFORD (2002) relatou a importância de ajustar as informações referentes ao efeito das enzimas na disponibilização de nutrientes ou no desempenho, de forma que possibilite a elaboração de modelos capazes de prever as respostas do animal e a formulação mais econômica da ração.

O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da adição de enzimas exógenas sobre a energia metabolizável (EM) do milho e farelo de soja.

Material e Métodos

Dois ensaios de digestibilidade foram conduzidos no Setor de Avicultura do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária FCAV-UNESP/Jaboticabal-SP. O primeiro ensaio foi conduzido com galos, pela técnica de alimentação precisa, e o segundo, com pintos, pela técnica de coleta total de excretas.

Ensaio com galos

Foram usados 35 galos intactos (Hy-line) para cada alimento estudado (milho e farelo de soja), distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado, com 4 tratamentos e 7 repetições de um galo. Um grupo de 7 galos foi mantido em jejum para coleta das perdas endógenas. No início do experimento os galos foram pesados individualmente e distribuídos de modo que as parcelas apresentassem peso médio semelhante ($2,007 \pm 0,043$ kg). O farelo de soja e o milho foram fornecidos com ou sem a adição das enzimas exógenas, sendo os tratamentos constituídos da seguinte forma:

T1- Ingrediente (milho ou farelo de soja) sem adição de enzima;

T2- Ingrediente + complexo XAP (xilanase, amilase e protease - 200g/ton);

T3- Ingrediente + xilanase (100g/ton);

T4- Ingrediente + fitase (100g/ton).

Antes do início do ensaio experimental, os animais foram submetidos ao procedimento de fixação de uma argola junto à cloaca, para permitir a colocação de um saco plástico coletor, visando facilitar a coleta e minimizar as perdas de excretas. Foi feita a aplicação de 1mL de cloridrato de lidocaína (anestesia local), distribuindo 0,25 mL em cada quadrante que circunda a cloaca. Após dois ou três minutos, fixou-se, com fio de náilon nº 0, uma argola plástica com diâmetro de 2,5 cm, junto à pele da cloaca com sutura simples e pontos duplos.

Após recuperação de aproximadamente 3 dias, os animais foram submetidos a um período de jejum de 36 horas para limpeza do trato gastrointestinal. Em seguida, foram submetidos à alimentação forçada com o auxílio de um funil introduzido diretamente no papo das aves. O fornecimento dos ingredientes foi fracionado em duas

vezes, sendo 20g às 7:00h e 20g às 17:00h. Os sacos coletores foram colocados após o primeiro fornecimento. As excretas foram coletadas duas vezes ao dia por 48h após o último fornecimento e, feito isso, foram pesadas, congeladas, liofilizadas, moídas e, posteriormente, analisados os teores de nitrogênio, energia bruta, matéria seca para cálculo da energia metabolizável verdadeira corrigida pelo balanço de nitrogênio (EMVn), de acordo com SAKOMURA & ROSTAGNO (2007).

Ensaio com pintos

Foram utilizados pintos de corte machos da linhagem Cobb® com sete dias de idade, distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado, com sete tratamentos, cinco repetições de 8 aves cada, alojadas em baterias de metabolismo. No início do experimento, as aves foram pesadas individualmente e distribuídas de modo que as parcelas apresentassem peso médio semelhante ($138,77 \pm 0,51$ g).

Ao milho avaliado, foram adicionados fosfato bicálcico (1,20%), calcário (1,18%), sal (0,405%), coccidiostático (0,05%), suplemento vitamínico (0,10%) e mineral (0,05%), de forma a proporcionar níveis mínimos de fósforo disponível (0,300%), cálcio (0,780%) e sódio (0,180%), bem como fornecimento adequado de vitaminas e minerais. O milho foi a única fonte de energia com substrato específico para ação das enzimas. As enzimas avaliadas foram adquiridas através da Danisco Animal Nutrition e foram adicionadas ao milho nas seguintes proporções:

T1: Sem adição de enzima;

T2: Com amilase (500g/ton);

T3: Com xilanase (500g/ton);

T4: Com fitase (100g/ton);

T5: Com XAP (xilanase, amilase e protease - 500g/ton);

T6: Com XAP (500g/ton)+ fitase (100g/ton)

T7: Com XPBG (xilanase, pectinase e β -gucanase , 500g/ton).

O método utilizado foi o de coleta total de excretas. As dietas foram fornecidas à vontade, durante oito dias (7 a 14 dias de idade), sendo quatro dias para adaptação das aves e quatro para coleta de excretas. As rações foram pesadas no início do

experimento e as sobras no final do período de coleta, para determinação dos consumos das dietas.

As excretas foram coletadas em cada unidade experimental, duas vezes ao dia, acondicionadas em sacos plásticos identificados, pesadas e armazenadas a -5°C até o final do período de coleta. Posteriormente, as amostras foram descongeladas e homogeneizadas, retirando-se amostras de, aproximadamente, 450 g. As excretas foram secas em estufa com ventilação forçada a 55°C, durante 76 horas e, posteriormente, realizadas as análises laboratoriais.

As amostras dos dois ensaios foram moídas em micromoinho eletrônico (IKA A11 BASIC). Posteriormente, foram determinados os teores de matéria seca, energia bruta e nitrogênio das dietas e das excretas.

A matéria seca (secagem definitiva) e a proteína bruta foram determinadas segundo SILVA & QUEIROZ (2002). Para a determinação da energia bruta, as amostras foram peletizadas e submetidas à combustão em bomba calorimétrica (1281, PARR, Instruments, EUA).

A determinação das energias metabolizáveis verdadeira (EMV) e aparente corrigida pelo balanço de nitrogênio (EMAn) e coeficientes de digestibilidade da matéria seca (CDMS) foram realizadas conforme descrito por SAKOMURA & ROSTAGNO (2007).

Os dados foram submetidos à avaliação de homogeneidade e normalidade, removidos os *outliers* identificados e em seguida submetidos à análise de variância pelo procedimento GLM do SAS, utilizando o teste de Duncan ao nível de significância de 10%.

Resultados

Ensaio com galos

Os resultados da energia metabolizável verdadeira (EMVn) do farelo de soja e do milho são apresentados na Tabela 1. Não houve efeito ($P>0,05$) da adição das enzimas sobre a EMVn do farelo de soja. Para o milho foi observado aumento significativo de 95kcal/kg na EMVn com a adição da fitase em relação ao milho sem suplementação. As

adições do XAP (amilase, protease e xilanase) e xilanase não proporcionaram diferenças significativas em relação à EMVn do milho sem adição de enzimas.

Tabela 1. Análise de variância para energia metabolizável verdadeira (EMVn) do farelo de soja e do milho com adição de enzimas (valores médios $\pm$ desvio padrão).

Tratamentos	Energia metabolizável verdadeira (kcal/kg de MS)	
	Farelo de Soja	Milho
Ingrediente	3151 $\pm$ 96	4011 $\pm$ 25 BC
Ingrediente + XAP ¹	3186 $\pm$ 89	4055 $\pm$ 32 AB
Ingrediente + xilanase	3011 $\pm$ 159	3950 $\pm$ 75 C
Ingrediente + fitase	3141 $\pm$ 102	4106 $\pm$ 56 A
Probabilidade ²	0,2053	0,0044
CV (%)	3,67	1,23

¹Complexo xilanase, amilase e protease; Médias com as mesmas letras nas colunas não diferem pelo teste de Duncan² (P>0,10)

Ensaio com pintos

Os resultados de energia metabolizável aparente (EMAn) e dos coeficientes de digestibilidade da matéria seca (CDMS) estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Análise de variância para energia metabolizável aparente (EMAn) e coeficiente de digestibilidade da matéria seca (CDMS) do milho com adição de enzimas (valores médios $\pm$ desvio padrão).

Tratamentos	EMAn (kcal/kg de MS)	CDMS (%)
Milho	3504 $\pm$ 55 B	77,86 $\pm$ 0,81 B
Milho + amilase	3548 $\pm$ 17 A	78,89 $\pm$ 0,38 A
Milho + xilanase	3557 $\pm$ 43 A	78,98 $\pm$ 0,85 A
Milho + fitase	3557 $\pm$ 21 A	79,06 $\pm$ 0,51 A
Milho + XAP ¹	3562 $\pm$ 36 A	79,67 $\pm$ 1,31 A
Milho + XAP + fitase	3578 $\pm$ 31 A	79,54 $\pm$ 0,56 A
Milho + XPBG ²	3534 $\pm$ 27 AB	78,81 $\pm$ 0,53 A
Probabilidade ³	0,080	0,023
CV (%)	0,999	0,905

¹Complexo xilanase, amilase e protease; ²Complexo xilanase, pectinase e β -glucanase
Médias com as mesmas letras nas colunas não diferem pelo teste de Duncan³ (P>0,10)

A adição de todas as enzimas promoveu melhoria ($P<0,05$) no coeficiente de digestibilidade da matéria seca, indicando melhor aproveitamento dos nutrientes pelas aves. Para EMAn, a adição da combinação entre XAP+fitase, XAP, fitase, xilanase e amilase promoveram melhoria ($P<0,10$) de 2,11%; 1,66%; 1,51%; 1,51% e 1,26% na EMAn do milho, o que representaram incrementos 74, 58, 53, 53 e 44 kcal/kg, respectivamente. A adição de XPBG melhorou em 0,86% a EMAn do milho (30kcal/kg), porém não diferiu estatisticamente do milho sem suplementação e das demais dietas com suplementação.

Discussão

A ação da fitase em melhorar a disponibilidade de energia dos alimentos ou dietas vem sendo demonstrada em vários estudos (KORNEGAY, 2001; SANTOS, 2005; COWIESON & ADEOLA, 2005; BARBOSA, 2006; OLUKOSI et al., 2007). Esta enzima atua sobre a molécula de fitato, o qual pode estar complexado a cátions, carboidratos, enzimas e aminoácidos, podendo ainda inibir a atividade de várias enzimas digestórias, como a pepsina, a-amilase e a tripsina, principalmente devido à quelação do fitato com íons de cálcio (Ca^{++}), que são essenciais para atividade destas enzimas (LIMA, 2005).

A atuação da fitase sobre o fitato pode liberar amido, enzimas, cofatores de enzimas, proteínas e minerais, que serão melhor digeridos e absorvidos pelas aves, promovendo, conseqüentemente, melhoria no aproveitamento da energia pela ave.

A melhoria da energia metabolizável verdadeira (EMVn) pela adição de fitase foi observada apenas para o milho. MANAGI & COON (2006), trabalhando com dietas semi-purificadas, tendo o farelo de soja como único alimento de origem vegetal, também não verificaram diferenças significativas na retenção de energia com a adição de enzima fitase.

OLUKOSI et al. (2007) contataram que o efeito da fitase sobre a disponibilidade de energia pode não ser muito evidenciado, quando a energia metabolizável é limitante na dieta. COWIESON et al. (2006c) relataram que a adição de fitase na ausência de substrato provocou redução da digestibilidade da matéria seca e do nitrogênio, provavelmente por estimular as perdas endógenas e aumentar o catabolismo de nitrogênio.

A adição do complexo xilanase, amilase e protease (XAP) promoveu incremento de 1,1% na EMV do milho, porém não foi suficiente para promover melhorias significativas. Entretanto, no ensaio com pintos, houve melhoria na EMA com adição do deste complexo enzimático. OLUKOSI et al. (2007) relataram que a deficiência em fósforo pode limitar a utilização da energia com adição de carboidrases (xilanase). Apesar de não ter sido suplementado fosfato bicálcico no ensaio com galos (EMVn), e de ocorrer a suplementação no ensaio com pintos, as diferenças entre as respostas para os dois ensaios pode estar relacionada à metodologia empregada e à fisiologia destas aves, pois as aves mais jovens tem os sistema enzimático ainda imaturo, e com a adição de enzimas exógenas podem aproveitar melhor os nutrientes, resultando em menor gasto energético para ativar as enzimas endógenas, e com isso melhora a energia metabolizável do ingrediente.

COWIESON et al. (2006b) relataram que quando se utiliza o método de alimentação forçada, é comum não encontrar respostas ou até mesmo encontrar redução na digestibilidade aparente dos nutrientes com adição de carboidrases. VAHJEN et al. (2005) verificaram que o efeito adverso da hidrólise dos polissacarídeos não amiláceos (PNAs) da soja está relacionado com a liberação de alguns oligossacarídeos que podem ser fermentados e, desta forma, aumentam a pressão osmótica intestinal, afetando a absorção de nutrientes.

Conforme os resultados obtidos no ensaio de coleta total com pintos, a adição de enzimas aumentou significativamente a EMA do milho. Relativamente o melhor incremento (2,11%) foi obtido com a combinação de XAP e fitase, o que pode ser explicado pela liberação de nutrientes encapsulados na parede celular, pela ação da xilanase, e conseqüentemente, melhor aproveitamento dos componentes liberados devido à ação da fitase, amilase e protease. De acordo com OLUKOSI et al. (2007), as glicosidases são capazes de degradar a camada de polissacarídeos não amiláceos (PNA) da membrana, facilitando o acesso da fitase ao fitato armazenado na membrana da parede celular. Porém, quando a fitase é usada sozinha, a habilidade da enzima torna-se limitada por falta de acesso ao seu substrato que está dentro da matriz de PNAs. Adicionalmente, alguma ligação fibra solúvel-fósforo pode ser hidrolisada pelas

glicosidasas (xilanase), podendo liberar este mineral para ser aproveitado pelo animal e, conseqüentemente, melhorar seu metabolismo energético.

Em outros trabalhos foram comprovadas melhorias na digestibilidade dos nutrientes e no desempenho de frangos com a combinação de XAP + fitase, (COWIESON & ADEOLA, 2005; BARBOSA, 2006; OLUKOSI et al., 2007).

O uso de xilanase pode apresentar efeitos benéficos por promover mudanças na arquitetura de parede celular através da hidrólise das arabinoxilanas estruturais que encapsularam os nutrientes e, dessa forma, estes poderiam ser melhor utilizados (SHEPPY, 2001; GRACIA et al., 2003; YU & CHUNG, 2004; HRUBY & PIERSON, 2005; LIMA, 2005; OLUKOSI et al., 2007). COWIESON (2005) ressalta que o efeito da xilanase pode ser melhor evidenciado quando em associação com outras enzimas exógenas como protease, amilases ou fitase.

A adição de amilase nas dietas ajuda na hidrólise da amilose e amilopectina do amido, facilitando a digestão no intestino delgado e conduzindo ao aumento na utilização dos nutrientes, com conseqüente melhoria na taxas de crescimento (SHEPPY, 2001), pois atua de modo a suplementar a atividade da amilase endógena, podendo reduzir a síntese endógena desta enzima pelo pâncreas (GRACIA et al., 2003), economizando energia, que se torna mais disponível para o crescimento.

A ausência de resposta significativa à adição do complexo xilanase, pectinase e β -glucanase, pode estar relacionada com a baixa disponibilidade de substrato para sua atuação, pois o milho possui baixa quantidade de pectinas (MALATHI & DEVEGOWDA, 2001) e os valores de β -glucanos no milho não são relatados ou são desprezíveis (KNUDSEN, 1997; CHOCT, 2006).

COWIESON et al. (2006b) verificaram aumento da excreção de matéria seca, nitrogênio, energia e aminoácidos, com a adição de pectinases, o que pode ter sido decorrente do ataque bacteriano aos oligossacarídeos hidrolisados. KOCHER et al. (2003) encontraram redução da energia metabolizável da dieta com a adição de β -glucanase, hemicelulase e pectinase e associaram este efeito à liberação da proteína ligada à parede celular degradada, provocando aumento no *turnover* protéico total, e, em função disso, maior gasto energético.

Neste estudo, pode-se observar que os valores obtidos para a energia do milho foram diferentes, e isso pode estar relacionado com as técnicas e idade dos animais utilizados. As técnicas para a determinação da energia metabolizável têm sofrido modificações ao longo do tempo (AVILA et al., 2006). Os métodos utilizados para determinar a energia metabolizável dos alimentos em aves geralmente são os de coleta total de excreta e de alimentação forçada, e cada um possui vantagens e desvantagens (SAKOMURA & ROSTAGNO, 2007).

O método de coleta total de excreta ou método tradicional pode ser realizado com frangos ou com galos e geralmente é necessário que o ingrediente ou alimento a ser avaliado substitua parte de uma ração referência, assumindo-se que os valores de energia metabolizável são aditivos. A principal vantagem desse método é que as condições de alimentação, ingestão de alimento e estado fisiológico para a digestão são similares aos das aves em condições normais de alimentação, não sendo essencial a mensuração das perdas de energia endógena (FREITAS, 2003; SAKOMURA & ROSTAGNO, 2007). As desvantagens do método são o desperdício de dieta, que acaba sendo quantificada sem estar sendo ingerida pelas aves, e a contaminação das excretas por alimento e penas, o que pode provocar aumento na energia bruta da excreta (ADEOLA et al., 1997).

O método de alimentação precisa ou forçada tem a vantagem de ser uma técnica de fácil e rápida execução, necessitando apenas de pequena quantidade de ingrediente. Porém é necessária a avaliação das perdas endógenas para determinação da energia metabolizável verdadeira (SIBBALD, 1976).

Por definição, o sistema de alimentação precisa gera valores de energia metabolizável maiores em relação ao sistema de coleta de excretas, mesmo quando são utilizados frangos de corte na mesma idade. Isso ocorre devido às correções realizadas para compensar as perdas de energia dos componentes metabólicos e endógenos durante o ensaio com alimentação forçada, enquanto, no ensaio com alimentação à vontade, essa correção não é essencial, uma vez que as aves estão em estado fisiológico normal para a digestão (FREITAS, 2003; SAKOMURA & ROSTAGNO, 2007). Além disso, deve-se considerar que a utilização de aves jovens no método de coleta total também promove valores de energia metabolizável menores,

pois as aves mais jovens possuem menores capacidades de digestão e absorção dos nutrientes, visto que o sistema digestório encontra-se ainda em desenvolvimento (BRUMANO et al., 2006).

Em face das dificuldades em isolar os efeitos das enzimas, especificamente sobre os ingredientes, milho ou farelo de soja, os métodos usados no presente trabalho proporcionaram resultados que podem contribuir para definição de uma matriz nutricional para estes ingredientes com a utilização de enzimas exógenas. De forma que, a escolha de um método deve basear-se na finalidade das enzimas e nas necessidades das aves à estas, pois animais jovens possuem sistema digestório e necessidades diferentes dos animais adultos, e com isso, a utilização das enzimas adicionadas, também pode ser diferenciada. De forma que, as técnicas utilizadas neste estudo podem ser aplicadas para avaliar o incremento na energia metabolizável através da adição de enzimas.

Conclusões

A adição de fitase, xilanase, amilase e protease foram eficientes em melhorar a energia metabolizável do milho. Não foi evidenciado incremento na energia metabolizável do farelo de soja com a adição de enzimas.

Referências

- ADEOLA, O.; RAGLAND, D.; KING, D. Feeding and excreta collection techniques in metabolizable energy assays for ducks. **Poultry Science**, Savoy, v.76, n. 5, p. 728–732,1997.
- AVILA, V. S. et al. Determinação do período de coleta total de excretas para estimativa dos valores de energia metabolizável em frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 35, n. 5, p. 1966-1970, 2006.
- BARBOSA, N. A. **A Avaliação de enzimas exógenas nas dietas a base de milho e soja sobre o desempenho e a digestibilidade ileal de nutrientes em frangos de corte**. 2006. 59 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

BEDFORD, M. R. The foundation of conducting feed enzyme research and the challenge of explaining the results. **Journal Applied Poultry Research**, Savoy, v. 11, n. 4, p. 464–470, 2002.

BRITO, C. O. et al. Adição de complexo multienzimático em dietas à base de soja extrusada: valores energéticos e digestibilidade de nutrientes em pintos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.35, n. 3, p.1047-1055, 2006.

BRUMANO, G. et al. Composição química e valores de energia metabolizável de alimentos protéicos determinados com frangos de corte em diferentes idades. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 35, n. 6, p. 2297-2302, 2006.

CHOCT, M. Enzymes for the feed industry: past, present and future. **World's Poultry Science Journal**, Beekbergen, v. 62, n. 2, p. 5-15, 2006.

COWIESON, A. J. Factors that affect the nutritional value of maize for broilers. **Animal Feed Science and Technology**, Davis, n. 3-4, v. 119, n. p. 293–305, 2005.

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

COWIESON, A. J.; ACAMOVIC, T.; BEDFORD, M. R. Using the precision-feeding bioassay to determine the efficacy of exogenous enzymes – A new perspective. **Animal Feed Science and Technology**, Davis, v. 129, n. 1-2, p. 149-158, 2006b.

COWIESON, A. J.; ACAMOVIC, T.; BEDFORD, M. R. Phytic acid and phytase: implications for protein utilization by poultry. **Poultry Science**, Savoy, v. 85, n.5, p.878–885, 2006c.

DOUGLAS, M.W.; PARSONS, C.M. BEDFORD, M.R. Effect of various soybean meal sources and Avizyme on chick growth performance and ileal digestible energy. **Journal Applied Poultry Research**, Savoy, v.9, n. 1, p.74-80, 2000.

FREITAS, E. R. **Avaliação nutricional de alguns alimentos processados para aves por diferentes metodologias e suas aplicações na formulação de rações para frangos de corte**. 2003. 129 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Ciência Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

GRACIA, M. I.; ARANÍBAR, M. J.; LÁZARO, R. α -Amylase supplementation of broiler diets based on corn. **Poultry Science**, Savoy, v. 82, n. 3, p. 436–442, 2003.

HRUBY, M.; PIERSON, E. E. M. The use of enzymes in broiler nutrition. In: Fórum Internacional de Avicultura, 1., 2005, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu: Editora Animalworld, 2005. p. 142-147.

KNUDSEN, K. E. B. Carbohydrate and lignin contents of plant materials used in animal feeding. **Animal Feed Science Technology**, Davis, v. 67, n. 4, p. 319-338, 1997.

KOCHER, A. et al. Effects of enzyme combinations on apparent metabolizable energy of corn-soybean meal-based diets in broilers. **Journal Applied Poultry Research**, Savoy, v.12, n. 3, p.275-283, 2003.

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. **Enzymes in farm nutrition**. Londres: Cab International, 2001. p. 237-271.

LIMA, F. R. Aditivos zootécnicos: enzimas. In: PALERMO NETO, J.; SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. I. **Farmacologia aplicada à avicultura**. São Paulo: ROCA, 2005. p. 239-248.

MALATHI,V.; DEVEGOWDA, G. *In Vitro* evaluation of nonstarch polysaccharide digestibility of feed ingredients by enzymes. **Poultry Science**, Savoy, v. 80, n. 3, p.302-305, 2001.

MANAGI, M. K.; COON, C. N. Evaluation of phytase with chicks fed basal diets contain different soybean meal samples. **Journal Applied Poultry Research**, Savoy, v. 15, n. 2, p. 292-306, 2006.

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

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

SANTOS, F.R. **Efeito da suplementação com fitase sobre o desempenho e digestibilidade de nutrientes para frangos de corte**. 2005. 99 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005.

SHEPPY, C. The current feed enzyme market and likely trends. In: BEDFORD, M. R.; PARTRIDGE, G. G. **Enzymes in farm nutrition**. Londres: Cab International, 2001. p. 1-10.

SIBBALD, I. R. A bioassay for true metabolizable energy in feedingstuffs. **Poultry Science** , Savoy, v. 55, n. 2, p. 303-308, 1976.

SILVA, D. J. QUEIROZ, A. C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3. ed. Viçosa:UFV, 2002. 235p.

VAHJEN, W.; BUSCH, T.; SIMON, O. Study on the use of soya bean polysaccharide degrading enzymes in broiler nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, Davis, v. 120, n. 3-4, p. 259–276, 2005.

YU, B.; CHUNG, T. K. Effects of multiple-enzyme mixtures on growth performance of broilers fed corn-soybean meal diets. **Journal Applied Poultry Research**, Savoy, v. 13, n. 2, p.178–182, 2004.

ZANELLA, I. et al. Effect of enzyme supplementation of broiler diets based on corn and soybeans. **Poultry Science**, Savoy, v. 78, n. 4, p.561–568, 1999.

CAPÍTULO 3. COMPLEXO ENZIMÁTICO EM DIETAS COM REDUÇÃO NA ENERGIA METABOLIZÁVEL PARA FRANGOS DE CORTE

RESUMO: O experimento foi conduzido para avaliar o efeito do tipo de secagem do milho e a eficiência de utilização de enzimas em dietas formuladas com redução na energia metabolizável sobre o desempenho e digestibilidade dos nutrientes para frangos de corte. Foram utilizados pintos de corte, machos, Cobb[®], distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial, com seis tratamentos, seis repetições de 35 aves cada. Os tratamentos em esquema fatorial 2x3 foram estabelecidos por dois tipos de milho (seco no campo e em forno industrial) e três tipos de formulação das dietas (controle positivo - sem redução na energia metabolizável (CP), controle negativo (CN) – com redução de 125kcal de energia metabolizável e uma dieta CN com suplementação de 200g/ton do complexo amilase, xilanase e protease (XAP). A redução da energia nas dietas CN promoveu aumento no consumo de ração e pior conversão alimentar, não sendo observadas diferenças significativas sobre o ganho de peso de 1 a 21 dias de idade, nem diferenças entre os tipos de milho. Aos 42 dias de idade, as aves que consumiram dietas com milho seco artificialmente tiveram melhor ganho de peso, e as aves do controle positivo, melhor conversão alimentar. Houve interação significativa (dieta x milho) para a digestibilidade da matéria seca e energia digestível. Houve efeito da dieta para a digestibilidade de minerais. De forma geral, a suplementação com XAP melhorou a digestibilidade de alguns nutrientes, entretanto essa melhoria não se refletiu sobre o desempenho.

Palavras-chave: amilase, milho, protease, xilanase,

ENZYME BLEND IN DIETS WITH METABOLIZABLE ENERGY REDUCTION

SUMMARY: The trial was conducted to study the effect of dry corn type and enzyme efficiency in diets with nutrient reductions on performance and nutrient digestibility for broilers. A male broiler chicks (Cobb) were allocated in 36 pens of 35 chicks each. The experimental design was a completely randomized with factorial arrangement 2x3, two corns (field and oven dried corn) and five formulated type diets: one positive control-without metabolizable energy reduction (PC), one negative control - with nutrient reduction (NC) and enzyme blend of xylanase, amylase and protease (XAP) supplementation for NC (200g/ton). Six replicates were used for each treatment. The nutrients reduction in diets increase a feed intake and feed conversion of birds, but the birds' body weight gain was similar for all treatments of the 1 to 21 day of age. The birds feed oven dried corn showed higher feed intake and body weight gain at the end of trial. There were significative interaction on dry matter digestibility coefficient and apparent digestible energy. It was an effect of enzyme addition and corn type in digestibility coefficient of minerals. The birds fed oven dried corn showed better digestibility results in all evaluated variables. In conclusion, the some nutrient digestibility showed the positive effect with enzyme addition on NC. However no improvement on performance was observed.

Key Words: amylase, corn, protease, xylanase

Introdução

Na produção de aves, a qualidade nutricional da dieta tem sido fator de grande importância para o aproveitamento dos nutrientes pelos animais, afetando, consequentemente, o desempenho e o retorno econômico para o produtor. Neste sentido, o uso de aditivos, como as enzimas, tem sido imprescindível para melhorar o aproveitamento dos nutrientes das dietas.

Apesar da constante busca por alimentos alternativos, o milho é um ingrediente tradicional nas formulações de rações. Assim, o conhecimento de sua composição química e valor nutricional tornam-se importante, uma vez que a diferença de uma partida de cereal depende não apenas da sua variedade e das condições em que foi plantado, mas também das condições a que foi submetido antes e durante o processo de fabricação das rações (CARVALHO, 2002).

A umidade dos grãos de milho pode afetar seu valor nutricional, estimulando a proliferação de fungos e aparecimento de micotoxicoses nos animais, prejudicando assim o desempenho. LESSON et al. (1993), avaliando diferentes amostras de milho, verificaram redução nos valores de energia metabolizável (EMA) em, aproximadamente, 12 kcal/kg para cada 1% de aumento no teor de umidade do grão. Além disso, constataram variações na digestibilidade da lisina de 32 a 108%, justificando essa variação devido a alterações na temperatura de secagem dos milhos.

A secagem do milho visa basicamente reduzir a umidade dos grãos, de forma que alguns produtores preferem deixar o milho secando no campo, para economizar os custos com a secagem industrial. Entretanto isso pode aumentar o ataque de insetos e a contaminação por micotoxinas (LIMA, 2002), o que afeta a qualidade nutricional e o aproveitamento dos nutrientes pelas aves (STRINGHINI et al., 2000). A secagem em silos industriais depende do controle rígido da temperatura e do tempo de secagem, bem como do teor de umidade dos grãos no momento da colheita.

Na alimentação de aves, há evidências de que a temperatura de secagem do milho afeta a composição e a disponibilidade de nutrientes, alterando, consequentemente, o desempenho dos animais (CARVALHO, 2002; MAZZUCO et al., 2002). IJI et al. (2003), relataram que a composição em carboidratos também pode ser

alterada de acordo com a temperatura de secagem, e desta forma, a ação de carboidrases poderia ser diferenciada, considerados as possíveis mudanças na concentração do substrato.

O milho, apesar de possuir baixo conteúdo em fibra quando comparado com outros ingredientes (ROSTAGNO et al., 2005), apresenta, em seus grãos, carboidratos com moléculas de cadeia longa, como celulose e polissacarídeos não amiláceos, que são encontrados principalmente na parede celular, mantidos juntos por uma matriz complexa. A adição de enzimas que degradam polissacarídeos pode liberar o amido encapsulado, por solubilização da parede celular, melhorando o acesso de enzimas digestivas e a disponibilidade dos nutrientes para crescimento das aves (YU & CHUNG, 2004).

Entretanto, o uso de enzimas específicas para PNAs é difícil, primeiramente porque uma dieta de baixo custo contém vários ingredientes com diferentes formas de PNAs, sendo difícil a mensuração dos tipos de substratos e a atividade da enzima sobre os mesmos de forma individual. Assim, são difíceis de prever as respostas para vários tipos de atividades de enzimas acrescentadas à dieta (CHOCT, 2001). Desta forma, alguns autores (PACK et al., 1997; SCHANG & AZCONA, 2003; BARBOSA, 2006) preconizam a suplementação enzimática em dieta com redução dos nutrientes, pois a resposta dos animais poderia ser melhor evidenciada.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da suplementação de um complexo enzimático (xilanase, amilase e protease) em dietas com redução na energia metabolizável, formuladas com milho seco no campo e seco artificialmente, sobre o digestibilidade ileal dos nutrientes e desempenho de frangos de corte.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Setor de Avicultura do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias-FCAV-UNESP/Jaboticabal-SP, no período de 18 de outubro a 28 de novembro de 2005. Foram utilizados pintos de corte machos com um dia de idade da linhagem Cobb®.

Para a formação das unidades experimentais, os pintos foram pesados individualmente e, distribuídos de forma que todas as parcelas apresentassem peso médio semelhante.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial (2x3), sendo dois tipos de secagem do milho (seco naturalmente no campo e seco artificialmente em secadores industriais) e três tipos de formulação das dietas, constituindo seis tratamentos, seis repetições com 35 aves cada.

Os tratamentos experimentais consistiram em avaliar a suplementação de um complexo de xilanase, amilase e protease (XAP) em dieta com redução nos níveis de EMA (controle negativo), comparadas a uma dieta formulada com níveis adequados de nutrientes (controle positivo). Os tratamentos foram:

T1- Controle Positivo (CP) – Milho seco no Campo;

T2- Controle Negativo (CN) - Milho seco no Campo (redução de 125kcal de EMA);

T3- Dieta T2 com suplementação do complexo XAP (200g/t);

T4- Controle Positivo (CP) - Milho seco artificialmente;

T5- Controle Negativo (CN)- Milho seco artificialmente (redução de 125kcal de EMA);

T6- Dieta T5 com suplementação do complexo XAP (200g/t);

As dietas foram formuladas com milho e farelo de soja, de acordo com as exigências nutricionais para cada fase. A composição centesimal e os níveis calculados dos nutrientes das dietas experimentais para a fase inicial (1 a 21) e de crescimento (22 a 42 dias de idade) estão apresentados na Tabela 1.

O milho seco naturalmente foi colhido quando apresentava umidade média de 14%, oriundo da UNESP-Campus de Jaboticabal. O milho seco artificialmente foi obtido da Cooperativa de produtores de Guaíra-SP, que recebe partidas de milho com umidade variando entre 13 e 18%, os quais são submetidos a um processo de secagem em um secador contra-corrente vertical, à temperatura de 110°C, sendo retirados quando atingiam 13% de umidade.

Tabela 1. Composição centesimal e níveis calculados dos nutrientes das dietas controle positivo (CP) e controle negativo (CN) para as fases inicial (1 a 21 dias de idade) e de crescimento (22 a 42 dias de idade) de frangos de corte.

Ingredientes (%)	Inicial		Crescimento	
	CP	CN	CP	CN
Milho	55,067	58,071	59,866	62,871
Farelo de Soja	38,532	37,948	30,833	30,250
Óleo de Soja	3,179	0,752	5,284	2,857
Sal	0,277	0,276	0,330	0,329
DL-Metionina 99	0,249	0,246	0,199	0,195
L-Lisine HCl	0,091	0,102	0,221	0,232
Calcário Calcítico	1,047	1,054	0,913	0,920
Fosfato Bicálcico	1,258	1,251	1,154	1,147
Suplemento Vitamínico^{1,2}	0,100 ¹	0,100 ¹	0,100 ²	0,100 ²
Suplemento Mineral³	0,050	0,050	0,050	0,050
Bicarbonato de sódio	0,100	0,100	-	-
Coccidiostático⁴	0,050	0,050	0,050	0,050
Celite⁵	-	-	1,000	1,000
Composição nutricional				
EMA (kcal/kg)	3025	2900	3200	3075
PB (%)	22,50	22,50	19,50	19,50
Cálcio (%)	0,850	0,850	0,750	0,750
Fósforo disponível (%)	0,350	0,350	0,320	0,320
Metionina (%)	0,591	0,589	0,499	0,497
Metionina + cistina (%)	0,940	0,940	0,810	0,810
Lisina (%)	1,280	1,280	1,180	1,180
Arginina (%)	1,503	1,496	1,266	1,259
Treonina (%)	0,868	0,867	0,746	0,746
Triptofano (%)	0,283	0,282	0,236	0,234
Sódio (%)	0,180	0,180	0,170	0,170

1 Ácido fólico, 1000mg; ácido pantotênico, 15000mg; antioxidante, 0,5g; niacina, 40000mg; selênio, 300mg; biotina, 60mg; vit. B1, 1800 mg; vit. B12, 12000mg; vit. B2, 6000 mg; vit. B6, 2800 mg; vit. D3, 2000000 UI; vit. E, 15000mg; vit. K3, 1800 mg; Adição 1kg/t na fase inicial.

2 Ácido Fólico, 700mg; ácido pantotênico, 13000mg; antioxidante, 0,5g; niacina, 35000mg; selênio, 300mg; vit. B1, 1600 mg; vit. B12, 10000mg; vit. B2, 5000 mg; vit. B6, 2600 mg; vit. D3, 1500000 UI; vit. E, 12000mg; vit. K3, 1500 mg; Adição 1kg/t na fase de crescimento.

3 Mn, 150.000mg; Zn, 100.000 mg; Fe, 100.000 mg; Cu, 16.000 mg; I, 1.500 mg. Adição 0,5kg/t

4 Monensina Sódica;

5 Indicador;

A composição bromatológica dos ingredientes utilizados na formulação de rações está apresentadas na Tabela 2. O complexo enzimático avaliado neste ensaio é um produto comercial, com características descritas na Tabela 3.

As aves foram alojadas em galpão subdividido em boxes. Cada boxe possuía área total de 4,95 m², equipado com bebedouro de alumínio tipo copo, comedouro tubular infantil e fonte de aquecimento (lâmpadas infravermelho de 200 watts). Após o 7º dia de idade, os bebedouros e comedouros iniciais foram substituídos por bebedouros pendulares e comedouros tubulares com capacidade para 25 kg e o aquecimento estabelecido de acordo com o manual da linhagem e necessidade dos animais.

Os pintos foram vacinados no incubatório contra as doenças de Marek e Bouda aviária. No 7º dia de idade, foi realizada vacinação para doença de Gumboro (cepa intermediária) via ocular e, no 14º dia de idade, contra as doenças de Newcastle e Gumboro (cepa forte) via água de bebida.

As temperaturas e umidades relativas máximas e mínimas foram registradas diariamente, utilizando-se termohigrômetros digitais distribuídos em dois pontos do galpão. Os valores registrados estão apresentados na Tabela 4. O programa de luz adotado foi o de 23 horas de luz e uma de escuro. Água e ração foram fornecidos *Ad libitum* durante todo o experimento.

Tabela 2. Composição química dos ingredientes.

Ingredientes Composição (%)	Milho Seco		Farelo de soja
	No campo	Artificialmente	
Matéria Seca (MS)	84,8	86,5	88,0
Proteína Bruta	8,90	9,15	44,97
Gordura	4,05	5,49	1,47
FDN	10,78	16,83	11,94
FDA	1,72	2,47	6,20
Celulose	1,41	1,81	5,59
Hemicelulose	9,06	14,36	5,74
Lignina	0,31	0,66	0,61

Tabela 3. Características das enzimas do complexo enzimático

Enzima	Xilanase	Amilase	Protease
Origem ¹	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
Unidades/kg de dieta ²	300	400	4000
Dosagem	200 g/ton		

¹As enzimas são produzidas por linhagens geneticamente modificadas dos microrganismos citados.

²Níveis mínimos garantidos pelo fabricante do produto. As enzimas foram adquiridas através da Danisco Animal Nutrition

Tabela 4. Temperaturas e umidades máximas e mínimas durante o período experimental

Idade (Semanas)	Temperaturas (°C)		Umidade (%)	
	Máxima	Mínima	Máxima	Mínima
1	29,42	24,73	49,75	34,56
2	29,28	23,47	63,64	32,50
3	31,56	22,35	72,0	36,84
4	32,22	21,64	70,73	36,75
5	33,92	22,72	77,10	28,78
6	36,07	22,68	81,62	32,75
Média	32,08	22,93	69,14	33,70

Aos 21 e 42 dias de idade, as aves e as rações foram pesadas para determinação das características de desempenho: ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar.

Ao final do experimento, todas as aves foram pesadas individualmente para determinar a percentagem de uniformidade em cada tratamento. Foram consideradas uniformes as aves cujo peso corporal encontrou-se na faixa de 10% acima ou abaixo do peso médio obtido para cada parcela.

Aos 35 dias, foi adicionado 1% de Celite[®], uma fonte de sílica, a todas as dietas experimentais como indicador indigestível. A digestibilidade dos nutrientes e energia digestível foi determinada utilizando-se o método de coleta parcial ileal.

Aos 43 dias de idade, 15 aves de cada parcela experimental foram abatidas por deslocamento cervical e, imediatamente após o abate, o íleo foi exposto por incisão

abdominal e um segmento de 15 cm terminando a 4 cm da junção íleo-cecal foi removido, para colheita das digestas. Após a colheita, as digestas foram congeladas e posteriormente liofilizadas a temperatura de -40°C , por 72 horas. As amostras liofilizadas foram moídas em micromoinho eletrônico (IKA A11 BASIC). Posteriormente, foram determinados os teores de matéria seca, energia bruta, nitrogênio, cálcio, fósforo e cinza ácida insolúvel das dietas e das digestas.

Uma amostra das dietas e digestas das aves que receberam controle negativo, com e sem enzima, foram enviadas para um Laboratório especializado na Dinamarca, para determinação da atividade da xilanase, conforme adaptação da metodologia descrita por COWIESON & ADEOLA (2005).

A matéria seca (secagem definitiva) e a proteína bruta, foram determinadas segundo SILVA & QUEIROZ (2002). Para a determinação da energia bruta, as amostras foram peletizadas e submetidas à combustão em bomba calorimétrica (1281, PARR, Instruments, EUA). O cálcio e fósforo foram determinados de acordo com NOGUEIRA & SOUZA (2005).

A cinza ácida insolúvel (CAI), fração indigerível presente nas dietas e digestas, foi determinada através de uma adaptação da metodologia de VAN KEULEN & YOUNG (1977) descrita por SANTOS (2005).

Com os resultados laboratoriais, foram determinados os coeficientes de digestibilidade (CD) da matéria seca, proteína bruta e minerais e os valores de energia digestível (ED), calculados com base na análise das dietas e digesta ileal, de acordo com fórmulas descritas por SAKOMURA & ROSTAGNO (2007).

Os dados foram submetidos à avaliação de homogeneidade e normalidade, removidos os *outliers* identificados e, em seguida, submetidos à análise de variância pelo procedimento GLM do SAS, utilizando o teste de Duncan a um nível de significância de 5%.

Resultados

Os resultados para as características de desempenho nas fases inicial (1 a 21 dias) e total (1 a 42 dias) estão apresentados na Tabela 5. A mortalidade das aves no

período total de criação foi de 2,85%. De acordo com a análise estatística dos valores obtidos, não houve interação significativa (TFD x TSM) em nenhuma das características ($P>0,05$) nos dois períodos avaliados.

Na fase de 1 a 21 dias, houve efeito significativo ($P<0,05$) para o tipo de dieta. As aves que receberam dieta controle negativo com e sem suplementação enzimática (CN e CN+XAP) apresentaram maior consumo e pior conversão alimentar. Não houve efeito significativo do tipo de milho nesta fase.

No período de 1 a 42 dias de idade, observou-se efeito significativo do tipo de milho apenas sobre o ganho de peso. As aves que consumiram dietas com milho seco artificialmente apresentaram melhor ganho de peso. Observou-se também efeito da dieta nesta fase para a conversão alimentar. As aves que receberam dieta controle negativo com e sem suplementação enzimática (CN e CN+XAP) apresentaram pior conversão alimentar.

Os resultados para as características de digestibilidade ileal estão apresentados na Tabela 6. Através da análise estatística dos valores obtidos, observou-se que houve interação significativa (TFD x TSM) para o coeficiente de digestibilidade da matéria seca (CDMS) e energia digestível na matéria seca e na matéria natural. Houve efeito significativo do tipo de dieta para a digestibilidade do cálcio (CDCa) e do fósforo (CDP).

A suplementação enzimática (CN+XAP) em dietas com milho seco artificialmente promoveu melhores resultados de CDMS, porém as dietas com milho seco naturalmente, não diferiram estatisticamente das dietas controle positivo e controle negativo. As aves que receberam dietas CN e CN+XAP apresentaram melhores CDMS com milho seco artificialmente, e as aves que receberam dietas CP apresentaram CDMS semelhantes entre os tipos de milho.

Tabela 5. Análise de variância consumo de ração (CR), ganho de peso (GP), conversão alimentar (CA) e uniformidade (UNF) de frangos aos 21 e 42 dias, considerando o tipo de formulação da dieta (TFD) e o tipo de secagem do milho (TSM).

Variáveis	Dieta	Secagem do milho		Média	TFD	TSM	TFD * TSM	CV (%)
		Campo	Artificial					
Desempenho 1 a 21 dias de idade					Probabilidade ⁴			
CR (g)	CP ¹	1111,85	1142,12	1126,98 B	0,0006	0,719	0,0989	2,85
	CN ²	1177,43	1188,21	1182,82 A				
	CN + XAP ³	1187,25	1158,20	1172,72 A				
	Média	1158,84	1162,84					
GP (g)	CP	830,60	853,87	842,23	0,2995	0,3506	0,3165	2,78
	CN	826,55	831,85	829,20				
	CN + XAP	833,19	826,63	829,91				
	Média	830,11	837,45					
CA	CP	1,339	1,338	1,339 A	<0,0001	0,5767	0,6289	2,67
	CN	1,424	1,429	1,427 B				
	CN + XAP	1,425	1,402	1,413 B				
	Média	1,396	1,390					
Desempenho 1 a 42 dias de idade					Probabilidade			
CR (kg)	CP	4,373	4,422	4,397	0,0595	0,0632	0,4514	2,93
	CN	4,423	4,586	4,505				
	CN + XAP	4,499	4,539	4,519				
	Média	4,432	4,516					
GP (kg)	CP	2,625	2,656	2,641	0,1418	0,0389	0,6382	3,18
	CN	2,535	2,629	2,582				
	CN + XAP	2,554	2,607	2,580				
	Média	2,571 b	2,631 a					
CA	CP	1,666	1,665	1,674 A	<0,0001	0,5468	0,7372	2,13
	CN	1,746	1,745	1,720 B				
	CN + XAP	1,762	1,741	1,735 B				
	Média	1,725	1,717					
UNF (%)	CP	84,97	81,07	83,02	0,7592	0,5362	0,1005	8,08
	CN	79,22	87,23	83,23				
	CN + XAP	81,35	81,40	81,37				
	Média	81,85	83,24					

¹CP=Dieta controle positivo; ²CN=Dieta controle negativo; ³XAP= Dieta CN com adição de complexo xilanase, amilase, protease; Média com mesmas letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan⁴ (P>0,05)

Tabela 6. Análise de variância do coeficiente de digestibilidade da matéria seca (CDMS), da proteína (CDP), do cálcio (CDCa) e do fósforo (CDF) e sobre a energia digestível (ED), considerando o tipo de formulação da dieta (TFD) e o tipo de secagem do milho (TSM).

Variáveis	Dieta	Secagem do milho		Média	TFD	TSM	TFD * TSM	CV (%)
		Campo	Artificial					
CDMS (%)	CP ¹	68,00 Aa	68,76 Ba					
	CN ²	61,02 Bb	66,22 Ba		<0,0001	<0,0001	0,0042	3,91
	CN+ XAP ³	65,46 ABb	74,47 Aa					
CDP (%)	CP	71,95	73,42	72,68				
	CN	66,89	68,76	67,82	0,1161	0,0770	0,3698	8,19
	CN + XAP	68,09	75,74	71,91				
	Média	68,98	72,64					
ED (kcal/kg)	CP	2810 Aa	2846 ABa		0,0003	<0,0001	0,0011	3,87
	CN	2585 Ba	2680 Ba					
	CN + XAP	2611 Bb	2998 Aa					
CDCa (%)	CP	48,61	46,03	47,32				
	CN	37,93	37,76	37,84	<,0001	0,7364	0,2683	11,22
	CN + XAP	52,71	57,35	55,03				
	Média	46,42	47,05					
CDF (%)	CP	52,87	47,83	50,35				
	CN	42,17	44,48	43,33	0,0011	0,8834	0,2128	12,55
	CN + XAP	51,75	55,41	53,58				
	Média	48,93	49,24					

¹CP=Dieta controle positivo; ²CN=Dieta controle negativo; ³XAP= Dieta CN com adição de complexo xilanase, amilase, protease; Média com mesmas letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan⁴ (P>0,05)

A suplementação enzimática em dietas com milho seco artificialmente promoveu melhores resultados de ED, porém semelhantes às dietas controle positivo. Entretanto, para dietas com milho seco no campo, os valores observados para aves que receberam dieta controle positivo foram superiores ao CN e CN+ XAP. As aves que receberam dietas CN e CP, apresentaram valores de ED semelhantes entre os tipos de milho.

As aves que receberam dieta controle negativo apresentaram piores valores para a digestibilidade do cálcio e fósforo. A suplementação enzimática melhorou a digestibilidade destes nutrientes. Os valores de CDCa foram superiores em relação ao das aves que receberam dietas controle positivo, mas, a suplementação somente restabeleceu os valores CDF em relação aos obtidos com as aves alimentadas com CP.

Discussão

Na fase inicial não foi verificado efeito da suplementação do complexo enzimático sobre o desempenho. Não houve redução significativa no ganho de peso das aves que receberam CN e CN+XAP, porém essas aves consumiram maior quantidade de ração para manter o ganho de peso semelhante ao das aves que receberam dietas controle positivo.

Os resultados indicaram que o processo de secagem do milho afetou o ganho de peso ($P < 0,05$) e a digestibilidade de alguns nutrientes no período total (1 a 42 dias de idade). Isso pode ser explicado pelo fato de que o aquecimento do milho pode alterar a estrutura do amido e, conseqüentemente, o valor energético do alimento (COWIESON, 2005), melhorando sua disponibilidade para as aves realizarem os processos metabólicos e de crescimento.

IJI et al. (2003) avaliando o processo de secagem em milho colhido com 11,5% de umidade, verificaram relativamente que o amido resistente e a fibra bruta foram reduzidos à medida que aumentou a temperatura de secagem do milho acima de 85°C. Estes autores verificaram que a redução no amido resistente foi decorrente do aumento na quantidade de amilopectina e redução na amilose. Estes autores verificaram que o efeito da secagem do milho sobre o desempenho das aves varia com a idade.

Alguns autores relataram que, à medida que aumenta a temperatura de secagem, a qualidade do milho pode ser alterada. CARVALHO (2002) estimou que temperaturas acima de 49°C promovem redução na energia metabolizável do milho, afetando também a disponibilidade de aminoácidos. De acordo com IJI et al. (2003), o efeito da enzima é mais efetivo em milho de baixa qualidade.

No presente estudo, o efeito da secagem só foi verificado aos 42 dias de idade. O melhor ganho de peso observado em dietas com milho seco artificialmente pode ter sido decorrente da melhor composição química deste de acordo com os valores da Tabela 2. Desta forma, as aves alimentadas com esse tipo de milho, tiveram menores perdas quando foi reduzida a energia metabolizável (125kcal) nas dietas CN, apresentando melhores digestibilidade da matéria seca e maior energia digestível, em relação as aves alimentadas com o milho seco naturalmente. Isso, conseqüentemente, melhorou a disponibilidade de nutrientes para aproveitamento pelas aves que

consumiram dietas CN e CN+XAP, reduzindo, conseqüentemente, o gasto energético para realização dos processos metabólicos e promovendo melhor utilização para o ganho de peso. O efeito da suplementação enzimática foi melhor evidenciada em dietas com milho seco artificialmente, pois a suplementação com XAP apenas reestabeleceu os valores de energia digestível semelhantes aos da dietas CP, com esse tipo de milho.

MAZZUCO et al. (2002) não encontraram diferença na energia metabolizável do milho submetido a diferentes temperaturas de secagem. Todavia estes autores observaram que o milho seco no campo apresentou valores de energia metabolizável na matéria natural menor que os que foram submetidos a diferentes temperaturas de secagem. Os autores justificaram que, apesar do milho ter sido colhido com umidade de 14%, o grão sofreu reidratação, atingindo 24% de umidade, provavelmente devido à queima da matéria seca em função da respiração natural do grão durante o período de armazenamento.

Foi observado melhoria na energia digestível com a adição da enzima apenas no milho seco artificialmente, o que pode ter sido influenciado pela atividade da enzima e composição bromatológica deste ingrediente. Na avaliação da atividade de xilanase nas dietas e digestas, verificou-se que as aves que receberam dietas com milho seco artificialmente e complexo XAP, apresentaram maior atividade de xilanase nas dietas (5429 vs 549 U/kg) e digestas (1914 vs 1609 U/kg) em relação ao milho seco no campo com a enzima. Isto poderia justificar o fato da suplementação enzimática promover aumento na energia digestível apenas das dietas com milho seco artificialmente. FONTES et al. (2004) relataram que é possível algumas plantas apresentarem algumas hidrolases em sua parede celular. No presente estudo também foi detectado atividade de xilanase para o milho seco artificialmente (3099 U/kg) e no campo (25 U/kg) sem a adição de enzima. FONTES et al. (2004) também encontraram atividade de xilanase em dietas que não receberam a suplementação enzimática. Em relação a composição bromatológica o milho seco artificialmente apresentou maior porcentagem de hemicelulose (Tabela 2), e de acordo com BHAT & HAZLEWOOD, (2001) estas são compostas por xilanas, glucomananas, galactanas ou arabinanas, indicando que este

tipo de milho pode ter apresentado uma maior proporção de substrato para xilanase (presente no complexo) atuar.

A adição de XAP promoveu melhoria da digestibilidade do cálcio e do fósforo. Considerando que as enzimas são específicas para proteína e carboidratos, esse efeito não era esperado com tanta evidência. OLUKOSI et al. (2007) também observaram melhoria na digestibilidade dos minerais com adição de XAP. IJI et al. (2003) verificaram que as respostas da suplementação sobre a digestibilidade do cálcio e fósforo dependem do tipo de milho, sendo melhor evidenciadas em milho seco a 105°C.

Neste sentido, MOUGHAN et al. (1999) relataram que alguns PNAs em determinadas faixas de pH podem quelatar-se a alguns cátions. Desta forma, pode ocorrer a formação de complexo fibra solúvel-mineral (OLUKOSI et al., 2007).

Com a adição de XAP, a enzima xilanase presente no complexo pode ter aumentado a permeabilidade da membrana da parede celular, liberando minerais encapsulados, ou através de degradação do complexo fibra-mineral, liberando, assim, o cálcio e fósforo para serem absorvidos (OLUKOSI et al., 2007).

Apesar das respostas positivas com a suplementação das enzimas sobre a digestibilidade dos nutrientes, não houve efeito sobre o desempenho. DOUGLAS et al. (2000) e OLUKOSI et al. (2007) também não encontraram respostas positivas sobre o desempenho com a adição de XAP, porém a enzima promoveu melhoria da digestibilidade dos nutrientes. Desta forma, pode-se considerar que fatores externos interferiram na utilização dos nutrientes para ganho de peso.

Observando a Tabela 4, pode-se verificar que as temperaturas no galpão foram elevadas nas últimas semanas do experimento, podendo indicar que as aves sofreram estresse calórico. Este estresse pode ter provocado aumento nas exigências de manutenção (LONGO et al. 2006), e, portanto, a energia digestível pode ter sido desviada para o atendimento das exigências de manutenção ou pode não ter sido metabolizada. OLUKOSI et al. (2007) observaram melhoria na energia digestível com a adição de enzimas, porém a energia metabolizável não foi afetada. YU & CHUNG (2004), trabalhando com adição de diferentes enzimas em dietas com redução da energia metabolizável em duas estações do ano, verificaram que a adição de XAP restabeleceu o desempenho semelhante aos das aves alimentadas com dieta sem redução, apenas

em épocas frias, enquanto, em épocas quentes, as aves têm dificuldade em aproveitar as dietas.

Conclusões

O complexo xilanase, amilase e protease (XAP) foi eficiente em melhorar a digestibilidade de alguns nutrientes, entretanto isso não refletiu melhoria no desempenho.

O milho seco artificialmente apresentou qualidade nutricional superior refletindo em melhor digestibilidade da matéria seca e melhor ganho de peso das aves.

Referências

BARBOSA, N. A. **A Avaliação de enzimas exógenas nas dietas a base de milho e soja sobre o desempenho e a digestibilidade ileal de nutrientes em frangos de corte.** 2006. 59 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

CARVALHO, D. C. O. **Valor nutritivo do milho para aves, submetido a diferentes temperaturas de secagem e tempo de armazenamento.** 2002. 90f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002.

CARVALHO, D. C. O. et al. Composição química e energética de amostras de milho submetidas a diferentes temperaturas de secagem e períodos de armazenamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.33, n. 2, p.358-364, 2004.

CHOCT, M. Carbohydrate and fibre digestion in monogastric animals. **ASA Technical bulletin**, AN34, 2001.

COWIESON, A. J. Factors that affect the nutritional value of maize for broilers. **Animal Feed Science and Technology**, Davis, n. 3-4, v. 119, n. p. 293–305, 2005.

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

DOUGLAS, M.W.; PARSONS, C.M. BEDFORD, M.R. Effect of various soybean meal sources and Avizyme on chick growth performance and ileal digestible energy. **Journal Applied Poultry Research**, Savoy, v.9, n. 1, p.74-80, 2000.

FONTES, C. M. G. A.; PONTE, P. I. P.; REIS, M. C. et al. A family 6 carbohydrate-binding module potentiates the efficiency of recombinant xylanase used to supplement

cereal-based diets for poultry. **British Poultry Science**, Oxfordshire, v. 45, n. 5, p. 648-656, 2004.

IJI, P. A.; KHUMALO, K.; SLIPPERS, S., et al. Intestinal function and body growth of broiler chickens on diets based on maize dried at different temperatures and supplemented with a microbial enzyme. **Reproduction Nutrition Development**, França, v. 43, n.1, p. 77–90, 2003.

LEESON, S.; YERSIN, A.; VOLKER, L. Nutritive value of the 1992 corn crop. **Journal Applied Poultry Research**, Savoy, v.2, n. 3, p.208-213, 1993.

LIMA, G. J. M. M; SOUZA, O. W. Importância da qualidade de grãos na produção de suínos. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE PRODUÇÃO, MERCADO E QUALIDADE DE CARNE DE SUÍNOS - AVESUI. 2002, Florianópolis. **Anais...** Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2002. p. 45-62.

MAZZUCO, H. et al. Composição química e energética do milho com diversos níveis de umidade na colheita e diferentes temperaturas de secagem para frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.31, n. 6, p.2216-2220, 2002.

MOUGHAN, P. J.; ANNISON, G.; RUTHERFURD, S.M.; WISEMAN, J. The Chemical and Physical Description of Feedstuffs. In: KYRIAZAKIS, I. **A Quantitative biology of the pig**. Edinburgh: CAB INTERNATIONAL, 1999. p. 39 -69.

NOGUEIRA, A.R.A.; SOUZA, G.B. **Manual de laboratório: solo, água, nutrição vegetal, nutrição animal e alimentos**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2005. 313p.

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

PACK, M. R. et al. Effects of feed enzymes on ileal digestibility of energy and protein in corn-soybean diets fed to broilers. In: EUROPEAN SYMPOSIUM ON POULTRY NUTRITION, 11., 1997, Faaborg. **Anais...** Faaborg: WPSA, 1997.

ROSTAGNO, H.S. **Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos. Composição de Alimentos e Exigências Nutricionais**. 2.Ed. Viçosa, MG: UFV, 2005. 186 p.

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

SANTOS, F.R. **Efeito da suplementação com fitase sobre o desempenho e digestibilidade de nutrientes para frangos de corte**. 2005. 99 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005.

SCHANG, M. J.; AZCONA, J.O. Natural enzyme applications to optimize animal performance. In: NUTRITIONAL BIOTECHNOLOGY IN THE FEED AND FOOD INDUSTRIES OF ALLTECH ANNUAL MEETING, 19., 2003, Lexington, **Anais...** Lexington: Alltech, 2003. p. 163-170.

SILVA, D. J. QUEIROZ, A. C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3. ed. Viçosa:UFV, 2002. 235p.

STRINGHINI, J. H. et al. Efeito da qualidade do milho no desempenho de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 29, n. 1, p.191-198, 2000.

VAN KEULEN, J.; YOUNG, B. A. Evaluation of acid-insoluble ash as natural marker in ruminant digestibility studies. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 44, n. 2, p.282-287, 1977.

YU, B.; CHUNG, T. K. Effects of multiple-enzyme mixtures on growth performance of broilers fed corn-soybean meal diets. **Journal Applied Poultry Research**, Savoy, v. 13, n. 2, p.178–182, 2004.

CAPÍTULO 4. COMPLEXO ENZIMÁTICO EM DIETAS PARA FRANGOS DE CORTE

RESUMO: O experimento foi conduzido para avaliar a eficiência da utilização de enzimas em dietas formuladas com milho seco naturalmente e artificialmente, sobre o desempenho e digestibilidade dos nutrientes para frangos de corte. Foram utilizados pintos de corte, machos, Cobb, distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial, com 10 tratamentos, seis repetições de 40 aves cada. Os tratamentos em esquema fatorial 2x5 foram estabelecidos por dois tipos de secagem do milho (seco no campo e seco em forno industrial) e cinco tipos de formulação das dietas (um controle positivo (CP) – formulado de acordo com as exigências nutricionais das aves, dois controles negativos (CN1 e CN2) - formulados com reduções nos valores de energia metabolizável da dieta através de predições para a EMA do milho e duas dietas com suplementação de 250g/ton e 500g/ton, do complexo enzimático xilanase, amilase e protease (XAP) sobre os respectivos controles negativos. A redução de energia nas dietas CN promoveu redução no ganho de peso, porém a adição das enzimas nessas dietas recuperou o ganho de peso das aves de 1 a 21 dias de idade. Nesta fase, a conversão alimentar das aves que receberam dietas CP foi melhor que a daquelas que receberam CN. A suplementação de XAP no CN1 (250 g/ton) restabeleceu a conversão alimentar semelhante a das aves que consumiram dietas CP. Não houve efeito dos tratamentos sobre o consumo e ganho de peso das aves de 1 a 42 dias de idade. Nesta fase, a conversão alimentar das aves que consumiram dietas CN1 com ou sem suplementação de enzima foi semelhante ao das aves alimentadas com CP e superior às demais dietas. Não houve efeito das dietas, nem interação entre dietas e milho para a digestibilidade dos nutrientes.

Palavras-chave: amilase, milho, protease, predição da energia, xilanase

ENZYMATIC BLEND IN BROILERS DIETS

SUMMARY: The trial was conducted to evaluate enzyme efficiency in diets formulated with field dried corn and oven dried corn on performance and nutrient digestibility of broilers. The male broiler chicks (Cobb) were distributed in completely randomized experimental design with factorial arrangement 2x5, two dried corn type (Field and Oven dried corn) and five formulated type diets: one Positive control- without nutrient reduction (PC), two Negative controls – formulated with two metabolizable energy of corns (NC1 and NC2) and two levels of xylanase, amylase and protease blend supplementations on the NC1 (250g/t) and NC2 (500g/t) respectively. The reduction of nutrients in the NC diets promoted decrease in body weight gain (BWG), but the enzyme supplementation on these diets recovered the BWG of birds from 1 to 21 days. In this phase, the feed conversion of birds feed with PC diets was better than NC, just the XAP supplementation on NC1 (250 g/ton) promoted similar feed conversion to PC. However, the treatments did not affect feed intake and body weight gain from 1 to 42 days. In this phase, the NC1 with or without enzyme supplementation showed feed conversion similar PC and better than other diets. No effect of the diets and interaction between diet and corn for the nutrients digestibility were observed.

Key words: amylase, corn, energy prediction, protease, xylanase

Introdução

O uso de enzimas na alimentação de aves, visando à redução de alguns fatores anti-nutricionais em dietas de alta viscosidade, vem sendo difundido ao longo do tempo. No entanto, o uso de enzimas em dietas de baixa viscosidade, como as dietas brasileiras, compostas por milho e farelo de soja, só foi iniciado a partir da década de 1990, principalmente com os estudos de RITZ et al. (1995) com perus e de PACK et al. (1997), ZANELLA et al. (1999) e DOUGLAS et al. (2000) com frangos.

As enzimas exógenas podem contribuir para melhoria da disponibilidade dos nutrientes através da redução de fatores anti-nutricionais, como ácido fítico, inibidores de enzimas, lecitinas, proteínas antigênicas (HRUBY & PIERSON, 2005). Para utilização das enzimas é necessário o conhecimento da qualidade dos ingredientes, de forma que o potencial e o retorno econômico possam ser preditos (COWIESON et al., 2006a). Os benefícios econômicos são definidos à medida que o nutricionista escolhe a forma de suplementação enzimática, podendo esta, ser em ração formulada com níveis nutricionais adequados ("Over the top") ou considerando a matriz nutricional da enzima na redução da densidade da ração, ou ainda considerando a matriz nutricional do ingrediente com suplementação da enzima, levando-se em consideração as análises bromatológicas do ingrediente e a predição do incremento nutricional promovido pela adição da mesma.

A maioria das enzimas comercializadas no Brasil são preconizadas para redução de fatores anti-nutricionais da soja (GARCIA et al., 2000; FISHER et al., 2002; STRADA et al., 2005), considerando que a mesma apresenta maior quantidade de polissacarídeos não amiláceos que o milho. Contudo, THORPE & BEAL (2001) relataram que o uso de enzimas exógenas em dietas para animais, deveria basear-se no seu efeito sobre os fatores anti-nutricionais dos cereais, como o milho, pois estes estão em maiores quantidades na dieta. MALATHI & DEVEGOWDA (2001), avaliando a atuação "in vitro" de enzimas exógenas, verificaram que, para dietas com 55% de milho, a adição de xilanases e celulases são mais eficientes e, para o farelo de soja, as pectinases tiveram maior efetividade.

A composição química e o valor nutricional do milho podem ser alteradas dependendo da variedade, condições de crescimento da planta, temperatura de

secagem, estrutura do amido, composição dos grãos (matriz de lipídio/proteína/amido) e da presença de vários fatores anti-nutricionais, que provocam alterações fisiológicas, podendo ser melhor contornada com a adição de enzimas exógenas (COWIESON, 2005). O processo de secagem do milho, para reduzir o teor de umidade abaixo de 13%, tem sido recomendado como um procedimento seguro para a armazenagem. Este processo pode ser feito no campo ou em silos secadores.

A secagem no campo, a partir da colheita tardia, tem como consequência o aumento do ataque de insetos e também a possibilidade de contaminação com micotoxinas (LIMA, 2002). A secagem em silos secadores depende do controle rígido da temperatura e do tempo de secagem. Entretanto, o uso de elevada temperatura pode afetar as características biológicas, químicas e físicas do grão, como germinação, vigor, conteúdo energético, consistência, cor e umidade de equilíbrio (PORTELLA & EICHELBERGER, 2002). ALVES et al. (2001) relataram que temperaturas de secagem acima de 60°C já afetam a qualidade dos grãos de milho.

A umidade do grão e a temperatura de secagem devem ser consideradas nesse processo, podendo ocorrer mudanças na conformação do amido, que afeta sua susceptibilidade à ação enzimática ou na estrutura física do grão, tornando-o danificado e quebradiço, refletindo sobre o valor da energia metabolizável do milho (MAZZUCO et al., 2002; IJI et al., 2003; CARVALHO et al., 2004). De forma que a composição dos ingredientes deve ser considerada no momento da formulação, para que o efeito das enzimas possa ser predito e a mesma possa atuar efetivamente, melhorando o aproveitamento do ingrediente pelas aves.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da suplementação de um complexo enzimático (xilanase, amilase e protease) em dietas formuladas com milho seco no campo e seco artificialmente, considerando os valores de energia metabolizável predita para cada tipo milho.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Setor de Avicultura do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias-FCAV-UNESP/Jaboticabal-SP, no período de 4 de junho a 18 de julho de 2006.

Foram utilizados pintos de corte machos com um dia de idade da linhagem Cobb®. Para a formação das unidades experimentais, os pintos foram pesados individualmente e, distribuídos de forma que todas as parcelas apresentassem peso médio semelhante.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial (2x5), sendo dois tipos de secagem do milho (seco naturalmente no campo e seco artificialmente em silos industriais) e cinco tipos de formulação das dietas, constituindo 10 tratamentos de seis repetições com 40 aves em cada unidade experimental.

As dietas foram formuladas com milho e farelo de soja, de acordo com as exigências nutricionais para cada fase. A composição centesimal e os níveis calculados dos nutrientes das dietas experimentais para as fases inicial (1 a 21 dias) e de crescimento (22 a 42 dias) estão apresentados nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

Os tratamentos experimentais consistiram em avaliar a suplementação do complexo de xilanase, amilase e protease (XAP) em dietas formuladas com valores preditos de energia metabolizável do milho, ajustado pelo programa Avicheck (Danisco Animal nutrition-Denmark), o qual se baseia na análise bromatológica do milho e no valor do incremento energético (EIV) promovido com a adição da enzima. Os valores de energia metabolizável (EMA), considerados pelo programa para os dois tipos de milho, estão apresentados na Tabela 3.

As dietas formuladas com milho seco naturalmente e artificialmente consistiram em: uma dieta controle positivo (CP- formulada para atender as exigências nutricionais); duas dietas controle negativo (CN1 e CN2 - formuladas levando-se em consideração os valores de EMA preditos para o milho) e suplementadas ou não com 250g/ton e 500g/ton do complexo enzimático, respectivamente, conforme descrito na Tabela 3. Para a formulação de ração com inclusão do complexo enzimático, o programa Avicheck estabelece um valor energético do milho acima daquele predito para formulação das dietas controle positivo (Tabela 3). Isso é feito para que a quantidade de substrato para a enzima (milho) aumente e a de óleo reduza, visando, conseqüentemente, diminuir o custo da ração.

Tabela 1. Composição centesimal e níveis calculados dos nutrientes das dietas experimentais para a fase inicial (1 a 21 dias de idade) de frangos de corte.

Ingredientes (%)	Tipo de secagem do milho					
	Natural			Artificial		
	CP	CN1	CN2	CP	CN1	CN2
Milho	54,763	-	-	54,147	-	-
Milho + EIV₁	-	55,697	-	-	56,530	-
Milho + EIV₂	-	-	56,426	-	-	57,266
Farelo de Soja 46	36,496	36,308	36,161	37,548	36,118	35,969
Óleo de soja	3,967	3,219	2,636	3,574	2,561	1,971
Sal	0,339	0,339	0,339	0,339	0,339	0,338
DL-Metionina 99%	0,236	0,235	0,234	0,231	0,240	0,239
L-Lisina HCl 78,5%	0,168	0,172	0,175	0,140	0,183	0,186
Calcário calcítico	1,394	1,396	1,397	1,393	1,398	1,399
Fosfato bicálcico	1,336	1,334	1,332	1,328	1,332	1,330
Suplemento vitaminico¹	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100
Suplemento mineral²	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050
Bicarbonato de Sódio	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100
Coccidiostático³	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050
Inerte⁴	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Composição nutricional						
EM (kcal/kg)	3000	3000 ⁵	3000 ⁶	3000	3000 ⁵	3000 ⁶
PB (%)	22,00	22,00	22,00	22,00	22,00	22,00
Cálcio (%)	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96
Fósforo disponível (%)	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35
Met + Cis (%)	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90
Lisina (%)	1,28	1,28	1,28	1,28	1,28	1,28
Treonina (%)	0,84	0,82	0,82	0,83	0,82	0,82
Triptofano (%)	0,27	0,26	0,26	0,26	0,26	0,26
Na (%)	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18

EIV1 e 2 = Considerando na formulação os valores de energia do milho predita para adição de 250g/ton e 500g/ton de XAP, respectivamente, conforme descrito na Tabela 3.

1 Ácido fólico, 1000mg; ácido pantotênico, 15000mg; antioxidante, 0,5g; niacina, 40000mg; selênio, 300mg; biotina, 60mg; vit. B1, 1800 mg; vit. B12, 12000mg; vit. B2, 6000 mg; vit. B6, 2800 mg; vit. D3, 2000000 UI; vit. E, 15000mg; vit. K3, 1800 mg; Adição 1kg/t.

2 Mn, 150.000mg; Zn, 100.000 mg; Fe, 100.000 mg; Cu, 16.000 mg; I, 1.500 mg. Adição 0,5kg/t

3 Monensina Sódica;

4 areia lavada

⁵ EM sem considerar o incremento na energia do milho para o uso de 250g/ton do complexo enzimático-2960Kcal/kg

⁶ EM sem considerar o incremento na energia do milho para o uso de 500g/ton do complexo enzimático -2930Kcal/kg

Considerando as rações formuladas com os dois tipos de milho e estabelecendo o valor de energia do milho do controle positivo, para verificar a energia metabolizável das dietas controle negativo sem considerar o incremento energético para a adição de

enzimas, as diferenças entre a dieta controle positivo e as dietas controles negativos 1 e 2 foram de 40 e 70 kcal, respectivamente.

Tabela 2. Composição centesimal e níveis calculados dos nutrientes das dietas experimentais para a fase de crescimento (21 a 42 dias de idade) de frangos de corte.

Ingredientes (%)	Tipo de secagem do milho					
	Natural			Artificial		
	CP	CN1	CN2	CP	CN1	CN2
Milho	57,561			56,914		
Milho + EIV₁		58,543			59,419	
Milho + EIV₂			59,309			60,193
Farelo de Soja 46	31,742	31,544	31,390	32,847	31,344	31,188
Óleo de soja	6,472	5,686	5,073	6,059	4,994	4,374
Sal	0,315	0,315	0,315	0,315	0,314	0,314
DL-Metionina 99%	0,135	0,134	0,133	0,129	0,139	0,139
L-Lisina HCl 78,5%	0,162	0,165	0,168	0,132	0,177	0,180
Calcário Calcítico	1,052	1,054	1,056	1,051	1,056	1,058
Fosfato bicálcico	1,260	1,258	1,256	1,252	1,256	1,254
Suplemento vitaminico¹	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100
Suplemento mineral²	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050
Bicarbonato de Sódio	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100
Coccidiostático³	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050
Inerte⁴	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Composição nutricional						
EM (kcal/kg)	3200	3200 ⁵	3200 ⁶	3200	3200 ⁵	3200 ⁶
PB (%)	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00
Cálcio (%)	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80
Fósforo disponível (%)	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33
Met + Cis (%)	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
Lisina (%)	1,15	1,15	1,15	1,15	1,15	1,15
Treonina (%)	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
Triptofano (%)	0,23	0,23	0,23	0,24	0,24	0,24
Na (%)	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17

EIV1 e 2 Considerando na formulação os valores de energia do milho predita para adição 250g/ton e 500g/ton de XAP, respectivamente, conforme descrito na Tabela 3.

¹Ácido Fólico, 700mg; ácido pantotênico, 13000mg; antioxidante, 0,5g; niacina, 35000mg; selênio, 300mg; vit. B1, 1600 mg; vit. B12, 10000mg; vit. B2, 5000 mg; vit. B6, 2600 mg; vit. D3, 1500000 UI; vit. E, 12000mg; vit. K3, 1500 mg; Adição 1kg/t na fase de crescimento.

²Mn, 150.000mg; Zn, 100.000 mg; Fe, 100.000 mg; Cu, 16.000 mg; I, 1.500 mg. Adição 0,5kg/t

³Monensina Sódica;

⁴CeliteTM

⁵EM sem considerar o incremento na energia do milho para o uso de 250g/ton do complexo enzimático-3160Kcal/kg

⁶EM sem considerar o incremento na energia do milho para o uso de 500g/ton do complexo enzimático- 3130Kcal/kg

Tabela 3. Constituição das dietas conforme os tratamentos propostos.

Tratamento	Dieta	Milho	EMA do Milho	Enzima (inclusão)
1	CP	Seco no Campo	3.305	-
2	CN1	Seco no Campo	3.375 ¹	-
3	CN1+XAP	Seco no Campo	3.375	250g/ton
4	CN2	Seco no Campo	3.428 ²	-
5	CN2+XAP	Seco no Campo	3.428	500g/ton
6	CP	Seco artificialmente	3.365	-
7	CN1	Seco artificialmente	3.434 ¹	-
8	CN1+XAP	Seco artificialmente	3.434	250g/ton
9	CN2	Seco artificialmente	3.486 ²	-
10	CN2+XAP	Seco artificialmente	3.486	500g/ton

CP=Controle Positivo; CN=Controle Negativo; XAP=complexo enzimático contendo xilanase, amilase e protease ^{1 e 2} valores da energia metabolizável (EMA) do milho (Kcal/kg) predita pelo programa Avicheck (Danisco Animal Nutrition- Denmark) para adição de 250g/ton e 500g/ton do complexo enzimático, respectivamente.

O milho seco naturalmente foi colhido quando apresentava umidade média de 14%, oriundo da UNESP-Campus de Jaboticabal. O milho seco artificialmente foi obtido da Cooperativa COPLANA de Jaboticabal-SP, que recebe partidas de milho com umidade variando entre 13 e 18%, os quais são submetidos a um processo de secagem em um secador contra-corrente vertical, à temperatura de 110°C, sendo retirados quando atingiam 13% de umidade

A composição bromatológica dos ingredientes utilizados na formulação de rações, está apresentada na Tabela 4. O complexo enzimático avaliado neste ensaio é um produto comercial com características descritas na Tabela 5.

As aves foram alojadas em galpão subdividido em boxes. Cada boxe possuía área total de 4,95 m², equipado com bebedouro de alumínio tipo copo, comedouro tubular infantil e fonte de aquecimento (lâmpadas infravermelho de 200 watts). Após o 7º dia de idade, os bebedouros e comedouros iniciais foram substituídos por bebedouros pendulares e comedouros tubulares com capacidade para 25 kg e o aquecimento estabelecido de acordo com o manual da linhagem e necessidade dos animais.

Tabela 4. Composição bromatológica dos ingredientes.

Ingredientes Composição (%)	Milho Seco		Farelo de soja
	No campo	Artificialmente	
Matéria Seca (MS)	83,5	87,6	89,4
Proteína Bruta	8,56	9,59	45,24
Gordura	2,58	4,32	1,12
FDN	10,35	11,54	13,51
FDA	1,91	2,09	6,51
Celulose	1,51	1,60	5,93
Hemicelulose	8,44	9,45	7,01
Lignina	0,39	0,49	0,57

Tabela 5. Características das enzimas do complexo enzimático.

Enzima	Xilanase	Amilase	Protease
Origem ¹	<i>Trichoderma longibrachiatum ou reesei</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
Unidades/kg de dieta ²	300	400	4000
Dosagem	500 ou 250 g/ton		

¹As enzimas são produzidas através de linhagens geneticamente modificadas dos microrganismos citados.

²Níveis mínimos garantidos pelo fabricante do produto.

Os pintos foram vacinados no incubatório contra as doenças de Marek e Bouda aviária. No 7º dia de idade, foi realizada vacinação contra doença de Gumboro (cepa intermediária) via ocular e, no 14º dia de idade, contra as doenças de Newcastle e Gumboro (cepa forte) via água de bebida.

As temperaturas e umidades relativas máximas e mínimas foram registradas diariamente, utilizando-se termohigrômetros digitais distribuídos em dois pontos do galpão. A temperatura e umidade média durante o período experimental foi de 23,72°C e 45,70%, respectivamente. O programa de luz adotado foi o de 23 horas de luz e uma de escuro. Água e ração foram fornecidos *Ad libitum* durante todo o período experimental.

Aos 21 e 42 dias de idade, as aves e as rações foram pesadas para determinação das características de desempenho: ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar.

Ao final do experimento, todas as aves foram pesadas individualmente para determinar a percentagem de uniformidade das mesmas em cada tratamento. Foram consideradas uniformes as aves cujos pesos corporais encontravam-se na faixa de 10% acima ou abaixo do peso médio obtido para cada parcela.

Aos 35 dias, foi adicionado 1% Celite[®], uma fonte de sílica a todas as dietas experimentais como indicador indigestível (SAKOMURA & ROSTAGNO, 2007). A digestibilidade dos nutrientes e energia digestível ileal foi determinada, utilizando-se o método de coleta parcial ileal.

Aos 43 dias de idade, 15 aves de cada parcela experimental foram abatidas por deslocamento cervical e, imediatamente após o abate, o íleo foi exposto por incisão abdominal e um segmento de 15 cm terminando a 4 cm da junção íleo-cecal foi removido, para colheita das digestas. Os cecos das aves também foram coletados e estes foram pesados para determinar a relação peso do ceco/peso corporal.

Após a colheita, as digestas foram congeladas e, posteriormente, liofilizadas a uma temperatura de -40°C, por 72 horas. As amostras liofilizadas foram moídas em micromoinho eletrônico (IKA A11 BASIC). Posteriormente, foram determinados os teores de matéria seca, energia bruta, nitrogênio, amido e cinza ácida insolúvel das dietas e das digestas.

A matéria seca (secagem definitiva) e a proteína bruta foram determinadas segundo SILVA & QUEIROZ (2002). Para a determinação da energia bruta, as amostras foram submetidas à combustão em bomba calorimétrica (1281, PARR, Instruments, EUA). O amido foi determinado por colorimetria.

A cinza ácida insolúvel (CAI), fração indigerível presente nas dietas e digestas, foi determinada por uma adaptação da metodologia de VAN KEULEN & YOUNG (1977) descrita por SANTOS (2005).

Com os resultados laboratoriais, foram determinados os coeficientes de digestibilidade (CD) da matéria seca, proteína bruta e amido, e os valores de energia digestível (ED), calculados com base na análise das dietas e digesta ileal, de acordo com fórmulas descritas por SAKOMURA & ROSTAGNO (2007).

Os dados foram submetidos à avaliação de homogeneidade e normalidade, removidos os *outliers* identificados e, em seguida, submetidos à análise de variância pelo procedimento GLM do SAS, utilizando o teste de Duncan a um nível de significância de 5%.

Resultados

Os resultados para as características de desempenho na fase inicial (1 a 21 dias de idade) estão apresentados na Tabela 6. De acordo com a análise estatística dos valores obtidos, observou-se que não houve interação significativa (TFD x TSM) para nenhuma das características analisadas ($P > 0,05$). Entretanto, houve efeito significativo para as dietas ($P < 0,05$). As aves que receberam dieta controle negativo apresentaram redução no ganho de peso. Porém as aves que receberam dietas com suplementação enzimática apresentaram ganho de peso semelhante às aves alimentadas com dietas controle positivo (CP). O consumo de ração das aves recebendo maior suplementação (CN2+XAP) foi superior que o das demais dietas, o que refletiu em pior conversão alimentar das aves na fase inicial. A conversão alimentar dos animais que receberam dietas CP foi melhor que as das demais e semelhante àquelas que receberam menor suplementação (CN1+XAP). Não houve diferenças significativas entre as aves que receberam dietas com milho seco naturalmente ou artificialmente.

Os resultados para as características de desempenho na fase total (1-42 dias), uniformidade, peso do ceco e da relação peso do ceco/peso corporal estão apresentados na Tabela 7. De acordo com a análise estatística dos valores obtidos, não houve interação significativa (TFD x TSM) em nenhuma das características analisadas. Houve efeito para o tipo de formulação da dieta ($P < 0,05$) apenas para a conversão alimentar. As aves alimentadas com dieta CP, CN1 e CN1+XAP (250g/ton) apresentaram as melhores conversões. Houve ($P < 0,05$) do tipo de secagem do milho para a uniformidade. As aves que consumiram dietas com milho seco naturalmente apresentaram melhor uniformidade.

Os resultados para as características de digestibilidade ileal estão apresentados na Tabela 8. De acordo com a análise estatística dos dados obtidos, observou-se que não houve interação significativa (TFD x TSM) em nenhuma das características

analisadas. Também não foram observadas diferenças significativas entre as dietas, indicando que a suplementação enzimática não teve efeito sobre as características de digestibilidade ileal.

Tabela 6. Análise de variância do ganho de peso (GP), consumo de ração (CR) e conversão alimentar (CA) de frangos de 1 a 21 dias de idade, considerando o tipo de formulação da dieta (TFD) e o tipo de secagem do milho (TSM).

Variáveis	Formulação da Dieta	Secagem do milho		Média	TFD	TSM	TFD*TSM	CV (%)
		Campo	Artificial					
GP (g)	¹ CP	840,07	843,87	841,97 A	0,0032	0,2212	0,8569	2,52
	² CN1	831,60	817,64	824,62 AB				
	CN1 + ³ XAP(250)	838,05	834,36	836,21 A				
	² CN2	816,37	806,55	811,46 B				
	CN2 + ³ XAP(500)	846,57	836,40	841,48 A				
	Média	834,53	827,76					
CR (g)	CP	1151,20	1158,68	1154,94 B	0,0034	0,9567	0,9702	2,21
	CN1	1159,59	1152,45	1156,02 B				
	CN1 + XAP(250)	1162,90	1165,53	1164,21 B				
	CN2	1154,24	1154,86	1154,55 B				
	CN2 + XAP(500)	1193,96	1192,21	1193,09 A				
	Média	1164,38	1164,75					
CA	CP	1,371	1,373	1,372 A	0,0007	0,1152	0,9779	2,10
	CN1	1,394	1,410	1,402 BC				
	CN1 + XAP(250)	1,388	1,397	1,393 AB				
	CN2	1,414	1,432	1,423 C				
	CN2 + XAP(500)	1,410	1,426	1,418 C				
	Média	1,396	1,408					

¹CP=Dieta controle positivo; ²CN=Dieta controle negativo; ³XAP= Dieta CN com adição de 250 ou 500g/ton do complexo xilanase, amilase, protease; Média com mesmas letras maiúsculas nas colunas não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan⁴ (P>0,05)

Tabela 7. Análise de variância da uniformidade (UNF) das aves, o ganho de peso (GP), consumo de ração (CR), conversão alimentar (CA), peso do ceco (PC) e relação peso do ceco/peso corporal (C/Pc) de frangos de 1 a 42 dias, considerando o tipo de formulação da dieta (TFD) e o tipo de secagem do milho (TSM).

Variáveis	Formulação da Dieta	Secagem do		Média	TFD	TSM	TFD*TSM Probabilidade ⁴	CV (%)
		Campo	Artificial					
UNF (%)	¹ CP	79,25	72,45	75,85	0,3218	0,0070	0,8163	10,14
	² CN1	81,77	72,90	77,33				
	CN1 + ³ XAP(250)	80,13	75,35	77,74				
	² CN2	75,99	69,38	72,68				
	CN2 + ³ XAP(500)	79,87	78,44	79,15				
	Média	79,40a	73,70b					
GP (g)	CP	2,745	2,734	2,739	0,2508	0,2588	0,9467	2,25
	CN1	2,788	2,751	2,770				
	CN1 + XAP(250)	2,800	2,777	2,789				
	CN2	2,751	2,727	2,739				
	CN2 + XAP(500)	2,752	2,755	2,753				
	Média	2,767	2,749					
CR (g)	CP	4,567	4,547	4,557	0,2979	0,3344	0,9616	2,26
	CN1	4,626	4,576	4,601				
	CN1 + XAP(250)	4,649	4,628	4,639				
	CN2	4,621	4,574	4,598				
	CN2 + XAP(500)	4,634	4,641	4,638				
	Média	4,619	4,593					
CA	CP	1,664	1,663	1,663 A	0,0491	0,8191	0,9866	1,38
	CN1	1,659	1,664	1,661 A				
	CN1 + XAP(250)	1,660	1,666	1,663 A				
	CN2	1,680	1,677	1,679 AB				
	CN2 + XAP(500)	1,684	1,685	1,685 B				
	Média	1,670	1,671					
PC (g)	CP	19,533	19,789	19,661	0,4585	0,5022	0,9555	9,46
	CN1	18,537	18,988	18,762				
	CN1 + XAP(250)	18,190	18,593	18,391				
	CN2	18,940	19,746	19,343				
	CN2 + XAP(500)	19,061	18,714	18,887				
	Média	18,852	19,166					
C/Pc (%)	CP	0,632	0,647	0,640	0,4127	0,4828	0,9826	9,75
	CN1	0,594	0,621	0,607				
	CN1 + XAP(250)	0,596	0,596	0,596				
	CN2	0,625	0,635	0,630				
	CN2 + XAP(500)	0,614	0,617	0,615				
	Média	0,612	0,623					

¹CP=Dieta controle positivo; ²CN=Dieta controle negativo; ³XAP= Dieta CN com adição de complexo xilanase, amilase, protease; Média com mesmas letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan⁴ (P>0,05)

Tabela 8. Análise de variância do coeficiente de digestibilidade da matéria seca (CDMS), da proteína (CDP), do amido (CDA) e da energia digestível na matéria seca (EDMS) de frangos de corte aos 43 dias de idade, considerando o tipo de formulação da dieta (TFD) e o tipo de secagem do milho (TSM).

Variáveis	Formulação da Dieta	Secagem do		Média	TFD	TSM	TFD*TSM	CV (%)
		Campo	Artificial					
CDMS (%)	¹ CP	68,93	69,86	69,39	0,6816	0,0602	0,6977	2,35
	² CN1	68,82	69,63	69,23				
	CN1 + ³ XAP(250)	70,33	69,97	70,15				
	² CN2	68,69	70,08	69,39				
	CN2 + ³ XAP(500)	68,85	70,18	69,52				
	Média	69,12	69,94					
CDP (%)	CP	69,78	69,66	69,72	0,2413	0,2502	0,8169	4,34
	CN1	68,82	69,64	69,23				
	CN1 + XAP(250)	69,90	70,00	69,95				
	CN2	67,38	70,01	68,69				
	CN2 + XAP(500)	70,96	72,14	71,55				
	Média	69,37	70,29					
CDA (%)	CP	88,41	87,88	88,14	0,1480	0,1535	0,4520	1,83
	CN1	88,64	88,19	88,41				
	CN1 + XAP(250)	90,41	88,25	89,33				
	CN2	88,21	88,28	88,25				
	CN2 + XAP(500)	87,58	87,59	87,59				
	Média	88,65	88,04					
EDMS (kcal/kg)	CP	3353	3374	3364	0,5421	0,223	0,9987	2,31
	CN1	3319	3341	3330				
	CN1 + XAP(250)	3316	3334	3325				
	CN2	3296	3332	3314				
	CN2 + XAP(500)	3305	3332	3319				
	Média	3318	3343					

¹CP=Dieta controle positivo; ²CN=Dieta controle negativo; ³XAP= Dieta CN com adição de complexo xilanase, amilase, protease; Probabilidade pelo teste de Duncan⁴ (P>0,05)

Discussão

A partir dos resultados obtidos, é possível argumentar sobre diferentes aspectos da utilização de enzimas e qualidade do milho em dietas para frangos de corte.

Foi verificado efeito do tipo de formulação da dietas sobre o desempenho dos frangos na fase inicial, o que não foi observado quando se avaliou o período total de criação. Estes resultados estão relacionados com a fisiologia dos animais, pois as aves

nascem com o sistema fisiológico imaturo, com síntese e secreção de enzimas digestivas limitadas (NIR, 1998), justificando que, provavelmente, houve melhor aproveitamento dos nutrientes com suplementação com as enzimas exógenas, o que refletiu no restabelecimento do ganho de peso das aves na fase inicial de criação, semelhantes às aquelas alimentadas com controle positivo. De forma que, sua utilização pode ser direcionada para a fase inicial.

Sabe-se que o desempenho das aves depende do atendimento das exigências nutricionais das mesmas, de forma que, à medida que a deficiência nutricional aumenta a ave não consegue aproveitar adequadamente a dieta. Isso ficou claro neste ensaio (fase inicial), pois, conforme a energia da dieta foi reduzida nos tratamentos CN1 (2960 kcal/kg) e CN2 (2930 kcal/kg), as aves tiveram redução de 2,06% e 3,62% no ganho de peso, respectivamente.

Na fase inicial, a adição do complexo XAP, nas dietas controle negativo, restabeleceu o ganho de peso semelhante ao das aves que receberam dietas com níveis nutricionais adequados (CP). Apesar de não ter sido avaliada a digestibilidade dos nutrientes nesta fase, o efeito positivo com a adição do complexo XAP sobre o ganho de peso pode ter sido decorrente de um melhor aproveitamento dos nutrientes, pois as xilanases promovem depolimerização de arabinoxilanas em componentes de menor peso molecular (RAVINDRAN et al., 1999; OLUKOSI et al., 2007), facilitando, assim, o acesso de enzimas endógenas e exógenas (amilase e protease) aos nutrientes ali encapsulados, aumentando, conseqüentemente, a disponibilidade dos nutrientes para o crescimento (YU & CHUNG, 2004; HRUBY & PIERSON, 2005; NAGASHIRO, 2007).

RITZ et al. (1995c) relataram que a α -amilase suplementar pode aumentar o comprimento dos vilos do jejuno e íleo de perus e, como o jejuno é o local de maior digestão e o íleo, de absorção (LEESON & SUMMERS, 2001), esse efeito, associado com melhor degradação do amido, poderia levar à melhoria no aproveitamento dos nutrientes de uma maneira geral, em dietas com milho e farelo de soja (GRACIA et al., 2003).

Foi observado na fase inicial que, mesmo com o restabelecimento do ganho das aves alimentadas com dieta com adição de enzima, pode-se observar que as aves que

receberam dietas CN2+XAP apresentaram maior consumo de ração, indicando que a adição da enzima estimulou o aumento no consumo para que os frangos regulassem a deficiência energética, e recuperassem o ganho de peso. Pode, também, ter ocorrido alterações na secreção de enzimas endógenas com a maior suplementação enzimática. Neste sentido, NIR (1998) relatou que a adição de amilase e protease, em dietas para frangos com até duas semanas de idade, promove depressão na atividade da amilase pancreática, da tripsina e quimiotripsina intestinal, indicando que a secreção de enzimas pancreáticas é afetada pela concentração de enzimas no intestino delgado, de seus substratos ou produtos de hidrólise. RITZ et al. (1995a), trabalhando com perus, verificaram que, na primeira semana de vida, a suplementação de xilanase promoveu redução na atividade da amilase pancreática. IJI et al. (2003) não observaram redução significativa na atividade da amilase pancreática quando suplementaram dietas com complexo xilanase, amilase e protease. HAN (1997) verificou que a adição de celulasas em dietas contendo cevada reduziu a atividade de sacarases e maltases, provocando mudanças na atividade e secreções pancreáticas de enzimas como proteases e amilases.

Apesar de muitos estudos observarem efeito positivo com a suplementação do complexo XAP em dietas contendo milho e farelo de soja na fase inicial (ZANELLA et al., 1999; IJI et al., 2003; COWIESON & ADEOLA, 2005; COWIESON et al., 2006c), outros não verificaram respostas nesta fase (DOUGLAS et al., 2000; KOCHER et al., 2003; PUCCI et al., 2003; OLUKOSI et al., 2007). A falta de resposta no desempenho com o uso de enzimas pode estar associada a diferentes aspectos, como: forma e momento de aplicação, exposição a altas temperaturas, processamento das rações, composição e concentração do complexo enzimático, distribuição uniforme no alimento, fatores que possam desnaturá-las, a estocagem e o prazo de validade (BORGES, 2005).

Um dos fatores de maior interferência é a forma de suplementação enzimática nas dietas. PACK et al.(1997) verificaram melhor eficiência da utilização de enzima (XAP) em dietas com redução da energia. Mas a redução de nutrientes das dietas depende do tipo de ingrediente utilizado e da especificidade da enzima a ser adicionada.

YU & CHUNG (2004) encontraram desempenhos semelhantes entre aves alimentadas com dietas controle positivo e controle negativo com redução de 100kcal, sem efeito significativo da adição dos complexos enzimáticos. OLUKOSI et al. (2007) não encontraram efeito da adição de XAP em dietas controle negativo com redução de 115kcal/kg para aves aos 21 dias.

HRUBY & PIERSON (2005) explicaram que a utilização de enzimas em dietas contendo milho e farelo de soja tem melhorado o desempenho das aves, principalmente na fase inicial, sendo importante a correta manipulação da dieta no período total.

De acordo com os resultados de 1 a 42 dias, não foi observado redução no desempenho daquelas submetidas às dietas controle negativo. A suplementação enzimática também não foi eficiente para melhorar o desempenho das aves. Como houve efeito da suplementação na fase inicial e as diferenças em energia entre as dietas controle positivo e controle negativo (1 e 2) eram pequenas (40 e 70 kcal), a definição da exigência para a fase de crescimento pode não ter sido adequada, já que as aves que receberam dietas controle negativo tiveram um ganho compensatório e igualaram o desempenho ao das aves que receberam dietas controle positivo e com suplementação. Provavelmente, o valor energético do controle negativo não foi suficiente para representar deficiência na exigência da ave, e por isso não apresentaram ganho de peso e consumo de ração diferente das aves alimentadas com as demais dietas.

De acordo com SCHANG & AZCONA (2003), a eficiência de utilização da enzima, freqüentemente, é confundida com fatores externos, especialmente dietas que já atendam as necessidades das aves para máximo crescimento, sendo que a enzima realmente libera nutrientes, porém o animal não os aproveita.

Alguns autores relataram que, à medida que aumenta a temperatura de secagem, a qualidade do milho pode ser alterada. CARVALHO et al. (2004) estimaram que temperaturas acima de 49°C promovem redução na energia metabolizável do milho, afetando também a disponibilidade de aminoácidos (CARVALHO, 2002). A autora justificou que pode ter ocorrido reação de Maillard, a qual promove degradação dos carboidratos, formando um complexo entre carboidratos e grupos amino,

dificultando a ação das enzimas digestivas. Considerou ainda que a reação de Maillard pode ocorrer em temperaturas abaixo dos 100° C.

Sebe-se que a qualidade do milho pode interferir no aproveitamento do mesmo pela ave, e, portanto, é importante a predição do valor nutricional do ingrediente a partir da análise bromatológica para que as aves possam aproveitar adequadamente a dieta fornecida. De acordo com os valores da Tabela 4, pode-se verificar que o milho seco artificialmente apresentou composição química superior. A partir dos resultados obtidos, verificou-se que a formulação das dietas com estimativa da energia metabolizável para os dois tipos de milho (seco no campo e artificialmente) pelo programa Avicheck, pode ter sido fator primordial para não ter ocorrido diferenças entre os tipos de milho para as características de desempenho e digestibilidade dos nutrientes.

IJI et al. (2003) não encontraram diferenças nas energias metabolizáveis aparente e verdadeira do milho submetido a diferentes temperaturas de secagem ou seco no campo. Estes autores observaram que o amido resistente e a fibra bruta foram reduzidos à medida que aumentou a temperatura de secagem do milho acima de 85°C, com redução na quantidade de amilose e aumento da amilopectina. Os autores encontraram respostas no desempenho de frangos aos 28 dias de idade, com a adição de XAP em dietas com milho seco no campo e em diferentes temperaturas (85, 95 e 105°C), sendo mais evidente a ação das enzimas em dietas formuladas com milho seco no campo.

Outro aspecto relacionado à utilização de enzimas em dietas para aves é o efeito sobre a saúde intestinal. Existem cerca de 640 espécies de bactérias que habitam o intestino das aves e cerca de 90% delas são desconhecidas (APAJALAHTI et al., 2004). É importante conhecer as características das bactérias presentes no trato gastrointestinal das aves, uma vez que com o aumento da viscosidade e com a redução da taxa de passagem, as bactérias são capazes de se multiplicar e migrar por extensas áreas do intestino delgado, podendo esses microrganismos digerir e utilizar amido e proteína da digesta, competindo, conseqüentemente, pelos nutrientes e energia oriundos de compostos que não foram digeridos pelo animal (BEDFORD, 1993; APAJALAHTI et al., 2004).

De acordo com BEDFORD & APAJALAHTI (2001), a utilização de enzimas exógenas reduz a quantidade de substrato que entra no intestino grosso (IG), como consequência de melhor utilização pelo intestino delgado e, desta forma, a população microbiana no íleo terminal é reduzida. Estes autores relataram que pode ocorrer redução de 60% no número de bactérias com a adição de xilanases em dietas contendo trigo. MORAN JR (2005) relatou que o peso do ceco pode ser uma medida característica da quantidade de substrato presente no IG. Desta forma, é uma característica que pode ser avaliada como resposta da adição de enzima, pois a ação destas reflete em maior proporção de polissacarídeos hidrolisados, que entram do IG como moléculas menores e são mais facilmente degradados pelos microrganismos, aumentando a produção de ácidos graxos de cadeia curta (WANG et al., 2005) e reduzindo, conseqüentemente, o peso dos cecos.

No presente trabalho foi observada redução não significativa de 1,97 a 2,3% no peso do ceco, com a adição de 250g/ton e 500g/ton do complexo XAP, respectivamente. MORAN JR (2005) mostrou que, em seus estudos com adição de XAP, as aves apresentaram uma redução de 10,29% aos 21 dias, de 5,1% aos 42 dias e de 18,77% aos 56 dias no peso do ceco.

Conclusões

A suplementação com complexo xilanase, amilase e protease foi eficiente em recuperar o ganho de peso dos frangos de 1-21 dias de idade, entretanto não foi efetiva na fase total (1-42 dias).

A predição da energia metabolizável dos dois tipos de milho foi efetiva para ajustar a composição e aproveitamento das dietas e manter o desempenho semelhante entre as aves alimentadas com o milho seco naturalmente e artificialmente.

Referências

ALVES, W.M. et al. Qualidade dos grãos de milho em função da umidade de colheita e da temperatura de secagem. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.5, n. 3, p. 469-474, 2001.

APAJALAHTI, J.; KETTUNEN, A.; GRAHAM, H. Characteristics of the gastrointestinal microbial communities, with special reference to the chicken. **World's Poultry Science Journal**, Beekbergen, v. 60, n. 2, p. 223-232, 2004.

BEDFORD, M. R. Mode of action of feed enzymes. **Journal Applied Poultry Research**, Savoy, v. 2, n.1 p. 85-92, 1993.

BEDFORD, M. R.; APAJALAHTI, J. Microbial Interactions in the Response to exogenous Enzyme Utilization. In: BEDFORD, M. R.; PARTRIDGE, G. G. **Enzymes in farm nutrition**. Londres: Cab International, 2001. p. 299-314.

BORGES, C. A. Q. Avanços nutricionais para otimização de resultados na avicultura. In: FÓRUM INTERNACIONAL DE AVICULTURA, 1., 2005, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu: Editora Animalworld, 2005. p. 185-193.

CARVALHO, D. C. O. **Valor nutritivo do milho para aves, submetido a diferentes temperaturas de secagem e tempo de armazenamento**. 2002. 90f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002.

CARVALHO, D. C. O. et al. Composição química e energética de amostras de milho submetidas a diferentes temperaturas de secagem e períodos de armazenamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.33, n. 2, p.358-364, 2004.

COWIESON, A. J. Factors that affect the nutritional value of maize for broilers. **Animal Feed Science and Technology**, Davis, n. 3-4,v. 119, n. p. 293–305, 2005.

COWIESON, A. J.; ACAMOVIC, T.; BEDFORD, M. R. Phytic acid and phytase: implications for protein utilization by poultry. **Poultry Science**, Savoy, v. 85, n.5, p.878–885, 2006c.

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

COWIESON, A. J.; HRUBY, M.; PIERSON, E. E. M. Evolving enzyme technology: Impact on commercial poultry nutrition. **Nutrition Research Reviews**, Cambridge, v. 19, n. 1, p. 1-15, 2006a.

DOUGLAS, M.W.; PARSONS, C.M. BEDFORD, M.R. Effect of various soybean meal sources and Avizyme on chick growth performance and ileal digestible energy. **Journal Applied Poultry Research**, Savoy, v.9, n. 1, p.74-80, 2000.

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

GARCIA, E. R. M. et al. Efeito da suplementação enzimática em rações com farelo de soja e soja integral extrusada sobre a digestibilidade de nutrientes, o fluxo de nutrientes na digesta ileal e o desempenho de frangos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 29, n. 5, p. 1414-1426, 2000.

GRACIA, M. I.; ARANÍBAR, M. J.; LÁZARO, R. a-Amylase supplementation of broiler diets based on corn. **Poultry Science**, Savoy, v. 82, n. 3, p. 436–442, 2003.

HAN, Z. Effect of enzyme supplementation of diets on the physiological function and performance of poultry. In: MARQUARDT, R. R.; HAN, Z. **Enzymes in poultry and swine nutrition**. Nanjing: IDRC, 1997. p.29-44.

HRUBY, M.; PIERSON, E. E. M. The use of enzymes in broiler nutrition. In: Fórum Internacional de Avicultura, 1., 2005, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu: Editora Animalworld, 2005. p. 142-147.

IJI, P. A.; KHUMALO, K.; SLIPPERS, S., et al. Intestinal function and body growth of broiler chickens on diets based on maize dried at different temperatures and supplemented with a microbial enzyme. **Reproduction Nutrition Development**, França, v. 43, n.1, p. 77–90, 2003.

KOCHER, A. et al. Effects of enzyme combinations on apparent metabolizable energy of corn–soybean meal-based diets in broilers. **Journal Applied Poultry Research**, Savoy, v.12, n. 3, p.275–283, 2003.

LEESON, S.; SUMMERS, J. D. **Nutrition of Chickens**. 4ª edição. Guelph: University Books, 2001. 482 p.

LIMA, G. J. M. M; SOUZA, O. W. Importância da qualidade de grãos na produção de suínos. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE PRODUÇÃO, MERCADO E QUALIDADE DE CARNE DE SUÍNOS - AVESUI. 2002, Florianópolis. **Anais...** Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2002. p. 45-62.

MALATHI,V.; DEVEGOWDA, G. *In Vitro* evaluation of nonstarch polysaccharide digestibility of feed ingredients by enzymes. **Poultry Science**, Savoy, v. 80, n. 3, p.302–305, 2001.

MAZZUCO, H. et al. Composição química e energética do milho com diversos níveis de umidade na colheita e diferentes temperaturas de secagem para frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.31, n. 6, p.2216-2220, 2002.

MORAN JR, E. T. Improving nutrient recovery and food pathogen suppression with feed enzymes. In: Fórum Internacional de Avicultura (Seminário técnico Danisco), 1., 2005, Foz do Iguaçu. **Comunicação oral**. Foz do Iguaçu. DANISCO, 2005.

NAGASHIRO, C. Enzimas na nutrição de aves. In: CONFERENCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLA, 2007, Santos. **Anais...** Santos: FACTA, 2007. p. 307-327.

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

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

PACK, M. R. et al. Effects of feed enzymes on ileal digestibility of energy and protein in corn-soybean diets fed to broilers. In: EUROPEAN SYMPOSIUM ON POULTRY NUTRITION, 11., 1997, Faaborg. **Anais...** Faaborg: WPSA, 1997.

PORTELLA, J. A.; EICHELBERGER, L. **Parâmetros para secagem de milho em secador estacionário, usando gás liquefeito de petróleo**. Passo Fundo: Embrapa Trigo (Circular técnica on line), 2002. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_ci09.htm> Acessado em: 03 jun 2007.

PUCCI, L. E. A. et al. Níveis de óleo e adição de complexo enzimático na ração de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, n. 4, v.32, p. 909-917, 2003.

RAVINDRAN, V.; HEW, L. I., RAVINDRAN, G. Influence of xylanase supplementation on the apparent metabolizable energy and ileal amino acid digestibility in a diet containing wheat and oats, and on the performance of three strains of broiler chickens. **Australian Journal Agriculture Research**, Collingwood, v. 50, n. 7, p. 1159-1163, 1999.

RITZ, C. W. et al. Endogenous amylase levels and response to supplemental feed enzymes in male turkeys from hatch to eight weeks of age. **Poultry Science**, Savoy, v. 74, n. 10,, p. 1317–1322, 1995a.

RITZ, C. W. et al. Effects of protein levels an enzyme supplementation upon growth ant rate of digesta passage of male turkeys. **Poultry Science**, Savoy, v. 74, n. 10, p. 1323–1328, 1995b.

RITZ, C. W. et al. Growth and intestinal morphology of male turkeys as influenced by dietary supplementation of amylase and xylanase. **Poultry Science**, Savoy, v. 74, n. 10, p. 1329–1334, 1995c.

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

SANTOS, F.R. **Efeito da suplementação com fitase sobre o desempenho e digestibilidade de nutrientes para frangos de corte.** 2005. 99 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005.

SCHANG, M. J.; AZCONA, J.O. Natural enzyme applications to optimize animal performance. In: NUTRITIONAL BIOTECHNOLOGY IN THE FEED AND FOOD INDUSTRIES OF ALLTECH ANNUAL MEETING, 19., 2003, Lexington, **Anais...** Lexington: Alltech, 2003. p. 163-170.

SILVA, D. J. QUEIROZ, A. C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos.** 3. ed. Viçosa:UFV, 2002. 235p.

STRADA, E. S. O. et al. Uso de enzimas na alimentação de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.34, n. 6, p.2369-2375, 2005.

THORPE, J.; BEAL, J. D. Vegetable protein meals and the effects of enzymes. In: BEDFORD, M. R.; PARTRIDGE, G. G. **Enzymes in farm nutrition.** Londres: Cab International, 2001. p. 125-143.

VAN KEULEN, J.; YOUNG, B. A. Evaluation of acid-insoluble ash as natural marker in ruminant digestibility studies. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 44, n. 2, p.282-287, 1977.

WANG, Z. R. et al. Effects of enzyme supplementation on performance, nutrient digestibility, gastrointestinal morphology, and volatile fatty acid profiles in the hindgut of broilers fed wheat-based diets. **Poultry Science**, Savoy, v. 84, n. 6, p.875–881, 2005.

YU, B.; CHUNG, T. K. Effects of multiple-enzyme mixtures on growth performance of broilers fed corn-soybean meal diets. **Journal Applied Poultry Research**, Savoy, v. 13, n. 2, p.178–182, 2004.

ZANELLA, I. et al. Effect of enzyme supplementation of broiler diets based on corn and soybeans. **Poultry Science**, Savoy, v. 78, n. 4, p.561–568, 1999.

CAPÍTULO 5 - IMPLICAÇÕES

O objetivo deste estudo não foi determinar qual a melhor enzima, tipo de milho ou metodologia, mas sim apresentar informações que possam contribuir na decisão do nutricionista no momento de escolha da enzima a ser utilizada, bem como, na forma de incorporação das mesmas em dietas para aves.

As informações sobre o incremento na energia metabolizável do ingrediente, promovido com a adição de enzimas, contribui para predizer melhor o efeito da enzima sobre o substrato de cada ingrediente, de forma que, a matriz nutricional dos ingredientes com enzimas possa ser melhor estabelecida, de acordo com a idade do animal. As técnicas descritas apresentaram boas estimativas dos valores energéticos dos ingredientes, considerando que as mesmas poderão ser utilizadas na avaliação de outras enzimas ou até mesmo aperfeiçoadas, visando melhores estimativas do efeito das enzimas sobre os ingredientes utilizados em dietas para frangos de corte.

As diferenças entre a composição de um mesmo ingrediente (milho), e sua utilização para predizer a energia metabolizável a ser considerada no momento da formulação da dieta, foi outro aspecto observado neste estudo. Em um estudo essas diferenças não foram consideradas, estabelecendo-se a mesma energia para os dois tipos de milho, resultando, contudo, em diferenças no ganho de peso dos animais alimentados com milho seco naturalmente e artificialmente. No outro, a composição do milho foi considerada, e predito valores de energia metabolizável diferentes para os dois tipos de milho no momento da formulação. Neste estudo não foram verificadas diferenças no desempenho. Pode-se considerar ainda, que o efeito da enzima pode ser afetado de acordo com a definição da energia metabolizável das dietas.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.