

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC**  
**CENTRO DE EDUCAÇÃO SUPERIOR DO OESTE – CEO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA – PPGZOO**

**EFEITOS DE PROTEASES ORIUNDAS DA FERMENTAÇÃO DE**  
**MICROORGANISMOS SOBRE A DIGESTIBILIDADE DE NUTRIENTES E**  
**DESEMPENHO ZOOTÉCNICO EM FRANGOS DE CORTE**

**CHAPECÓ**

**2024**

**MAIARA SULZBACH MARCHIORI**

**EFEITOS DE PROTEASES ORIUNDAS DA FERMENTAÇÃO DE  
MICRORGANISMOS SOBRE A DIGESTIBILIDADE DE NUTRIENTES E  
DESEMPENHO ZOOTÉCNICO EM FRANGOS DE CORTE**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Zootecnia pelo Programa de Pós-Graduação em zootecnia do centro de educação superior do Oeste - CEO, da Universidade do Estado de Santa Catarina – Udesc.

Orientador: Prof. Dr. Aleksandro Schafer Da Silva.

Coorientadores: Prof. Dr. Diovani Paiano; Prof. Dr. Marcel Manente Boiago.

**CHAPECÓ**

**2024**

## FICHA CATALOGRÁFICA

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da  
Biblioteca Universitária Udesc,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Marchiori, Maiara Sulzbach  
EFEITOS DE PROTEASES ORIUNDAS DA  
FERMENTAÇÃO DE MICRORGANISMOS SOBRE A  
DIGESTIBILIDADE DE NUTRIENTES E DESEMPENHO  
ZOOTÉCNICO EM FRANGOS DE CORTE / Maiara Sulzbach  
Marchiori. -- 2024.  
90 p.

Orientador: Aleksandro Schafer Da Silva  
Coorientador: Diovani Paiano  
Coorientador: Marcel Manente Boiago  
Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de Santa  
Catarina, Centro de Educação Superior do Oeste, Programa de  
Pós-Graduação em Zootecnia, Chapecó, 2024.

1. Protease. 2. Frangos de corte. 3. Alimentos Alternativos. 4.  
Sustentabilidade . I. Schafer Da Silva, Aleksandro . II. Paiano,  
Diovani. Manente Boiago, Marcel. III. Universidade do Estado de  
Santa Catarina, Centro de Educação Superior do Oeste, Programa de  
Pós-Graduação em Zootecnia. IV. Título.

**MAIARA SULZBACH MARCHIORI**

**EFEITOS DE PROTEASES ORIUNDAS DA FERMENTAÇÃO DE  
MICROORGANISMOS SOBRE A DIGESTIBILIDADE DE NUTRIENTES E  
DESEMPENHO ZOOTÉCNICO EM FRANGOS DE CORTE**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Zootecnia pelo Programa de Pós-Graduação em zootecnia do centro de educação superior do Oeste - CEO, da Universidade do Estado de Santa Catarina – Udesc.

Orientador: Prof. Dr. Aleksandro Schafer Da Silva.

**BANCA EXAMINADORA**

Membros:

Aleksandro Schafer Da Silva, Dr.

Universidade do estado de Santa Catarina, Udesc Oeste

Gabriela Miotto Galli, Dra.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Tiago Goulart Petrolli, Dr.

Universidade do oeste de Santa Catarina - UNOESC

Chapecó, 16 de fevereiro de 2024.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus, por me permitir vivenciar estes dois anos de mestrado e pela vida. Agradeço a meus pais, Sonia e Luiz e a minha irmã Marina, por sempre estarem me apoiando em todos os percursos da vida, e sempre mostrar que o trabalho duro recompensa. Ao meu amado noivo Marcelo, um sincero obrigada, por nunca me deixar desamparada quando precisei e por sempre estar presente em todos os processos deste trabalho, seu apoio foi primordial para que tudo acontecesse, eu amo você. E ao meu cão, fiel companheiro Biscoito, meu apoio emocional.

Gostaria de expressar minha sincera gratidão a todas as pessoas que estiveram presente em minha trajetória. Meu profundo agradecimento ao meu orientador, o Dr. Aleksandro Schafer da Silva, cuja orientação sábia, paciência e apoio contínuo foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho, e muito obrigada Aleks pela chance de entrar para o GANA, este processo me tornou quem sou hoje. Aos coorientadores, Marcel M. Boiago e Diovani Paiano, obrigada por todo apoio e ensinamentos, vocês foram essenciais para que os experimentos e as análises fossem realizados com êxito.

Não posso deixar de agradecer à minha equipe de telas, que dividiu os calos para que não ficassem somente em minhas mãos, Marcelo, Renata, Maksuel, Sonia, Charles e Emerson, vocês são demais. E aos meus amigos do coração que dividiram muitas risadas, desabafos, e que sempre que precisei me ouviram e estiveram perto com ótimos conselhos, vocês moram no meu coração Renata e Maksuel.

Além disso, estendo meus agradecimentos aos colegas de laboratório, ao GANA e amigos que compartilharam comigo deste momento. Um reconhecimento especial à UDESC, UNIEDU e TECTRON, pela disponibilidade de recursos para que tudo fosse possível. Por fim, agradeço a todos aqueles cujas contribuições, diretas ou indiretas, colaboraram para o sucesso deste trabalho.

## RESUMO

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar se a inclusão de diferentes doses de protease ácida e alcalina e a associação destas para frangos de corte, também avaliar o uso de diferentes fontes proteicas em relação ao blend de proteases, e se a protease possibilita maior aproveitamento de aminoácidos e se melhoram a digestibilidade e desempenho zootécnico em frangos de corte. Desta forma foram realizados três experimentos. O primeiro experimento foi realizado com 880 aves, dividido em 11 tratamentos, que consistiram em: Controle Positivo (CP), Controle Negativo (menos 5% de proteína bruta e aminoácidos) (CN), CN + três dosagens de Protease Ácida, 125 g/t (PA125), 250 g/t (PA250), 500 g/t (PA500), CN + três dosagens de protease Alcalina, 125 g/t (PLA125), 250 g/t (PLA250), 500 g/t (PLA500) e CN CN + Protease Ácida + Alcalina 125 (PLA125), Alcalina 250 (PLA250), Alcalina 500 (PLA500). Nos dias 1, 10, 21 e 28 foram avaliados o desempenho zootécnico das aves. E dos dias 17 a 21 foi realizado um ensaio de digestibilidade. No final do experimento, foram realizadas análises de sangue, e as aves foram abatidas para análise da carne. Os grupos PLA 250 e PLA 500 apresentaram melhores conversões alimentares e maior retenção de nitrogênio ( $P = 0,02$ ). O triglicerídeo foi superior nos grupos CP e PLA 500 ( $P = 0,01$ ). Houve aumento nos ácidos palmítico e palmitoleico, e diminuição nos ácidos graxos ômega-3 e ômega-6 na carne ( $P > 0,05$ ). Os grupos com proteases tiveram maiores perdas de água por cocção ( $P = 0,05$ ). O grupo PL teve maior relação vilo/cripta ( $P = 0,02$ ). Após estes resultados foi realizado o segundo experimento, no qual foi produzido uma mistura dessas proteases. Então, foram utilizados 240 pintinhos divididos em quatro grupos: Controle Positivo (PC), Controle negativo (com redução de 8% de proteína bruta e aminoácidos) (NC), NC + Protease 125 g/t (BP125), NC + Protease 250 g/t (BP250). Foi realizado outro ensaio de digestibilidade, e as aves foram abatidas para coleta de conteúdo ileal, assim como mensurado o desempenho. O maior peso corporal e ganho de peso foi observado nas aves dos grupos PC e BP150; e os maiores coeficientes de digestibilidade ileal de nutrientes e aminoácidos (treonina, cisteína e triptofano) foi observado nas aves do grupo BP250. Na sequência, foi realizado um terceiro experimento com foco no desempenho zootécnico de frangos de corte usando um produto feito a partir do experimento 2 e inclusão de um subproduto o DDGs. Utilizou-se 720 pintainhos, distribuídos em seis tratamentos. Foram utilizados 720 pintainhos, divididos em seis tratamentos. Os tratamentos foram: CPF – controle positivo; CNF – controle negativo (valorização da protease), CNF125 – controle

negativo mais protease; CPD – controle positivo com DDGs; CNF – controle negativo DDGs, CNF125 – controle negativo com DDGs mais protease. Os maiores ganhos de peso total e diário foram nos tratamentos CPF e CNF125 em relação aos demais tratamentos ( $P = 0,014$ ;  $P = 0,013$ ). Os CPF e CNF125 obtiveram as melhores conversões em relação os grupos CND e CND125 ( $P = 0,001$ ). O custo (R\$) médio em kg da ração foi reduzido conforme a diminuição de nutrientes na dieta, e o menor custo se manteve quando a enzima foi utilizada. Os CPF e CNF125 tiveram os melhores índices de eficiência produtiva. Como conclusão, o uso da protease para frangos melhora a digestibilidade de nutrientes e mantém o desempenho zootécnico com uma dieta com proteína reduzida, e o uso de DDGs reduz o valor de produção de rações, mas afeta o desempenho de aves de forma negativa.

**Palavras-chave:** Protease; Frangos de corte; Alimentos alternativos; Sustentabilidade.

## ABSTRACT

The general objective of this work was to evaluate whether the inclusion of different doses of acid and alkaline protease and their association for broiler chickens, also evaluate the use of different protein sources in relation to the protease blend, and whether the protease allows greater use of amino acids and improve digestibility and zootechnical performance in broiler chickens. In this way, three experiments were carried out. The first experiment was carried out with 880 birds, divided into 11 treatments, which consisted of: Positive Control (CP), Negative Control (minus 5% of crude protein and amino acids) (CN), CN + three dosages of Acid Protease, 125 g/t (PA125), 250 g/t (PA250), 500 g/t (PA500), CN + three dosages of Alkaline protease, 125 g/t (PLA125), 250 g/t (PLA250), 500 g/t (PLA500) and CN CN + Acid Protease + Alkaline 125 (PLA125), Alkaline 250 (PLA250), Alkaline 500 (PLA500). On days 1, 10, 21 and 28, the zootechnical performance of the birds was evaluated. And from days 17 to 21 a digestibility test was carried out. At the end of the experiment, blood tests were performed, and the birds were slaughtered for meat analysis. The PLA 250 and PLA 500 groups showed better feed conversions and greater nitrogen retention ( $P = 0.02$ ). Triglyceride was higher in the CP and PLA 500 groups ( $P = 0.01$ ). There was an increase in palmitic and palmitoleic acids, and a decrease in omega-3 and omega-6 fatty acids in meat ( $P > 0.05$ ). The groups with proteases had greater water losses during cooking ( $P = 0.05$ ). The PL group had a higher villus/crypt ratio ( $P = 0.02$ ). After these results, the second experiment was carried out, in which a mixture of these proteases was produced. Then, 240 chicks were divided into four groups: Positive Control (PC), Negative Control (with 8% reduction in crude protein and amino acids) (NC), NC + Protease 125 g/t (BP125), NC + Protease 250 g/t (BP250). Another digestibility test was carried out, and the birds were slaughtered to collect ileal content, as well as measuring performance. The highest body weight and weight gain was observed in birds from the PC and BP150 groups; and the highest ileal digestibility coefficients of nutrients and amino acids (threonine, cysteine and tryptophan) were observed in birds in the BP250 group. Subsequently, a third experiment was carried out focusing on the zootechnical performance of broiler chickens using a product made from experiment 2 and the inclusion of a by-product, DDGs. 720 chicks were used, distributed across six treatments. 720 chicks were used, divided into six treatments. The treatments were: CPF – positive control; CNF – negative control (protease enhancement), CNF125 – negative control plus protease; CPD – positive control with DDGs; CNF – DDGs

negative control, CNF125 – negative control with DDGs plus protease. The greatest gains in total and daily weight were in the CPF and CNF125 treatments in relation to the other treatments ( $P = 0.014$ ;  $P = 0.013$ ). The CPF and CNF125 had the best conversions compared to the CND and CND125 groups ( $P = 0.001$ ). The average cost (R\$) in kg of the feed was reduced as the nutrients in the diet decreased, and the lower cost was maintained when the enzyme was used. The CPF and CNF125 had the best production efficiency rates. In conclusion, the use of protease for chickens improves nutrient digestibility and maintains zootechnical performance with a reduced protein diet, and the use of DDGs reduces the production value of feed, but negatively affects poultry performance.

**Keywords:** Protease; Broiler chickens; Alternative foods; Sustainability.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação da hidrólise proteica catalisada pela protease.....	34
Figura 2 - Forma química de um aminoácido.....	34
Figura 3- Índice de eficiência produtiva de frangos de corte alimentados blend de proteases simultâneo ao uso de um subproduto.....	69

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dietas basais (Controle positivo e controle negativo) utilizadas na alimentação de frangos griller de em fase inicial e crescimento.....	56
Tabela 2 - Representação do delineamento de tratamentos de frangos do tipo griller com adição de protease na dieta.....	57
Tabela 3 - Desempenho de crescimento de frangos alimentados com protease ácida e alcalina.....	58
Tabela 4 - Digestibilidade das fezes de frangos alimentados com protease ácida e alcalina.....	59
Tabela 5 - Bioquímico de frangos submetidos a suplementação com protease ácida e alcalina.....	60
Tabela 6 - Perfil de ácidos graxos de carne de frangos suplementados com protease ácida e alcalina.....	60
Tabela 7 - Análise de carne de frangos suplementados com protease ácida e alcalina....	62
Tabela 8 - Micrometria de frangos tipo griller suplementados com protease ácida e alcalina.....	62
Tabela 9 - Rações iniciais usadas para alimentação de pintinhos usados no experimento II.....	71
Tabela 10 - Composição química, energética e aminoacídica das dietas experimentais...	72
Tabela 11 - Representação do delineamento experimental.....	73
Tabela 12 - Desempenho zootécnicos de pintinhos nos primeiros 21 dias de vida.....	73
Tabela 13 - Coeficientes de metabolização ileal de aminoácidos estimados com uso de indicador em pintinhos que receberam dieta com níveis normais de proteína e redução de 8%, assim como adição na dieta com protease.....	74
Tabela 14 - Micrometria de jejuno de pintinhos alimentados com blend de proteases.....	75
Tabela 15 - Representação do delineamento experimental de tratamentos utilizados para frangos de corte até 39 dias.....	84
Tabela 16 - Dietas utilizadas na alimentação de frangos de corte em fase inicial, crescimento e final.....	85
Tabela 17 – Coeficientes de metabolização ileal de aminoácidos em frangos de corte com uso de protease ácida mais alcalina e sua consideração na matriz nutricional para formulação da dieta.....	86

Tabela 18 - Desempenho de crescimento de frangos alimentados com um blend de proteases simultâneo ao uso de um subproduto.....	86
Tabela 19 - Análise econômica de frangos alimentados com um blend de proteases simultâneo ao uso de um subproduto.....	87

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>28</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>31</b>
2.1 PANORAMA AVICULTURA DE CORTE .....	31
2.2 PANORAMA DE RAÇÕES PARA FRANGOS DE CORTE.....	31
2.3 ENZIMAS EXÓGENAS .....	33
2.4 PROTEASE, APLICAÇÃO EM FRANGOS DE CORTE .....	35
2.5 ALIMENTOS ALTERNATIVOS: GRÃOS SECOS DE DESTILARIA COM SOLÚVEIS .....	38
2.6 ATUAÇÃO DA PROTEASE SOB FATORES ANTINUTRICIONAIS .....	40
<b>3 ARTIGO 1: PROTEASE ÁCIDA E ALCALINA NA DIETA DE FRANGOS DE CORTE: EFEITOS SOBRE GANHO DE PESO, METABOLISMO E PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS NA CARNE .....</b>	<b>44</b>
<b>4 ARTIGO 2: BLEND DE PROTEASES ÁCIDA E ALCALINA SOB DIGESTIBILIDADE DE AMINOÁCIDOS EM DIETAS DE FRANGOS DE CORTE .....</b>	<b>45</b>
4.1 RESUMO.....	45
4.2 INTRODUÇÃO .....	46
4.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	47
<b>4.3.1 Protease ácida e alcalina .....</b>	<b>47</b>
<b>4.3.2 Animais, instalação e alimentação.....</b>	<b>47</b>
<b>4.3.3 Desempenho zootécnico.....</b>	<b>47</b>
<b>4.3.4 Coleta de amostras para digestibilidade ileal.....</b>	<b>48</b>
<b>4.3.5 Coleta e histopatologia .....</b>	<b>48</b>
<b>4.3.6 Análise estatística.....</b>	<b>48</b>
4.3 RESULTADOS .....	48
4.4 DISCUSSÃO .....	49
4.5 CONCLUSÕES .....	51
<b>5 ARTIGO 3: BLEND DE PROTEASES ÁCIDA E ALCALINA EM DIETAS COMPOSTAS COM SUBSTITUTOS PROTEICOS (DDGS) NO DESEMPENHO DE FRANGOS DE CORTE .....</b>	<b>57</b>
5.1 RESUMO.....	57
5.2 INTRODUÇÃO .....	58

5.3	MATERIAL E MÉTODOS .....	59
<b>5.3.1</b>	<b>Produtos.....</b>	<b>59</b>
5.3.1.1	<i>Blend sinérgico de proteases .....</i>	59
<b>5.3.2</b>	<b>Animais, instalação e alimentação.....</b>	<b>59</b>
<b>5.3.3</b>	<b>Desempenho zootécnico.....</b>	<b>60</b>
<b>5.3.4</b>	<b>Análise econômica.....</b>	<b>60</b>
<b>5.3.5</b>	<b>Análise estatística.....</b>	<b>61</b>
5.4	RESULTADOS .....	61
5.5	DISCUSSÃO .....	62
5.6	CONCLUSÕES .....	64
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>70</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil é reconhecido como um grande produtor de proteína de aves, por conta de fornecer produtos que atendem padrões de consumo internacional, e pela produção de matéria prima em todas as estações do ano (Abpa, 2023). A produção de carne de frango se estima em 14,524 milhões de toneladas anuais (Abpa, 2023). Porém existem algumas adversidades, como a oscilação do valor de compra de insumos para a produção de rações referente a grande demanda do mercado (Abpa, 2023). Sabe-se que a ração contribui com 75% do custo total de produção avícola, grande impasse para a avicultura (Abpa, 2022).

Uma alternativa para redução de custos produtivos, é o uso da proteína ideal com intuito de minimizar perdas com a digestão e utilização de proteínas, além da inclusão de subprodutos com menor valor aquisitivo (Kidd *et al.*, 2021). A proteína ideal é definida como o exato balanceamento de aminoácidos, para que assim as exigências dos aminoácidos possam ser atendidas para manutenção e produção, com o princípio de que cada aminoácido tenha uma relação com um aminoácido de referência, no caso a lisina (Furuya *et al.*, 2005). A proporção de aminoácidos essenciais no farelo de soja o torna um dos ingredientes proteicos excelente, porque corresponde ao equilíbrio de aminoácidos que as aves em crescimento precisam (Ravindran *et al.*, 2005). Porém no farelo de soja a digestibilidade ileal aparente da proteína bruta é em média de 82%, isso demonstra que 18% não é utilizado (Ravindran *et al.*, 2005).

Além deste fator, o farelo de soja possui alto valor agregado, mas pode ser parcialmente substituído por coprodutos da indústria, como grãos secos de destilaria (DDG) e os grãos secos de destilaria com solúveis (DDGs), por conta de seu alto teor de proteína (Damasceno *et al.*, 2020). Vale ressaltar que a fibra presente nos grãos de milho é convertida em etanol durante a fermentação de seu processo, e isso resulta em uma quantidade maior de polissacarídeos não amiláceos (PNA), conhecidos como fatores antinutricionais (Swiatkiewicz *et al.*, 2016). Os PNAs são um conjunto de fibras conhecidas pela baixa digestibilidade, no momento que presentes nas dietas das aves, aumentam a consistência da digestão e envolvem outros nutrientes, tornando-os indisponíveis para digestão e absorção (Ward, 2021).

Uma forma para resolver ou amenizar estes problemas, pode ser o uso de enzimas exógenas, que podem melhorar a digestibilidade dos alimentos, e permitir menor inclusão de nutrientes como proteínas e aminoácidos, no que reflete em maior rentabilidade de

produção. Desta forma, o objetivo do trabalho foi avaliar se a inclusão de diferentes doses de protease ácida e alcalina e a associação destas com uso de DDGs possibilita maior aproveitamento de aminoácidos e se melhoram a digestibilidade e desempenho zootécnico em frangos de corte.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 PANORAMA AVICULTURA DE CORTE

A carne de frango é a proteína mais consumida entre os brasileiros, o consumo per capita é de 45,2 kg ao ano, com produção de 14,524 milhões de toneladas anualmente (Abpa, 2023). O Brasil fica em segundo lugar na colocação mundial da produção de frangos, atrás apenas dos Estados Unidos (Abpa, 2023).

Do total da produção brasileira 32,17% são exportadas, destes 23,31% são exportações de carne de frango inteiro (Abpa, 2022). Para esta exportação de frango inteiro, 76,62% são destinados para o Oriente médio (Abpa, 2022). No ranking mundial, o oriente médio é a segunda região que mais importa produtos brasileiros, com 29,78% do valor total exportado, no qual o produto frangos da categoria griller são mais cobiçados para a compra (Abpa, 2022).

Além do objetivo de suprir a demanda do mercado pela proteína de frango e suíno, é necessário um produto de alta eficiência produtiva, com baixo custo e de qualidade. Porém na atualidade do ano de 2024, existem alguns desafios, como o valor para a produção de rações, que contribuem com 75,36 % do custo total da produção avícola (Abpa, 2022).

### 2.2 PANORAMA DE RAÇÕES PARA FRANGOS DE CORTE

O custo das matérias primas para fabricação de rações oscilou nos últimos anos, pois houve um aumento no custo capital, supervalorização do dólar nos preços brasileiros e incremento nas transações comerciais (Sindirações, 2022). Esses fatores contribuíram para o encarecimento de ingredientes e insumos importados, que refletiu na produção de matérias primas para a fabricação de rações como, farelo de soja e milho (Sindirações, 2022).

A estimativa da produção de rações para frangos de corte em 2022 foi de 35,8 milhões de toneladas, o custo das rações também aumentou conforme a valorização dos insumos (Sindirações, 2022). Por exemplo, em janeiro de 2019, o custo por tonelada de rações para frangos de corte aumentou em de 120,59% no custo da ração (Sindirações, 2022).

O valor das matérias primas também aumentou, o preço do milho cotado em saca (60 kg) em janeiro de 2020 foi de R\$ 53,39, já n' lqgo ano de 2023 o valor por saca foWi

de R\$ 86,56 (Cepea, 2023). Para o farelo de soja, cotado em toneladas, em janeiro de 2020 o valor foi de R\$ 1331,00 e janeiro de 2023 foi de R\$ 2983,50 (Cepea, 2023).

O farelo de soja teve aumento de 124,15% entre os anos de 2020 a 2023. Este é um dos ingredientes proteicos ideais para a fabricação de rações de frangos de corte, por conta da sua proporção e equilíbrio de aminoácidos semelhante as exigências das aves (Cepea, 2023). Porém, no farelo de soja a digestibilidade ileal aparente da proteína bruta é em média de 82%, isso demonstra que 18% não são utilizados (Ravindran *et al.*, 2005). Assim, sabe-se que os principais alimentos para a fabricação da dieta das aves, como milho e farelo de soja, contêm fatores antinutricionais que diminuem a eficiência de absorção e digestibilidade de nutrientes (O'Neill *et al.*, 2018).

Como forma de minimizar os custos com a alimentação e diminuir os problemas com os fatores antinutricionais, faz-se necessário o uso da proteína ideal, com intuito de minimizar perdas com a digestão e utilização de proteínas (De Araújo Campos *et al.*, 2012). A proteína ideal é definida como o exato balanceamento de aminoácidos, para que assim as exigências das aves possam ser atendidas para manutenção e produção, com o princípio de que cada aminoácido esteja em relação a um aminoácido de referência, este a lisina (Furuya *et al.*, 2005).

Para o crescimento e manutenção de não ruminantes, os tecidos biológicos e os processos metabólicos necessitam de aminoácidos (De Lima Santos *et al.*, 2020). Estes que, se não fornecidos/disponíveis de forma correta, limitam outros nutrientes, assim podem degradar aminoácidos e decorrer em gastos de proteína e redução da síntese proteica (National Research Council, 1994). Uma forma de aumentar a digestibilidade e diminuir o efeito dos fatores antinutricionais é a utilização de enzimas exógenas, bem como o uso da protease, que pode melhorar a disponibilidade de aminoácidos para síntese proteica e eficiência animal (Thanabalan *et al.*, 2021).

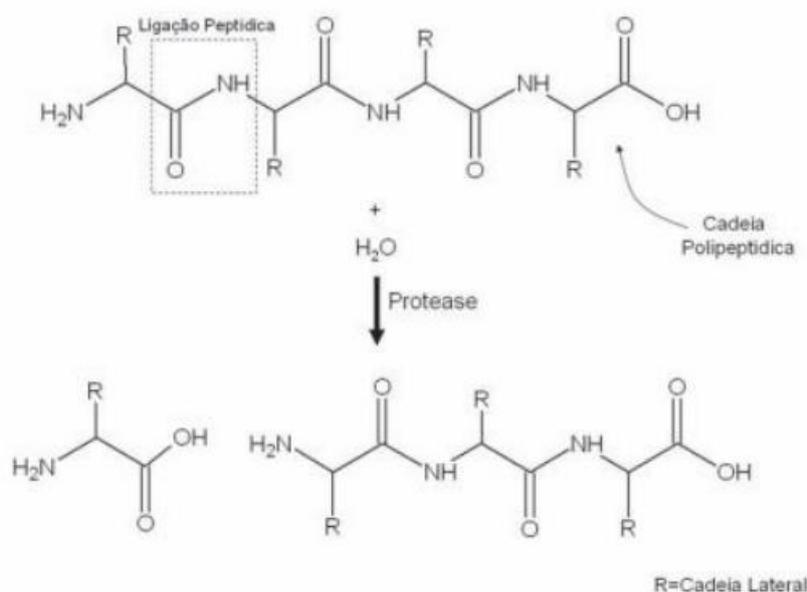
### 2.3 ENZIMAS EXÓGENAS

Enzimas são proteínas, consideradas catalizadores biológicos (Khattak *et al.*, 2006). Estas possuem uma camada tridimensional complexa, que exercem a função de acelerar processos e reações químicas (Erdaw *et al.*, 2016). O efeito catalítico é realizado em condições específicas, de temperatura, umidade, pH, e só atuam em um substrato específico (Bedford e Apajalahti, 2022). O uso destas enzimas na alimentação de não ruminantes iniciou na década de 80, com intuito de melhorar o aproveitamento de energia, polissacarídeos insolúveis, digestibilidade de nutrientes, melhorar a qualidade de cama, excretas e desempenho zootécnico (Liu *et al.*, 2021, Chesson, 1987).

As proteases fazem com que haja reações químicas no sistema biológico, catalisam e retornam em seu estado original ao final da reação, porém, são gastas nestes processos (Figura 1) (Angel e Sorbara, 2014). Para que as ações ocorram no trato gastrointestinal, é necessário que as condições estejam adequadas e que o substrato seja na forma química e física compatível a enzima (Angel e Sorbara, 2014). Com objetivo de melhorar o valor nutricional da ração, aumentar a biodisponibilidade de aminoácidos (Figura 2) e digestibilidade de nutrientes, reduzir efeitos de fatores antinutricionais, melhorar o desempenho zootécnico e a saúde intestinal (Velázquez-de Lucio *et al.*, 2021).

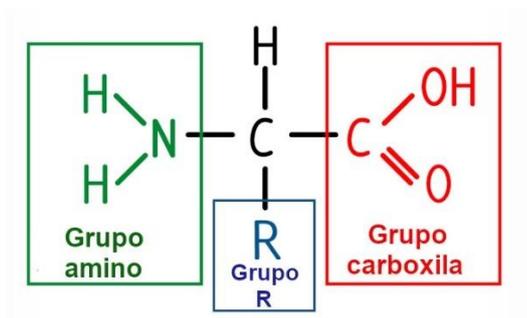
As enzimas exercem suas funções por meio de mecanismos, com início sobre as ligações e componentes que não sofrem ação de hidrólise por enzimas endógenas (Ojha *et al.*, 2019). Em sequência ocorre a degradação de fatores antinutricionais, estes que reduzem a digestibilidade e aumentam a viscosidade da dieta (Ojha *et al.*, 2019). O terceiro mecanismo, ocorre pela ruptura da parede celular e decorre em liberação de nutrientes que estavam aderidos (Ojha *et al.*, 2019). Após realizam a digestão de nutrientes, seguem para a redução das secreções e perda de proteínas endógenas do intestino e por fim, aumentam as enzimas digestivas, antes inexistentes ou insuficiente no organismo do animal, que resulta em maior digestibilidade, em principal a animais jovens com sistema digestivo imaturo (Ojha *et al.*, 2019).

Figura 1- Representação da hidrólise proteica catalisada pela protease.



Fonte: Lima *et al.* (2008)

Figura 2 - Forma química de um aminoácido.



Fonte: Nelson e Cox, (2002)

Para que o mecanismo de ação das enzimas exógenas ocorra, de acordo como descrito acima, é necessário entender que a atividade catalítica das enzimas é influenciada pelo pH, temperatura e especificidade de substrato (Valdivia *et al.*, 2019). Desta forma, enzimas que passam pelo processamento da ração, devem conter especificidades, como resistência ao calor, estabilidade e capacidade de preservar sua atividade ao longo do sistema digestivo animal (Ulo, 2022). Estes são fatores importantes para que haja resposta catalítica em relação ao pH, resistência a proteases digestivas endógenas, tempo de retenção, teor de água e enzimas microbianas (Valdivia *et al.*, 2019). Uma forma de melhorar a eficiência das enzimas é utilizar com especificidade de faixa de pH (ácido ou

alcalino) e encapsulamento, com intuito de estabilizá-la até seu processamento e passagem ao trato gastrointestinal do animal (Pirgozliev *et al.*, 2019).

As proteases têm atuação na hidrólise de ligações peptídicas de aminoácidos. No entanto, existem fatores que comprometem a digestão e absorção de proteínas, estes são os inibidores de proteases ou estrutura da proteína (Díaz Vargas *et al.*, 2022). As proteases endógenas se diferem das exógenas por atuarem apenas na hidrólise de proteínas dietéticas corporais (Mahmood *et al.*, 2017). As enzimas exógenas, além de auxiliarem nesta função, tem a capacidade de atuação frente a fatores antinutricionais, como inibidores de tripsina e lectinas (Cowieson *et al.*, 2017). A suplementação com a protease pode melhorar o desempenho animal, pelo aumento da digestibilidade de aminoácidos (Díaz Vargas *et al.*, 2022). Cardinal *et al.* (2019) observaram a relação de cinco dietas com diferentes proteases para frangos de corte, e constaram que o uso desta enzima em forma neutra mais associação da ácida de forma conjunta 50:50, melhora a conversão alimentar, a digestibilidade total aparente de nitrogênio, aumenta a retenção de nitrogênio e melhora a energia metabolizável das aves.

A composição de rações para aves é a base de milho e soja, e pelo alto valor de produção e oscilação de custos produtivos, podem ser utilizados alimentos alternativos como cereais, grão seco de destilaria com adição de solúveis, cevada, aveia, centeio e entre outros (Velázquez-de, 2021). Estes compostos podem apresentar inibidores de proteases, taninos, ácidos fítico e polissacarídeos não amiláceos, que não são digestíveis para animais não ruminantes (Cardinal *et al.*, 2019). As aves não conseguem hidrolisar polissacarídeos sem amido na parede celular de forma eficiente, por conta da falta de enzimas, o que pode causar baixa eficiência alimentar (Raza *et al.*, 2019). Mas efeitos como estes, podem ser bloqueados por meio de modificação da dieta e pela adição de enzimas exógenas, bem como com o uso de proteases (Raza *et al.*, 2019).

## 2.4 PROTEASE, APLICAÇÃO EM FRANGOS DE CORTE

As proteases são enzimas que fazem parte da família de hidrolases, pois elas possuem função de catalisar ligações peptídicas entre as proteínas e aminoácidos (Qiu *et al.*, 2020). As proteases endógenas são divididas em dois subgrupos, as endopeptidases que tem atuação dentro de uma molécula proteica, têm atividade direta a quebra das cadeias maiores de peptídeos e segmentos de polipeptídios menores, e as exopeptidases,

que possuem atuação no final da cadeia, na porção carboxil e retira um resíduo de aminoácido (Cowieson e Roos., 2016).

A proteína exerce função essencial no desenvolvimento animal e no custo de produção (Kidd *et al.*, 2021). Desta maneira, o uso de proteases na cadeia avícola a cresce, apesar de dietas para não ruminantes serem compostas por milho e farelo de soja, são consideradas dietas com boa digestibilidade (Borda-molina *et al.*, 2019). Porém, existem fatores controversos, como os complexos proteicos que, não são facilmente digestíveis (Borda-molina *et al.*, 2019).

A ideia da protease era auxiliar apenas na degradação de proteínas, ou era secretada apenas para degradar proteínas extracelulares, com intuito de liberar aminoácidos para que outras proteínas pudessem sintetizar. Mas, sabe-se que estas enzimas estão reguladas em diferentes níveis, e que auxiliam desde a expressão até modificações pós-traducionais, como uso na produção animal (Bond, 2019).

A utilização de proteases exógenas, pode atuar na inativação dos fatores antinutricionais, estes os inibidores de tripsina, lectinas e proteínas antigênicas, presentes em leguminosas (Silva *et al.*, 2022., Wedekind *et al.*, 2020). Além disto, a protease exógena pode auxiliar e suplementar na atividade proteolítica, liberar peptídeos menores e potencializar a ação das próprias enzimas endógenas produzidas no organismo do animal (Wedekind *et al.*, 2020).

As proteases endógenas conseguem propor um bom desenvolvimento zootécnico para animais não ruminantes (Rostagno *et al.*, 2017). Porém em consideração a resultados de digestibilidade de proteína, é demonstrado um indicativo de quantidades de aminoácidos, que passam pelo trato gastrointestinal sem serem aproveitados da forma correta (Rostagno *et al.*, 2017). A suplementação com protease exógena tem como objetivo quebrar as ligações de proteínas que são pouco digestíveis, com alta afinidade a se ligar com o amido e formar complexos quelatados de forma quelato (Kamel *et al.*, 2015). As proteases visam otimizar o uso de energia e aminoácidos, aumentar a produção endógena de peptidase, hidrolisar nutrientes, melhorar digestibilidade da proteína dietética, reduzir o turnover proteico e melhorar a eficiência produtiva (Kamel *et al.*, 2015).

A enzima se mostra benéfica a produção, pois em termos técnicos e econômicos, em consideração ao valor da matéria prima para a produção de rações, bem como variabilidade no preço e qualidade de produtos, demonstra resultados positivos na produção, também diminui a excreção de nitrogênio ao solo (Cowieson e Klueber., 2018).

A partir de pesquisas é possível elucidar os mecanismos de ação, dosagens e substratos, além de diferir o funcionamento de diferentes produtos enzimáticos.

Cardinal *et al.* (2019) observaram ao utilizar duas dietas, uma com padrão e outra pobre de inclusão de proteína sob adição de protease, constataram que o uso desta enzima de forma exógena pode melhorar a conversão alimentar de frangos, além de alterar positivamente a espessura epitelial, proliferação de enterócitos e saúde intestinal. Angel *et al.* (2011), avaliou os efeitos do uso de protease monocomponente na dieta de frangos de corte dos 7 aos 22 dias de idade, com a adição da enzima protease na concentração de 200 mg/kg e doses superiores, os autores observaram que a enzima aumentou a digestibilidade de aminoácidos, e possibilitou uma melhor conversão alimentar combinada a maior ganho de peso nas aves. No entanto, os autores deste trabalho não constataram o nível de inclusão da protease ideal e quais seus efeitos econômicos e viáveis na produção de frangos de corte.

A protease pode ser incluída na dieta de aves juntamente com outras enzimas. Singh *et al.*, 2019, adicionaram avaliaram o uso de protease em combinação a xilanase, amilase e prebióticos (XAP) para frangos de corte e avaliaram a digestibilidade, os principais resultados encontrados foram que a digestibilidade de energia ileal aparente e digestibilidade aparente da matéria seca, proteína bruta, de histidina e treonina, amido e energia bruta foi melhorada com combinação de protease mais XAP.

Thanabalan *et al.* (2021) avaliaram a suplementação de um composto multienzimático para frangos de corte que continha protease, fitase e enzimas degradadoras de fibras e verificaram maior digestibilidade de lisina, , maximizou a retenção aparente e metabolismo do teor de energia em consideração ao nitrogênio em dietas compostas com soja integral torrada

As proteases podem ter diversas origens, Lee *et al.* (2023) testaram uma protease de substilisin, produzida por meio de *Bacillus licheniformis*, conhecida como um endopeptidase da família serinaprotease na dieta de frangos de corte. A inclusão da protease teve consideração na matriz nutricional na dieta, e os resultados obtidos com o estudo foram, que a suplementação com a protease exógena na dieta de frangos melhorou numericamente, as condições zootécnicas, ganho de peso, conversão alimentar e eficiência produtiva em relação ao grupo não suplementado (Lee *et al.*, 2023). Neste mesmo estudo Lee *et al.* (2023), verificaram que a suplementação da protease para frangos de corte teve melhor custo econômico alimentar em relação ao grupo controle. Assim como, os autores observaram um aumento na digestibilidade total dos aminoácidos

arginina, glicina, treonina, fenilalanina, metionina, isoleucina, valina e aminoácidos não essenciais totais.

Chen *et al.* (2017) testaram a protease para suínos em fase de crescimento e concluíram que a suplementação melhorou a digestão de proteínas, reduziu o estresse oxidativo em nível intestinal e aumentou o consumo médio diário até a terceira semana de experimento. Devido ao efeito da protease na hidrólise das ligações no dissulfeto de cistina, estas que são encontradas na soja, assim com a hidrólise foi potencializada a digestão de proteínas. Pan *et al.* (2017) constataram que a protease pode melhorar a eficiência e utilização de nitrogênio e diminuir de 8,7% a 11,8%, a excreção de nitrogênio nas fezes de suínos em fase de crescimento.

Diferentes microrganismos, como bactérias e fungos são capazes de produzir proteases, com destaque para cepas como *Bacillus* spp. e *Aspergillus* spp. Cada classe apresenta diferentes métodos de produção dessas enzimas, o método proposto por Perez *et al.* (2007), foi utilizado para a produção de protease de bactérias, aplicada para a produção de protease alcalina, que age entre pH de 7 a 9, e atua na digestão proteica do intestino. Já as proteases obtidas por meio de fungos utilizam método descrito por Gottschalk (1985), para extração, geralmente produzem a protease ácida que, tem atuação ótima em pH entre 2 e 5, com atuação na digestão proteica do estômago. Porém, as proteases utilizadas neste trabalho a base de *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* ainda não foram estudadas a fundo na nutrição animal.

## 2.5 ALIMENTOS ALTERNATIVOS: GRÃOS SECOS DE DESTILARIA COM SOLÚVEIS

A aplicação de coprodutos agroindustriais na nutrição animal, assume importância significativa ao buscar menor custo de produção (Ray *et al.*, 2022). Esta prática não representa apenas uma opção financeira, ela também contribui para a redução do impacto ambiental, e alternativas para destinar de forma rentável os resíduos (Barbacariu *et al.*, 2022). No entanto, é de suma importância conhecer sobre a composição nutricional, limitações, custos e previsões econômicas desses coprodutos para integrar ao sistema de produção de rações, pois é de conhecimento que coprodutos como o DDGs (grãos de destilaria que contêm solúveis), podem apresentar alta variabilidade em seu perfil químico e físico (Meneghetti e Domingues, 2008).

O grão seco de destilaria com solúveis é um coproduto da indústria do etanol, originado a partir da fermentação do amido e de outros cereais (Zhang *et al.*, 2023). Durante o processo de fermentação, o amido do grão é convertido em dióxido de carbono e álcool etílico, e os nutrientes são concentrados até 3 vezes no grão e originam o DDGs (Widyaratne e Zijlstra, 2007). É de conhecimento que uma tonelada de milho resulta em média em 19 litros de óleo bruto degomado, 370 litros de etanol e 230 Kg de DDGs (Conab 2012).

O DDGs é um coproduto de valor nutricional significativo, que contém altas concentrações de proteína bruta (PB) média de 31 %, extrato etéreo (EE) média de 6,6 %, fibra bruta (FB) média de 7,4 %, e cinzas média de 3,8 % (NRC, 2012; Conab 2012). Devido o DDGs resultar do grão, após parte do amido ter sido convertido durante a fermentação, apresenta uma maior concentração de nutrientes (De Freitas Amaral *et al.*, 2023). Ele apresenta níveis de energia digestível (ED) e metabolizável (EM) iguais ou até superiores aos do milho, porém apresenta um média de 7 % de fibra dietética, o que pode ser prejudicial para a digestibilidade de aves, este produto apresenta 50% de digestibilidade inferior em relação ao milho, desta forma seu uso deve ser estudado (De Freitas Amaral *et al.*, 2023).

Devido a essas características e ao seu custo relativamente baixo, o DDGs tem sido amplamente utilizado com sucesso na indústria de alimentos para animais. Damasceno *et al.*, 2020 constataram em um estudo com grãos secos de destilaria com solúvel, que este produto pode ser incluído em dietas para frangos de corte, com taxas de inclusão de até 160 g DDGs/kg, na idade de 0 a 21 dias, sem que haja efeitos adversos no desempenho zootécnico, rendimento de carcaça, qualidade e rendimento da carne.

Em outro estudo de Dal Pont *et al.*, 2023, avaliaram o efeito de enzimas xilanase,  $\beta$ -glucanase, arabinofuranosidase e fitase com uso de DDGs na dieta, e concluíram que o DDGs incluído em até 14%, não há perdas em desempenho em frangos de corte. Já quando as enzimas foram utilizadas, houve uma melhora na conversão alimentar, ganho de peso e consumo de ração, além deste achado, a inclusão de DDGs em 7 e 14% na dieta de frangos modulou a microbiota intestinal e reduziu a presença de Proteobacteria no fígado (Dal Pont *et al.*, 2023).

## 2.6 ATUAÇÃO DA PROTEASE SOB FATORES ANTINUTRICIONAIS

Os fatores antinutricionais são substâncias químicas, em sua maioria metabólitos secundários produzidos por plantas (De Souza *et al.*, 2019). Encontrados em várias classes, as quais destacamos os taninos, polissacarídeos não amiláceos, oxalatos, nitratos, fitatos, inibidores de amilase e inibidores de protease (Nikmaram *et al.*, 2017). Estes compostos possuem a capacidade de reduzir a energia e principalmente a biodisponibilidade de nutrientes essenciais na dieta (Mohan *et al.*, 2016). Estes fatores são considerados prejudiciais para a absorção e aproveitamento da dieta pelos animais, pois levam a diferença entre valores nutricionais fornecidos e valores reais do alimento absorvido (Benevides *et al.*, 2011). Desta maneira, deve-se levar em consideração a biodisponibilidade de nutrientes e energia na equação do valor nutricional do alimento, no momento que será avaliado (Jeyakumar e Lawrence, 2022). Em consideração a estes fatores, é buscado informações sobre a inativação destes (Kerezsi *et al.*, 2022). Os compostos antinutricionais são proteínas e desta forma o processamento térmico pode desnaturar suas moléculas, como consequência, realizar atividade inibitória (Kerezsi *et al.*, 2022).

O milho e o farelo de soja são compostos por 6,92 a 8,8 e 45 a 48% de proteína bruta respectivamente (Rostagno *et al.*, 2017). Já a proporção de fatores antinutricionais presentes no milho e no farelo de soja são de 6,83 e 16,47 % respectivamente (Rostagno *et al.*, 2017). Com a aplicação de tratamentos térmicos sobre estes alimentos, principalmente na soja, é possível inativar parte dos fatores antinutricionais (Kerezsi *et al.*, 2022). Porém, é necessário o cuidado com processamentos térmicos no tratamento da inativação de inibidores, pois podem comprometer a qualidade e integridade do alimento, sabe-se que 20% dos inibidores continuam presentes após o tratamento térmico (Kerezsi *et al.*, 2022).

Os inibidores de proteases, como os inibidores de tripsina são fatores antinutricionais principais para a indisponibilidade de proteínas (Seong *et al.*, 2018). Os grãos utilizados para a fabricação do alimento de aves e suínos contêm os inibidores proteicos de enzimas hidrolíticas, estas como a tripsina, amilase e quimotripsina, que podem afetar o sistema digestivo dos animais (Samtiya *et al.*, 2020). Os inibidores de tripsina mantêm sua atividade por meio de pontes de dissulfeto e de resíduos de cistina, apenas se estes permanecerem intactos, desta forma a clivagem de pontes de dissulfeto

por tratamento de grãos como a soja, com agentes redutores, ou metassulfito de sódio, causam a inativação dos inibidores (Silva e Silva, 2000).

Os inibidores de protease são agrupados nas famílias kunitz e bowman-birk (Norioka *et al.*, 1988). Os inibidores de Bowman-birk são polipeptídios de cadeia simples com aproximadamente 8kDA, com sete pontes de dissulfeto, estes possuem efeitos sobre a inibição de tripsina e quimotripsina, foram isolados em sua primeira vez na soja, mas podem ser encontrados em cereais (Dipietro e Liener, 1989). Já, os inibidores de Kunitz são constituídos por polipeptídios maiores de 20kDA de cadeia, com duas pontes de dissulfeto, se conectam a tripsina em um complexo de 1:1, esta classe de inibidor foi isolada pela primeira vez em soja, que contribui para o potencial inibitório de tripsina (Norioka *et al.*, 1988).

As proteínas com capacidade de inibir enzimas digestivas estão presentes na matéria prima para a fabricação de rações, estas possuem capacidade de retardar o crescimento de animais por interferir na digestão de proteínas (Alves, 2022). No momento em que o animal é exposto a estes fatores, ele tende a adaptação por conta do estímulo antinutritivo, por meio do aumento da atividade do pâncreas, devido a elevada síntese de enzimas pelo órgão, para saciar os sítios de ligação do pool de inibidores e assim liberar tripsina ativa e quimotripsina. Porém, isto decorre em problemas na parede intestinal e perda de nitrogênio endógeno pelo organismo animal (Alves, 2022; Hoffmann *et al.*, 2019).

Observa-se diminuição de absorção em dietas compostas apenas por aminoácidos livres no momento que inibidores de tripsina estão presentes, por conta do aumento de secreção de enzimas digestivas e carga metabólica associada a aminoácidos que contêm enxofre (Nitsan e Liener, 1976). Em um estudo com inibidores de tripsina de soja em dietas de frangos, foi identificado que uso de inibidores de tripsina, afetou negativamente a digestibilidade pré-cecal de aminoácidos e o desempenho zootécnico das aves, de forma linear, com 15 a 30% de inclusão de farelo de soja extraído por bagaço (Kuenz *et al.*, 2022).

No estudo de Kuenz *et al.*, 2022, os aminoácidos foram afetados, porém a cistina apresentou os menores valores na atividade inibidora de tripsina, a qualidade do espectro digestível de aminoácidos diminuiu significativamente, evidente por uma mudança marcante na proporção de aminoácidos que contém enxofre para lisina. Além dos fatores antinutricionais proteicos, existem os polissacarídeos não amiláceos. Esses são divididos em duas categorias, solúveis, PNAs (beta-glucanos, pentosanos e substâncias pécticas) e

os insolúveis, PNA (celulose e hemicelulose) (Franzini *et al.*, 2022). Portanto, estes podem contribuir para a menor digestibilidade proteica, lipídica, mineral e de aminoácidos, por dificultar a hidrólise de enzimas digestivas endógenas do trato gastrointestinal, devido ao seu encapsulamento e/ou interação com proteínas e minerais (Tavernari *et al.*, 2008).

Os PNA podem ser encontrados nas formas de lectinas, inibidores de tripsina, lipoxigenases e antivitaminas, que podem estar presentes na soja integral (Kim *et al.*, 2022). Os frangos são sensíveis a composição dos PNA na dieta, pois esta influência diretamente na taxa de passagem do conteúdo da digesta, composição da microbiota e na saúde intestinal da ave (Kim *et al.*, 2022). As dietas atuais, contêm entre 10 e 12% de PNA totais aproximadamente (Morgan *et al.*, 2021). A fração de PNA aumenta a capacidade de retenção de água e torna o trânsito do trato gastrointestinal lento, aumentam o tempo do bolo alimentar retido que decorre em diminuição de apetite (Warpechowski, 1996). Além de nesta retenção estarem presentes nutrientes insolúveis, que ficam indisponíveis para a digestão no intestino delgado (Morgan *et al.*, 2022).

Na fração dos PNA, as suas cadeias formam uma rede molecular, que aumentam a viscosidade intestinal e reduzem a atuação e acesso das enzimas endógenas á nutrientes presentes na dieta do animal, assim diminuem a digestibilidade da ração (Morgan *et al.*, 2022). Existem enzimas exógenas que auxiliam na melhora da disponibilidade de partículas para a absorção, estas enzimas têm o intuito de minimizar os problemas relacionados aos fatores antinutricionais (Olukosi *et al.*, 2015).

Os arabinosilanos são elementos que compõe a metade dos PNA, no momento em que uma enzima tem atuação sobre a mitigação do impacto dos PNA a base de milho, esta enzima, aumenta a produção de PNA solúveis no íleo, referente a fragmentação de arabinosilanos do produto (Vasanthakumari *et al.*, 2023). Além deste, os arabinosilanos criam uma estrutura em volta dos grânulos de amido e com uso de enzimas pode haver interação com a ruptura dessas estruturas por meio de hidrolização, assim liberam grânulos de amido e proteínas, e aumentam a disponibilidade de compostos para que o animal consiga absorver (Vasanthakumari *et al.*, 2023).

É de conhecimento que os impasses dos PNA proteicos e fatores antinutricionais, induzem efeitos negativos na utilização de nutrientes e no desempenho zootécnico das aves (Franzini *et al.*, 2022). Desta forma, o uso de enzimas exógenas que contribuam para a degradação destes fatores já está em consenso comum em dietas de não ruminantes,

devido a capacidade de melhorar a digestibilidade e absorção do nutriente (Morgan *et al.*, 2021).

Por conta da proteína ser um nutriente caro na dieta de aves, a inclusão de enzimas exógenas e alimentos alternativos como DDGs, permitem reduzir o custo de produção e garantem a eficiência produtiva de acordo com a literatura. Desta forma esta tese visou estudar sobre os diferentes tipos de proteases alcalina e ácida e a associação destas, bem como o uso de DDGs, sob desempenho, saúde intestinal e digestibilidade de frangos em fase de crescimento inicial e desempenho zootécnico de frangos de corte.

**3 ARTIGO 1: PROTEASE ÁCIDA E ALCALINA NA DIETA DE FRANGOS DE CORTE: EFEITOS SOBRE GANHO DE PESO, METABOLISMO E PERFIL DE ACIDOS GRAXOS NA CARNE**

## **4 ARTIGO 2: BLEND DE PROTEASES ÁCIDA E ALCALINA SOB DIGESTIBILIDADE DE AMINOÁCIDOS EM DIETAS DE FRANGOS DE CORTE**

Os resultados desta dissertação são apresentados na forma de artigo, com a seções de acordo com as orientações da Archives of Veterinary Science.

### **4.1 RESUMO**

O objetivo deste estudo foi avaliar se a inclusão de um produto blend a base de protease ácida e alcalina, na dieta de frangos de corte pode melhorar o desempenho zootécnico, digestibilidade de nutrientes, e qualidade intestinal das aves. Foram utilizados 240 pintinhos divididos nos grupos: Controle Positivo (PC), Controle negativo (com redução de 8% de proteína bruta) (NC), NC + Protease 125 g/t (BP125), NC + Protease 250 g/t (BP250). No dia 1 e 21 as aves e a ração foram pesadas para análise de desempenho e foi realizado um ensaio de digestibilidade dos 17 a 21 dias. Para desempenho zootécnico, o maior peso corporal e ganho de peso, foram observados nas aves dos grupos PC e BP150 ( $P = 0,001$ ). Para digestibilidade de nutrientes observamos que o grupo BP250 teve maior digestibilidade dos aminoácidos triptofano ( $P = 0,042$ ), treonina ( $P = 0,034$ ) e cisteína ( $P = 0,034$ ). Também foi possível constatar uma melhor relação vilosidade e cripta, quando é utilizado protease em dieta de baixa proteína ( $P = 0,05$ ). Como conclusão, a protease pode ser utilizada como estratégia alimentar, pois possibilita aumento da digestibilidade e ganho em índices zootécnicos em dietas com menor quantidade de proteína e aminoácidos.

**Palavras-chave:** Frangos de corte, Proteases, Digestibilidade, Aminoácidos.

## 4.2 INTRODUÇÃO

Em aves a digestão de proteínas é conduzida por meio das proteases endógenas, e este processo ocorre em duas etapas, primeiro no estomago, ambiente ácido, e segundo no intestino delgado, por meio de digestão pancreática (Applegate et al. 2014). Apesar de ocorrer liberação de proteases endógenas, a digestão das proteínas não é totalmente completa, entre 18 a 20% da proteína que passa pelo trato gastrointestinal não são digeridas (Nir et al. 1993; Lemme et al. 2004). Desta forma, a avicultura busca maneiras para atender a demanda da população com eficiência na produção e qualidade do produto final. Nesse contexto, a utilização de enzimas na alimentação de frangos de corte ganha destaque como uma estratégia promissora (Jang et al. 2022). Entre as enzimas exógenas, as proteases ácidas e alcalinas têm sido objeto de estudo, devido ao seu potencial em melhorar o desempenho de aves, e por sua atuação em diferentes porções do intestino (Avazkhanloo et al. 2020).

As proteases desempenham um papel crucial na quebra de proteínas em peptídeos e aminoácidos, que permite a utilização eficiente dos nutrientes contidos na dieta (Aderibigbe et al. 2020). Nos últimos anos, pesquisas tem se concentrado em compreender o potencial das proteases na melhoria do desempenho e da saúde das aves de corte e principalmente digestibilidade de proteína (Velázquez et al. 2021). Lee et al. (2023) conduziram um estudo para avaliar os efeitos da suplementação de uma protease de substilisina, produzida a partir de *Bacillus licheniformis*, na dieta de frangos de corte. A inclusão da protease foi considerada na formulação nutricional da dieta e os resultados indicaram que a suplementação com a protease exógena melhorou numericamente as condições zootécnicas, a digestibilidade, o ganho de peso, a conversão alimentar e a eficiência produtiva em comparação com o grupo não suplementado (Lee et al., 2023). Assim nossas hipóteses foram que o blend de enzimas exógenas irá potencializar digestibilidade de proteína nas dietas; e que o uso das enzimas vai manter a produtividade de frangos de corte, com dietas com níveis baixos de proteína. Desta forma, o objetivo do estudo foi avaliar se a inclusão do blend de proteases pode melhorar a digestibilidade o desempenho zootécnico e saúde intestinal de frangos de corte.

## 4.3 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.3.1 Protease ácida e alcalina

Neste experimento foi formulado um blend de proteases, oriundas da fermentação de *Aspergillus niger*, (fonte da protease aspártica, equivalente a pepsina), *Bacillus subtilis* (fonte da protease Serina, equivalente a tripsina), e farinha de alfarroba, com níveis de garantia de mínimos de protease de 20,000 U/g.

### 4.3.2 Animais, instalação e alimentação

O experimento foi realizado na Fazenda experimental da Udesc Oeste (FECEO), localizada no município de Guatambu. Todos os procedimentos de criação das aves e de coleta de material biológico foram aprovados pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais em Pesquisa da UDESC, sob o protocolo 4173200223. Foram utilizados 240 pintinhos machos Cobb 500 de um dia de vida, adquiridos de uma empresa comercial de Chapecó. As aves foram alojadas em gaiolas metabólicas, com alimentação e água *ad libitum*. O aquecimento das aves foi realizado com climatizadores e aquecedores elétricos. O manejo de luz seguiu as recomendações do manual da linhagem (Cobb, 2012).

O experimento teve duração de 21 dias, a dieta fornecida às aves foi a base de milho e soja, de acordo com as recomendações da tabela para linhagem Cobb 500 (Cobb, 2012), tabela 9 e tabela 10. Foi utilizado um delineamento casualizado com quatro tratamentos, com 10 repetições por tratamento e seis aves por repetição, conforme detalhado na tabela 11.

### 4.3.3 Desempenho zootécnico

Nos dias 1 e 21 as aves foram pesadas por meio de uma balança digital, assim como a quantidade de ração fornecida e as sobras. Por meio dos dados obtidos foram calculados o peso corporal e ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar, consumida dividida pelo ganho de peso corrigido pela mortalidade peso médio de aves.

#### **4.3.4 Coleta de amostras para digestibilidade ileal**

No dia 21 de experimento, quatro aves por repetição foram eutanasiadas, em seguida retirado o conteúdo intestinal presente no íleo. O conteúdo ileal foi congelado (-80°C) por sete dias, em seguida foi realizada a liofilização das amostras. O conteúdo intestinal seco e as rações foram enviadas para laboratório comercial (CBO – São Paulo) para fins de quantificar os aminoácidos através da metodologia de HPLC (high performance liquid chromatography) conforme descrito por White et al. (1986) e Hagen et al. (1989) e método enzimático para triptofano conforme descrito por Lucas e Sotelo (1980). Nestas amostras também foi determinado a proteína bruta, conforme descrito em Compêndio Brasileiro (2017).

O coeficiente de digestibilidade foi determinado a partir da seguinte fórmula:  
Coeficiente de Digestibilidade (%) = [(Nutriente Ingerido - Nutriente Excretado) / Nutriente Ingerido] x 100 conforme descrito por Andriquetto et al. (1982).

#### **4.3.5 Coleta e histopatologia**

No dia 21, foram realizadas coletas para as análises histopatológicas, foram coletadas amostras do intestino (jejuno) dos frangos e alocadas em recipientes com formol a 10%, em seguida foram realizados cortes histológicos, que foram corados com hematoxilina e eosina, para posterior avaliação do comprimento de criptas e vilosidades, conforme o método descrito por Caruso e Demonte (2005).

#### **4.3.6 Análise estatística**

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade das variâncias (Shapiro and Wilk, 1965). Todos os dados foram analisados usando o "procedimento MIXED" do SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC, EUA; versão 9.4) a fim de determinar o efeito do tratamento. A significância foi definida pelo teste de Tukey quando  $P \leq 0,05$ .

### **4.4 RESULTADOS**

Os resultados de desempenho de crescimento desse experimento estão apresentados na Tabela 12. Maior peso corporal e ganho de peso, foram observados nos

grupos, PC e BP150, seguido do grupo BP250, comparado ao NC ( $P = 0,001$ ). As aves do NC tiveram a maior conversão alimentar e menor índice de eficiência produtiva (IEP) comparado aos demais tratamentos ( $P = 0,001$ ).

Na tabela 13 foi apresentado dos resultados de coeficiente de digestibilidade aparente (CDA) de nutrientes e dos aminoácidos. O coeficiente de digestibilidade de treonina ( $P = 0,034$ ), cisteína ( $P = 0,034$ ) e triptofano ( $P = 0,042$ ) foram maiores nas aves do BP250 quando comparado ao NC. O coeficiente de digestibilidade da arginina foi maior nas aves do tratamento PC comparado aos demais, e o tratamento BP250 em relação ao grupo NC teve maior digestibilidade de arginina ( $P < 0,001$ ).

Na tabela 14, estão descritos os resultados para micrometria intestinal de frangos de corte com 21 dias. Foi observado maior altura de vilosidade no PC em relação aos demais ( $P = 0,05$ ), já para a relação de vilosidade e cripta, o grupo PC foi superior ao grupo NC, e os tratamentos BP125 e BP250, foram semelhantes a ambos os grupos ( $P = 0,05$ ). Não foi observada diferença estatística para profundidade de cripta ( $P > 0,05$ ).

#### 4.5 DISCUSSÃO

Os mecanismos pelos quais a protease pode melhorar a conversão alimentar e o ganho de peso estão relacionados a hidrólise das proteínas, feitas pela protease, desta forma a inclusão da protease exógena pode aprimorar o processo de digestão das proteínas, fracionando-as em aminoácidos e pequenos peptídeos que são absorvidos facilmente pelas células epiteliais do intestino (Cowieson e Roos, 2016). Outro ponto a ser levado em consideração, são as proteínas vegetais e os fatores antinutricionais presentes nos ingredientes, com a adição da enzima exógena é possível aumentar e facilitar a digestão (Adeola e Cowieson, 2011). Em relação aos fatores antinutricionais, Aderibigbe et al. (2020), testaram o uso da protease em dietas com inclusão de inibidores de tripsina, e concluíram que a adição da protease monocomponente melhora o desempenho de crescimento e a digestibilidade do aminoácidos em frangos de corte, devido ao aumento do transportador de aminoácido catiônico (SLC7A-2), isso indica que a presença de uma protease exógena pode influenciar a modulação da absorção de peptídeos, possivelmente devido à maior disponibilidade de aminoácidos liberados no intestino (Cowieson et al. 2017).

Com o uso da protease para frangos de corte, foi observado melhora na digestibilidade de aminoácidos, como treonina, cistina e triptofano. Thanabalan et al. (2021), observaram que a adição de um produto com protease, aumentou numericamente a digestibilidade de arginina, histidina, isoleucina, metionina, e treonina, que foram 2,0, 4,2, 1,8, 2,5, 2,0, 2,8 %, respectivamente. Já Siegert et al. (2019), testaram o uso da protease para frangos de corte e observaram que, os aminoácidos treonina, triptofano, arginina, lisina, leucina, foram melhorados de 1 a 3% na digestibilidade pré cecal de aminoácidos. Lee et al. (2023), utilizaram de subtilisina produzida por *Bacillus licheniformis*, e esta aumentou a digestibilidade total de arginina, treonina, glicina, isoleucina, metionina, fenilalanina, valina e aminoácidos essenciais totais, e digestibilidade total de triptofano, o que corrobora com nossos resultados encontrados neste estudo.

O aumento da digestibilidade está relacionado a mitigação dos efeitos adversos dos fatores antinutricionais presentes especialmente no farelo de soja como inibidores de tripsina e quimotripsina, o qual reflete em baixo desempenho, como também na digestibilidade de aminoácidos (Erdaw et al. 2016). Além dos fatores antinutricionais, no momento que ocorre desequilíbrio entre os aminoácidos a excreção destes aumenta. Desta forma, quando há redução de proteína bruta na dieta de aves, juntamente a presença de fatores antinutricionais, ocorre um desequilíbrio e aumenta a excreção de aminoácidos sem serem aproveitados no trato gastrointestinal das aves (Lee et al. 2023). Estudos demonstram que a protease pode aumentar a hidrólise de proteínas como lectinas e inibidores de tripsina, conhecidas como fatores antinutricionais, e assim com essa maior hidrólise ocorre maior liberação de aminoácidos para absorção dos animais, que reflete na melhora a digestibilidade de aminoácidos em frangos de corte (Tajudeen et al. 2022; Lee et al. 2023; Siegert et al. 2019). Essa maior digestibilidade de nutrientes também responde a melhor conversão alimentar e melhor desempenho, como observamos em nosso estudo, no qual houve maior desempenho zootécnico diretamente relacionado a melhor digestibilidade.

Para comprimento de vilosidades, constatamos que a adição da protease demonstrou menores valores em relação ao grupo controle positivo, composto com maior quantidade de proteína, este fato pode estar atrelado a quantidade de fatores antinutricionais na dieta. Sabe-se que o processo de desenvolvimento das vilosidades ocorre da base ao ápice, o que implica que as células mais antigas se encontrem na superfície das vilosidades, desta forma quando a, menores valores de comprimento de

vilosidades pode-se relacionar a menor renovação tecidual, já que os nutrientes estavam disponíveis para a absorção e não há necessidade de um crescimento exponencial de vilosidades ou uma troca intensa de tecido para possibilitar a absorção de nutrientes (Metzler-Zebeli et al. 2017). Cowieson et al. (2018), explicam que a protease, pode fornecer a quantidade suficiente e disponível de nutrientes, em especial aminoácidos, desta forma as aves não precisam desenvolver a vilosidade para compensar o aproveitamento dos nutrientes disponíveis no lúmen intestinal.

#### 4.6 CONCLUSÕES

Com o segundo estudo, verificamos que o uso de protease ácida e alcalina em forma de blend na dosagem 250g/ton, é uma excelente estratégia para melhorar a digestibilidade da proteína bruta na dieta, assim como dos aminoácidos, cistina, treonina, arginina e triptofano, em frangos de corte até 21 dias de idade.

## ANEXOS

*Tabela 9 - Rações iniciais usadas para alimentação de pintinhos usados no experimento II.*

<b>Ingredientes</b>	<b>PC</b>	<b>NC</b>	<b>BP125</b>	<b>BP250</b>
Milho Grão	589,800	621,600	621,600	621,600
Farelo De Soja 46% PB	352,200	310,700	310,700	310,700
Óleo De Soja	4,160	-	-	-
Fosfato Bicálcico	21,030	21,200	21,200	21,200
Calcário Calcítico 36%	7,3760	7,257	7,257	7,257
Caulim	0,125	14,570	14,570	14,570
Celite	10,00	10,000	9,873	9,748
L-Lisina 80%	2,856	2,845	2,845	2,845
DL-Metionina 98%	3,712	3,309	3,309	3,309
L-Treonina 98%	1,705	1,565	1,565	1,565
Sal Comum Moído	3,055	3,013	3,013	3,013
Bicarbonato Sódio	1,621	1,628	1,628	1,628
Premix vitamínico	0,250	0,248	0,248	0,248
Premix mineral	0,500	0,495	0,495	0,495
Bentonita	1,000	0,990	0,990	0,990
Cloreto De Colina 60%	0,500	0,495	0,495	0,495
Blend de proteases	-	-	0,125	0,250
<b>SubTotal</b>	<b>1.000</b>	<b>1.000</b>	<b>1.000</b>	<b>1.000</b>
Custo / kg	2,469	2,350	2,353	2,355
Energ. Met Aves_Kcal/Kg	2.899,000	2.871,000	2.871,000	2.871,000
Proteína Disponível Total %	22,000	20,250	20,250	20,250
Gordura Bruta %	3,158	2,797	2,797	2,797
Fibra Bruta %	3,455	3,251	3,251	3,251
Amido %	42,640	44,750	44,750	44,750
Cinzas %	6,128	7,340	7,340	7,340
Cálcio Disp Total %	1,000	1,000	1,000	1,000
Fósforo Total %	0,720	0,720	0,720	0,720
Fósforo Disponível %	0,500	0,500	0,500	0,500
Lisina Total %	1,417	1,301	1,301	1,301
Lisina Dig. Aves %	1,260	1,158	1,158	1,158
Met Total %	0,697	0,636	0,636	0,636
Met+Cist Total %	1,047	0,963	0,963	0,963
Met+Cist Dig. Aves %	0,945	0,869	0,869	0,869
Treonina Total %	0,981	0,902	0,902	0,902
Treonina Dig. Aves %	0,857	0,788	0,788	0,788
Triptofano Total %	0,281	0,256	0,256	0,256
Triptofano Dig. Aves %	0,235	0,213	0,213	0,213
Lis:M+C Total %	0,739	0,740	0,740	0,740
Lis:M+C Aves %	0,750	0,750	0,750	0,750

Lis:Tre Total %	0,692	0,693	0,693	0,693
Lis:Tre Aves %	0,680	0,680	0,680	0,680
Colina Total_Mg/Kg	1.600,000	1.600,000	1.600,000	1.600,000
Sódio %	0,200	0,198	0,198	0,198
Cloro %	0,300	0,297	0,297	0,297
Na+K-Cl_Meq/Kg	225,944	207,001	207,001	207,001

OBS: 1. CP - Controle Positivo (CP - Níveis nutricionais que atendem o requerimento); CN - Controle Negativo (CN = Controle Positivo – 8% de PB e aminoácidos); BP125 (Dieta controle negativo mais o blend de proteases na dosagem 125g/t); BP250 (Dieta controle negativo mais o blend de proteases na dosagem 250g/t); OBS2. Premix vitamínico: A KUI/KG >32.000,000; D3 KUI/KG >8.000,000; E UI/KG >60.000,000; K3 MG/Kg >6.000,000; B1 MG/Kg >7.200,000; B2 MG/Kg >20.000,000; B6 MG/Kg >9.600,000; B12 MCG/Kg >40.000,000; B3 MG/KG >108.000,000; B5 MG/KG >36.000,000; B7 MCG/KG >160.000,000. OBS3. Premix mineral: Mn PPM >140.000,000; Zn PPM >120.000,000; Fe PPM >100.000,000; Cu PPM >16.000,000; I PPM >1.600,000; Se PPM >600,000.

*Tabela 10 - Composição química, energética e aminoacídica das dietas experimentais.*

Composição química das rações experimentais				
	PC	NC	BP125	BP250
MS, %	90,090	90,020	89,640	89,530
Rações MO, (MS%)	92,740	91,640	91,300	92,950
EE	3,240	2,88	2,95	3,09
EB rações MN	3935	3848	3854	3912
EB rações MS	4368	4274	4300	4427
PB rações MN	22,600	22,700	21,800	21,500
Composição aminoacídica das rações experimentais				
Ácido Aspártico (%)	2,340	2,320	2,290	2,410
Ácido Glutâmico (%)	3,970	3,940	3,910	4,150
Serina (%)	1,070	1,050	1,030	1,120
Glicina (%)	0,920	0,920	0,910	0,970
Histidina (%)	0,550	0,550	0,540	0,550
Taurina (%)	<0,01(LQ)	<0,01(LQ)	<0,01(LQ)	<0,01(LQ)
Arginina (%)	1,430	1,440	1,410	1,490
Treonina (%)	1,020	1,010	0,940	1,070
Alanina (%)	1,160	1,150	1,150	1,200
Prolina (%)	1,270	1,260	1,260	1,290
Tirosina (%)	0,740	0,740	0,750	0,770
Valina (%)	0,970	0,970	0,980	1,010
Metionina (%)	0,550	0,590	0,580	0,540
Cisteina (%)	0,260	0,260	0,260	0,190
Isoleucina (%)	0,860	0,860	0,870	0,870
Leucina (%)	1,840	1,810	1,830	1,930
Fenilalanina (%)	1,120	1,110	1,100	1,180

Lisina (%)	1,280	1,290	1,260	1,300
Hidroxi prolina (%)	<0,010(LQ)	<0,010(LQ)	<0,010(LQ)	<0,010(LQ)
Triptofano (%)	0,60	0,580	0,560	0,550
Soma dos Aminoácidos (%)	21,940	21,840	21,610	22,580
Proteína Bruta (%)	22,530	22,290	21,860	22,590

OBS: 1. CP - Controle Positivo (CP - Níveis nutricionais que atendem o requerimento); CN - Controle Negativo (CN = Controle Positivo – 8% de PB e aminoácidos); BP125 (Dieta controle negativo mais o blend de proteases na dosagem 125g/t); BP250 (Dieta controle negativo mais o blend de proteases na dosagem 250g/t); OBS: 2. MS: matéria seca; MO: Matéria orgânica; EE: Extrato etéreo; EB: Energia bruta; MN: Matéria natural; PB: Proteína bruta.

*Tabela 11 - Representação do delineamento experimental.*

Tratamento	Características
Controle Positivo (PC) – n=10	Dieta basal farelada, com níveis nutricionais que atendem a exigência das aves.
Controle Negativo (NC) – n=10	Dieta basal menos 8% de proteína bruta.
CN + Protease 125 (BP125) – n=10	Dieta controle negativo, mais 125g/t de protease.
CN + Protease 250 (BP250) – n=10	Dieta controle negativo, mais 250g/t de protease.

*Tabela 12 - Desempenho zootécnicos de pintinhos nos primeiros 21 dias de vida.*

Tratamentos	Peso corporal, kg	Consumo, kg	Ganho peso, kg	Conversão alimentar	IEP (%)
PC	0,919 <sup>a</sup>	1,153	0,874 <sup>a</sup>	1,319 <sup>b</sup>	331,8 <sup>a</sup>
NC	0,842 <sup>c</sup>	1,125	0,797 <sup>c</sup>	1,410 <sup>a</sup>	273,1 <sup>c</sup>
BP125	0,894 <sup>ab</sup>	1,160	0,849 <sup>ab</sup>	1,368 <sup>ab</sup>	298,7 <sup>b</sup>
BP250	0,881 <sup>b</sup>	1,152	0,836 <sup>b</sup>	1,379 <sup>ab</sup>	304,2 <sup>b</sup>
CV (%)	0,521	0,324	0,507	0,455	12,3
P-valor	0,001	0,785	0,001	0,001	0,001

OBS:  $P \leq 0,05$  ilustra diferença entre os tratamentos, sendo a letra subscritas (a-c) diferentes usadas para diferenciar os grupos na mesma coluna. OBS: 2. CP - Controle Positivo (CP - Níveis nutricionais que atendem o requerimento); CN - Controle Negativo (CN = Controle Positivo – 8% de PB e aminoácidos); BP125 (Dieta controle negativo mais o blend de proteases na dosagem 125g/t); BP250 (Dieta controle negativo mais o blend de proteases na dosagem 250g/t); OBS: 3. IEP: Índice de eficiência produtiva.

*Tabela 13 - Coeficientes de metabolização ileal de aminoácidos estimados com uso de indicador em pintinhos que receberam dieta com níveis normais de proteína e redução de 8%, assim como adição na dieta com protease.*

	PC	NC	BP125	BP250	P valor	CV(%)
Ácido Aspartico (%)	88,900	80,800	85,300	90,700	0,053	4,403
Ácido Glutâmico(%)	90,100	84,700	88,500	92,300	0,104	3,674
Serina(%)	85,500	76,900	82,000	88,400	0,054	5,221
Glicina(%)	83,000	72,800	78,900	86,000	0,057	6,298
Histidina(%)	86,500	79,400	84,600	89,000	0,100	4,878
Arginina(%)	99,900 <sup>a</sup>	85,000 <sup>c</sup>	89,600 <sup>bc</sup>	92,300 <sup>b</sup>	<0,001	2,936
Treonina(%)	84,900 <sup>ab</sup>	74,500 <sup>b</sup>	80,400 <sup>ab</sup>	87,300 <sup>a</sup>	0,034	5,442
Alanina(%)	85,600	78,400	83,600	89,000	0,123	5,643
Prolina(%)	87,300	80,700	85,500	90,100	0,082	4,417
Tirosina(%)	86,400	78,800	85,300	90,000	0,095	5,465
Valina(%)	84,600	76,400	82,900	88,400	0,102	6,165
Metionina(%)	95,500	93,100	95,100	96,100	0,232	1,790
Cisteína(%)	81,200 <sup>a</sup>	68,100 <sup>b</sup>	78,600 <sup>ab</sup>	81,300 <sup>a</sup>	0,034	6,428
Isoleucina(%)	86,000	78,800	84,600	89,200	0,143	5,782
Leucina(%)	87,200	81,000	85,800	90,600	0,140	5,138
Fenilalanina(%)	88,300	82,100	86,900	91,600	0,115	4,735
Lisina(%)	88,700	81,800	86,400	90,000	0,159	4,805
Triptofano(%)	82,400 <sup>ab</sup>	71,300 <sup>b</sup>	77,800 <sup>ab</sup>	84,000 <sup>a</sup>	0,042	5,971
Aminoácidos(%)	87,500	80,300	85,300	90,000	0,086	4,705
Proteína bruta	84,760	77,910	82,050	88,100	0,082	4,997

OBS:  $P \leq 0,05$  ilustra diferença entre os tratamentos, sendo a letra subscritas (a-c) diferentes usadas para diferenciar os grupos na mesma coluna. OBS: 2. CP - Controle Positivo (CP - Níveis nutricionais que atendem o requerimento); CN - Controle Negativo (CN = Controle Positivo – 8% de PB e aminoácidos); BP125 (Dieta controle negativo mais o blend de proteases na dosagem 125g/t); BP250 (Dieta controle negativo mais o blend de proteases na dosagem 250g/t).

*Tabela 14 - Micrometria de jejuno de pintinhos alimentados com blend de proteases.*

Grupo	Vilosidade ( $\mu\text{m}$ )	Cripta ( $\mu\text{m}$ )	Relação vilo/cripta
Dias 21			
PC	1223 <sup>a</sup>	200	6,080 <sup>a</sup>
NC	1052 <sup>b</sup>	198	5,310 <sup>b</sup>
BP125	1092 <sup>b</sup>	198	5,500 <sup>ab</sup>
BP250	1092 <sup>b</sup>	200	5,450 <sup>ab</sup>
CV	14,200	7,600	0,510
P-valor	<b>0,050</b>	0,940	<b>0,050</b>

OBS:  $P \leq 0,05$  ilustra diferença entre os tratamentos, sendo a letra subscritas (a-c) diferentes usadas para diferenciar os grupos na mesma coluna. OBS: 2. CP - Controle Positivo (CP - Níveis nutricionais que atendem o requerimento); CN - Controle Negativo (CN = Controle Positivo – 8% de PB e aminoácidos); BP125 (Dieta controle negativo mais o blend de proteases na dosagem 125g/t); BP250 (Dieta controle negativo mais o blend de proteases na dosagem 250g/t).

## 5 ARTIGO 3: BLEND DE PROTEASES ÁCIDA E ALCALINA EM DIETAS COMPOSTAS COM SUBSTITUTOS PROTEICOS (DDGS) NO DESEMPENHO DE FRANGOS DE CORTE

Os resultados desta dissertação são apresentados na forma de artigo, com a seções de acordo com as orientações da Archives of Veterinary Science.

### 5.1 RESUMO

O objetivo do trabalho foi avaliar se o uso de um blend sinérgico de proteases termoestáveis (ácida e alcalina) e o uso de DDGs possibilitam potencializar o desempenho zootécnico de aves e diminuir o custo produtivo. Desta forma, foi realizado um experimento com 720 pintainhos machos Cobb 500, divididos em seis tratamentos. Os tratamentos foram, CPF – controle positivo; CNF – controle negativo, CNF125 – controle negativo mais protease; CPD – controle positivo com composição de DDGs; CNF – controle negativo com composição de DDGs, CNF125 – controle negativo com 7% de DDGs mais protease. O maior ganho de peso total e ganho de peso diário foi observado nos CPF e CNG125 comparado aos demais ( $P < 0,05$ ) Para conversão alimentar os tratamentos CPF e CNF125 obtiveram as melhores conversões em relação os grupos CND e CND125 ( $P=0,001$ ). O custo (R\$) médio em kg da ração foi reduzido conforme a diminuição de nutrientes na dieta, e o menor custo se manteve no momento em que a enzima foi utilizada, observamos uma diferença de -0,06 e -0,12 reais, quando comparamos os grupo CPF e CPD com os grupos CNF125 e CND125. Para índice de eficiência produtiva o grupo CPF e CNF125 tiveram as melhores IEF. Com o uso da protease e DDGs há diminuição do custo de ração, porém para produzir a quantidade de frango semelhante a dietas com níveis normais, necessita de um maior consumo de ração o que leva ao maior custo produtivo.

**Palavras-chave:** Subprodutos; enzima exógena, produtividade, frango.

## 5.2 INTRODUÇÃO

Os custos relacionados à alimentação animal, em específico para aves, desempenham um papel importante na determinação da rentabilidade, estes que podem representar até 75% dos custos variáveis associados à produção (Abpa, 2022). Por esse motivo, os estudos se concentram na busca de alternativas que possam reduzir o custo da ração e melhorar o aproveitamento de nutrientes usando enzimas ou diferentes fontes proteicas (Pan et al. 2017).

Os grãos secos de destilaria com solúveis (DDGs) são um subproduto proteico, oriundo do processo de fermentação da produção de bioetanol, que representa uma fonte de proteínas, ricas em aminoácidos, energia e fósforo, semelhante ao farelo de soja (Jaworski et al. 2015). Apesar de ser um bom substituto proteico, o uso deste produto enfrenta um desafio, devido à variação em sua composição nutricional (níveis de triptofano, arginina e lisina) e qualidade (Sun et al. 2023). Neste subproduto existem as reações de Maillard, que resultam na digestibilidade ileal aparente e padronizada da lisina baixa, e podem afetar negativamente a digestibilidade, além disto, o teor de polissacarídeos não amiláceos presentes são considerados fatores antinutricionais, pois impactam na disponibilidade de nutrientes (Chen et al. 2020).

A fibra dietética total, representa cerca de 7%, sendo aproximadamente três vezes maior do que a encontrada no milho, com uma digestibilidade aparente da fibra de menos de 50% (Jang et al. 2019). Portanto, um excesso de DDGs nas dietas de aves pode resultar em menor digestibilidade da matéria seca e desempenho zootécnico (Sun et al. 2023). Assim, a adição de enzimas a dietas que contém DDGS se torna uma alternativa promissora, pois é sabido que a enzima protease se mostra benéfica em frente aos problemas relacionados a digestibilidade (Rho et al. 2017).

No entanto, devido a suas características e custo relativamente baixo, comparado ao farelo de soja é 253% mais barato e ao milho 10%, o DDGs tem sido amplamente usado na indústria de alimentos para aves e suínos (Damasceno et al. 2020). Estudos indicam que pode ser incluído em dietas para frangos de corte até 160 g/kg, sem efeitos adversos no desempenho zootécnico, rendimento de carcaça e qualidade da carne (Damasceno et al. 2020; Velázquez et al. 2021; Aderibigbe et al. 2020).

Além de poucos estudos que abordem o uso do DDGS em relação a protease, falta determinar qual a melhor dose de inclusão desta enzima na dieta de aves de 1 a 42 dias.

Desta forma, o objetivo do presente projeto é validar a matriz da protease para frangos de corte em relação ao impacto zootécnico e relação custo-benefício.

## 5.3 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.3.1 Produtos

#### 5.3.1.1 Blend sinérgico de proteases

No experimento foi utilizado um blend sinérgico de proteases termoestáveis, a ácida obtida pela fermentação do *Aspergillus niger* (fonte da protease aspártica, equivalente a pepsina), e a protease alcalina foi obtida pela fermentação do *Bacillus subtilis* (fonte da protease Serina, equivalente a tripsina), ambas com níveis de garantia 20000 U/g de protease, oriundas de uma empresa comercial.

### 5.3.2 Animais, instalação e alimentação

O experimento foi realizado na Fazenda experimental da Universidade do Estado de Santa Catarina (Udesc Oeste - FECEO), localizada no município de Guatambu-Santa Catarina (SC). Todos os procedimentos de criação das aves e de coleta de material biológico foram aprovados pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais em Pesquisa da UDESC, sob o protocolo 6268231023.

Foram utilizados ao total de 720 pintainhos machos Cobb 500, de um dia de vida, adquiridos de uma empresa comercial de Chapecó-SC. Foram alojados em um galpão com cama de maravalha de reuso, a instalação conta com comedouros tipo tubular, bebedouros automáticos tipo nipple, sistema de climatização por pressão negativa e aquecimento por meio de campanulas e aquecedor.

No alojamento, os pintinhos foram pesados e distribuídos aleatoriamente, as aves foram alocadas em boxes de 2 m<sup>2</sup>, cada um considerado como uma unidade experimental. As aves foram divididas em seis tratamentos com oito repetições e 15 aves por repetição, com alimentação e água *ad libitum*. O manejo das aves seguiu como padrão o manual de

manejos da linhagem comercial (Cobb, 2012). A dieta fornecida às aves, foi formulada a base de milho e farelo de soja, e em três tratamentos foi realizada a inclusão de um eventual substituto proteico, o DDGs com 30% de proteína e 7% de inclusão nestes tratamentos, de acordo com as recomendações do material suplementar informativo sobre rendimento e nutrição da linhagem Cobb (Cobb, 2022). Foram utilizadas três formulações diferentes para as fases: inicial (1 a 21 dias), crescimento (22 a 33 dias) e final (34 a 39). O delineamento experimental foi em blocos casualizados (DBC), sendo os tratamentos representados na Tabela 15, enquanto as dietas utilizadas neste experimento estão descritas na Tabela 16. Para o uso da protease na dieta, foi considerado a liberação de aminoácidos (lisina e treonina) conforme Tabela 17.

### **5.3.3 Desempenho zootécnico**

Nos dias 1, 21, 33 e 40, as aves, a quantidade de ração fornecida e as sobras de ração, foram mensuradas com auxílio de uma balança digital. Por meio dos dados obtidos foram calculados, consumo de ração diário, peso corporal e ganho de peso, ganho de peso diário e conversão alimentar.

Após os dados tabulados e analisados, foi realizado a análise de índice de eficiência produtiva (IEP), para este foram utilizados os dados de ganho de peso diário, viabilidade (%) e conversão alimentar, conforme a formula a seguir.

$$\text{IEP} = ((\text{Ganho de peso diário (Kg)} \times \text{Viabilidade (\%)}) / \text{Conversão alimentar}) \times 100.$$

### **5.3.4 Análise econômica**

Para a análise econômica foram utilizados, o peso final das aves e a quantidade de ração consumida. O custo médio de cada ração foi oriundo de planilhas de custo da empresa que forneceu o produto, no qual foi considerado o valor da enzima utilizada (R\$ 87,39 por kg). Assim foram calculados, o valor da ração de cada tratamento, para determinar o custo com alimentação por ave foi multiplicado o consumo (kg) pelo valor (R\$) de quilogramas da ração. Para calcular os Kg produzidos, foram considerados o peso inicial e o peso final nas aves, o valor do frango vivo, foi obtido por meio dos dados da Epagri/Cepa (Epagri, 2023). A renda líquida foi obtida por meio do custo total de produção menos o valor de venda das aves, o custo total de produção foi obtido ao

considerar se que a , no ração contribui com 75% do valor total de produção, logo 25% foram considerados como demais custos produtivos, o mesmo foi utilizado para os calculos de custo total por tratamento (Abpa, 2022).

### 5.3.5 Análise estatística

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade das variâncias (Shapiro and Wilk, 1965). Todos os dados foram analisados usando o "procedimento MIXED" do SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC, EUA; versão 9.4) a fim de determinar o efeito do tratamento. A significância foi definida com o teste de tukey quando  $p \leq 0,05$ .

## 5.4 RESULTADOS

Os resultados de desempenho e crescimento estão apresentados na Tabela 18. Entre o período de 1 a 21 dias não houve diferença estatística entre os tratamentos para as variáveis peso médio inicial, peso médio final, consumo de ração, ganho de peso total, ganho de peso diário e conversão alimentar ( $P > 0,05$ ). No período de 1 a 33 dias a conversão alimentar demonstrou diferença entre os tratamentos, sendo que as aves do grupo CPF tiveram a melhor conversão alimentar em relação aos grupos CND e CND125, porém os tratamentos CNF, CNF125 e CPD foram semelhantes a ambos os tratamentos ( $P = 0,05$ ). Os demais resultados de peso médio inicial, peso médio final, consumo de ração ganho de peso total e ganho de peso diário não demonstraram diferença estatística ( $P > 0,05$ ). Já de 1 a 40 os grupos CPF e CNF125 tiveram os maiores pesos em relação aos grupos CPD e CND. Para ganho de peso total e ganho de peso diário podemos observar que os maiores ganhos foram nos tratamentos CPF e CNF125 em relação aos demais tratamentos ( $P = 0,014$ ;  $P = 0,013$ ). Para conversão alimentar é observado que os tratamentos CPF e CNF125 obtiveram as melhores conversões em relação os grupos CND e CND125 ( $P = 0,001$ ).

Na Tabela 19, estão apresentados os resultados econômicos do experimento. Pode-se observar que o custo médio em kg da ração, foi reduzido conforme a diminuição de nutrientes na dieta e também quando o subproduto é utilizado, e o menor custo se manteve no momento em que a enzima foi utilizada, observamos uma diferença de R\$ -0,06 e -

0,12, quando comparamos os grupo CPF e CPD com os grupos CNF125 e CND125. Para o custo com ração por ave, os grupos com o uso de subproduto tiveram os menores custos por ave. A renda líquida da produção apresentou maiores ganhos nos grupos CPF e CNF em relação aos demais tratamentos. Em relação aos ganhos por tratamento, podemos observar que no momento que utilizamos um subproduto, o lucro de produção diminui, mas quando utilizamos a protease com o subproduto, os ganhos são semelhantes a uma dieta com níveis proteicos ótimos. Desta forma, podemos observar que, o uso da protease diminui o custo de ração, porém para produzir a quantidade de frango semelhante a dietas com níveis normais, necessita de um maior consumo de ração o que leva ao maior custo produtivo.

Na Figura 3 estão demonstrados o índice de eficiência produtiva (IEF), pode-se observar de forma geral que o uso de uma dieta sem adição de produtos alternativos demonstra melhor índice de eficiência produtiva, se comprarmos os tratamentos o grupo CPF e CNF125 tiveram os melhores IEF, em sequência o grupo CNF, seguido por CPD e CND125 em relação ao grupo CND que teve o pior IEF ( $P > 0,05$ ).

## 5.5 DISCUSSÃO

Adição de 125 g/ton do blend de proteases na dieta, com farelo de soja com 10% menos PB melhora a conversão alimentar, porém o mesmo não ocorreu quando a fonte proteica foi o DDGs. A protease utilizada junto ao farelo de soja, consegue manter a conversão alimentar nos mesmos níveis, mas quando incluímos DDGs a protease não tem o mesmo efeito sobre a conversão alimentar em frangos de corte. Liu et al. (2023) observaram que a adição de 50, 200 e 400 g/t de protease para frangos de corte em uma dieta composta de DDGs, , piorou a conversão alimentar comparado ao controle positivo, e com a adição 100 g/t de protease. Barekatin et al. (2013) confirmaram que a interação da protease com DDGs pode melhorar a conversão alimentar na fase inicial das aves, porém quando o DDGs é utilizado sem a enzima, piora a conversão alimentar e aumenta o consumo de ração. Lee et al. (2023), verificaram que a adição de uma protease obtida por meio de *Bacillus licheniformis*, na dosagem de 50g/t, melhora a conversão alimentar de frangos de corte na fase inicial em 5,55% e 5,78% na fase final. Rehman et al. (2018), observaram que em uma dieta com diminuição de 0,5% de PB e 7% de aminoácidos com

a inclusão de protease na dosagem de 100 g/t, há melhora na conversão alimentar em frangos de corte. Esta melhora na conversão alimentar é devida as proteases catalisarem a hidrólise de proteínas, quebrando as proteínas em pequenos peptídeos e aminoácidos, desta forma são absorvidos pelas células intestinais (Rehman et al. 2018). Além deste fato, as proteases teriam influência na facilitação da digestão de proteínas vegetais, que são de difícil digestão por conta dos fatores antinutricionais presentes nas plantas, assim a adição com protease aumenta a disponibilidade de proteína na dieta e reflete em melhor conversão alimentar (Adeola e Cowieson, 2011).

Para ganho de peso corporal é possível notar que com a inclusão da protease, em dietas a base de farelo de soja com redução nos níveis de nutrientes, existe similaridade com dietas de níveis nutricionais ótimos, mas quando adicionamos DDGs na dieta o ganho de peso dos frangos diminui. Cordeiro et al. (2022), utilizaram um produto com protease para frangos com diferentes níveis de DDGs em até 8% de inclusão, e observaram que a adição das enzimas não teve o efeito desejável, pois teve efeito linear decrescente para ganho de peso com redução 0,004, 0,0033 e 0,0162 kg nas idades de 7, 21 e 42 respectivamente. Khose et al. 2017 recomendaram a substituição do farelo de soja por DDGs, no entanto, com a inclusão de enzimas exógenas para garantir melhoras nos parâmetros de desempenho e compensar a uso do subproduto (Khose et al. 2017). Liu et al. (2023), testaram uma protease para frangos de corte, com dietas com níveis reduzidos em 1% PB e 5% de aminoácidos, onde a dieta destas aves continham 10% de DDGs em sua composição. Os mesmos autores observaram que as dosagens de 50g/t, 100 g/t, 200 g/t e 400 g/t de protease aumentaram o ganho de peso das aves na fase final de produção. Autores relatam que as aves compensam a diminuição de proteína com o aumento do consumo alimentar, no entanto, a suplementação com a protease tem o objetivo de melhorar a digestão e absorção de proteínas, e assim como consequência é válido que as aves aumentem o ganho de peso ao longo das fases (Cowieson e Roos, 2016; Khose et al. 2017; Rehman et al. 2018).

No momento em que uma enzima é utilizada em uma formulação, esta é associada a um valor de matriz, que indica a quantidade de nutrientes que podem ser liberados quando a dieta tem a suplementação da enzima (Lee et al. 2023). esta forma, o uso de enzimas exógenos são uma alternativa para reduzir os custos de ração/dieta (Lee et al 2023). Desta maneira, é possível reduzir a proteína bruta e os níveis de aminoácidos nas dietas com o uso da protease. Porém ao não se considerar a matriz nutricional da enzima na formulação o custo econômico das dietas pode não ser potencializado (Ndazigaruye et

al. 2019). Lee et al. (2023) citam em seu trabalho com o uso de protease, que não há diferença significativa no custo total do produto final entre os tratamentos utilizados, porém citam uma economia de \$0,08 no quilo de ração com o uso da protease. É de conhecimento que o uso do DDGs vem como um subproduto com objetivo de diminuir custos de produção. Damasceno et al. (2020), utilizaram a dosagem de 160 g/kg de DDGs na dieta de frangos de corte, de 1 a 42 dias, e observaram uma redução no uso de 193,9 g/kg de farelo de soja e 187,1 g/kg de milho em relação ao subproduto, isto sem que houvesse efeitos adversos no desempenho zootécnico das aves. Isto difere do que observamos em nosso estudo, onde percebemos que com a inclusão do produto houve diminuição no desempenho zootécnico das aves, como uma redução de 6,66% na conversão alimentar final acumulada, quando comparamos o grupo CNF125 com o grupo CND125.

## 5.6 CONCLUSÕES

O uso de protease na dosagem de 125g/t mantém o desempenho e a conversão alimentar de frangos de corte. Efeito observado em dietas com farelo de soja e com DDGs. No entanto, o uso de 7% de DDGs, reduziu o desempenho das aves. O uso de protease reduz o valor da ração sem prejudicar o desempenho das aves. Por outro lado, o uso de DDGs interfere no desempenho das aves e deve ser considerado como uma estratégia para redução de custos por kg de ração, dependendo das oscilações de preços do mercado.

## ANEXOS

*Tabela 15 - Representação do delineamento experimental de tratamentos utilizados para frangos de corte até 39 dias.*

Tratamento	Composição das dietas
Controle Positivo (CPF)	Dieta basal farelada com níveis nutricionais que atendem a exigência das aves, utilizando de farelo de soja.
Controle Negativo (CNF)	Dieta basal com consideração a digestibilidade de aminoácidos, e uso de farelo de soja.
Controle Negativo + protease (CNF125)	Dieta do controle negativo, mais 125g/ton do produto utilizando de farelo de soja.
Controle Positivo (CPD)	Dieta basal farelada com níveis nutricionais que atendem a exigência das aves, com inclusão de 7% de DDGs.
Controle Negativo (CND)	Dieta basal com consideração a digestibilidade de aminoácidos, houve a inclusão de 7% de DDGS.
Controle Negativo + protease (CND125)	Dieta do controle negativo, mais 125g/t de protease ácida, houve a inclusão de 7% de DDGS.

*Tabela 16 - Dietas utilizadas na alimentação de frangos de corte em fase inicial, crescimento e final.*

Composição da dieta	Inicial 1-21dias				Crescimento 22-33dias				Final 36-42dias			
	CPF	CNF	CPD	CND	CPF	CNF	CPD	CND	CPF	CNF	CPD	CND
Milho grão	594,25	607,02	570,46	583,28	645,49	658,26	611,57	624,35	641,38	665,62	625,99	638,77
Farelo de soja 46%	362,70	343,92	307,87	289,08	310,07	291,29	231,72	212,94	291,70	270,86	193,14	174,35
DDGS 30%	0,00	0,00	70,00	70,00	0,00	0,00	100,00	100,00	0,00	0,00	120,00	120,00
Óleo de Soja	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	18,55	14,68	10,00	10,00
Caulim	0,13	5,69	5,00	10,53	7,71	13,28	14,63	20,19	5,00	5,00	1,02	6,59
Celite	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	10,00	10,00	10,00	10,00
Fosfato bicálcico	25,33	25,54	26,15	26,35	15,85	16,06	17,02	17,22	14,45	14,64	15,82	16,02
Calcário Calcítico 36%	3,66	3,63	3,10	3,06	6,93	6,89	6,12	6,08	6,49	6,47	5,55	5,52
L-Lisina80%	2,51	2,67	4,34	4,50	2,83	2,99	5,45	5,61	2,18	2,38	5,41	5,57
DL-Metionina98%	3,53	3,41	4,23	4,11	3,36	3,23	4,36	4,24	2,97	2,83	4,15	4,03
L-Treonina98%	1,56	1,79	2,48	2,71	1,44	1,67	2,75	2,98	0,92	1,15	2,50	2,73
Sal Comum moído	4,08	4,08	4,12	4,12	4,23	4,23	4,29	4,29	4,27	4,27	4,33	4,33
Bentonita	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Blend 11 Frango	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Blend 91 Mineral Aves	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Cloreto de Colina 60%	0,50	0,50	0,50	0,50	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35
<b>Níveis Nutricionais</b>												
E. Met AvesKCal/kg	2900,0	2900,0	2900,0	2900,0	2950,0	2950,0	2950,0	2950,0	3050,0	3050,0	3050,0	3050,0
Proteína DisP Total %	22,00	21,26	22,00	21,26	20,00	19,26	20,00	19,26	19,00	18,26	19,00	18,26
Gordura Bruta %	2,78	2,80	3,12	3,13	2,88	2,90	3,36	3,38	4,68	4,35	4,49	4,51
Fibra Bruta %	3,53	3,44	3,13	3,04	3,29	3,20	2,72	2,63	3,17	3,08	2,50	2,41
Cálcio Total %	0,96	0,96	0,96	0,96	0,80	0,80	0,80	0,80	0,74	0,74	0,74	0,74
Fósforo Total %	0,80	0,80	0,84	0,83	0,61	0,61	0,66	0,65	0,58	0,57	0,63	0,63
Fósforo Disponível %	0,58	0,58	0,58	0,58	0,40	0,40	0,40	0,40	0,37	0,37	0,37	0,37
Lisina Total %	1,42	1,38	1,56	1,52	1,30	1,26	1,50	1,46	1,20	1,16	1,43	1,39
Lisina Dig. Aves %	1,26	1,23	1,26	1,23	1,16	1,13	1,16	1,13	1,06	1,03	1,06	1,03
Met Total %	0,69	0,67	0,84	0,82	0,64	0,62	0,87	0,85	0,59	0,57	0,86	0,84
Metionina Dig. Aves %	0,65	0,63	0,69	0,66	0,61	0,59	0,66	0,64	0,56	0,54	0,62	0,60
Cistina Total %	0,36	0,35	0,32	0,31	0,33	0,32	0,27	0,26	0,32	0,31	0,25	0,24
Cistina Dig. Aves %	0,29	0,28	0,26	0,25	0,27	0,26	0,22	0,21	0,26	0,25	0,20	0,19
Met+Cist Dig. Aves %	0,94	0,91	0,94	0,91	0,88	0,85	0,88	0,85	0,82	0,79	0,82	0,79
Treonina Dig. Aves %	0,86	0,86	0,86	0,86	0,78	0,78	0,78	0,78	0,70	0,70	0,70	0,70
Colina Total mg/kg	1632,4	1587,5	1464,6	1419,7	1437,7	1392,8	1198,0	1153,0	1383,8	1340,0	1098,6	1053,7
Sódio %	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20

OBS: CPF - Controle Positivo (CPF - Níveis nutricionais que atendem o requerimento com base em farelo de soja);

CNF - Controle Negativo (CN = Controle Negativo farelo de soja- aminoácidos); CNF125 (Controle negativo farelo de soja mais 125 g/t do blend de protease), CPD - Controle Positivo (CPF - Níveis nutricionais que atendem o requerimento com 7 % de DDGs); CND - Controle Negativo (CN = Controle Negativo com 7% de DDGs); CND125 (Controle negativo 7% de DDGs mais 125 g/t do blend de protease). OBS2. Premix vitamínico: A KUI/KG >32.000.000; D3 KUI/KG >8.000.000; E UI/KG >60.000.000; K3 MG/Kg >6.000.000; B1 MG/Kg >7.200.000; B2 MG/Kg >20.000.000; B6 MG/Kg >9.600.000; B12 MCG/Kg >40.000.000; B3 MG/KG >108.000.000; B5 MG/KG >36.000.000; B7 MCG/KG >160.000.000. OBS3. Premix mineral: Mn PPM >140.000.000; Zn PPM >120.000.000; Fe PPM >100.000.000; Cu PPM >16.000.000; I PPM >1.600.000; Se PPM >600.000.

*Tabela 17 – Coeficientes de metabolização ileal de aminoácidos em frangos de corte com uso de protease ácida mais alcalina e sua consideração na matriz nutricional para formulação da dieta.*

<b>Aminoácidos</b>	<b>Digestibilidade ileal sem uso do blend de protease</b>	<b>Digestibilidade ileal com inclusão de 125g/t do blend de protease</b>	<b>Absorção de aminoácidos</b>
Lisina	1,290	1,260	0,033
Treonina	1,010	0,940	0,070

*Tabela 18 - Desempenho de crescimento de frangos alimentados com um blend de proteases simultâneo ao uso de um subproduto.*

<b>Trat</b>	<b>PMI kg</b>	<b>PMF kg</b>	<b>CDR kg</b>	<b>GPT kg</b>	<b>GPD kg</b>	<b>CA Kg/kg</b>
<b>Período de 1-21 dias</b>						
CPF	0,046	0,866	0,065	0,819	0,039	1,664
CNF	0,047	0,846	0,064	0,799	0,038	1,689
CNF125	0,047	0,869	0,065	0,822	0,039	1,670
CPD	0,047	0,845	0,065	0,799	0,038	1,719
CND	0,047	0,848	0,065	0,801	0,038	1,703
CND125	0,048	0,859	0,067	0,811	0,039	1,723
Erro padrão	0,001	0,025	0,008	0,025	0,003	0,015
Valor P	0,970	0,452	0,785	0,436	0,428	0,107
<b>Período de 1-33 dias</b>						
CPF	0,046	1,918	0,102	1,877	0,057	1,794 <sup>b</sup>
CNF	0,047	1,855	0,100	1,766	0,054	1,867 <sup>ab</sup>
CNF125	0,047	1,820	0,102	1,795	0,054	1,869 <sup>ab</sup>
CPD	0,047	1,858	0,103	1,847	0,056	1,843 <sup>ab</sup>
CND	0,047	1,844	0,102	1,773	0,054	1,904 <sup>a</sup>

CND125	0,048	1,813	0,105	1,816	0,055	1,906 <sup>a</sup>
Erro padrão	0,001	0,097	0,015	0,098	0,003	0,018
Valor P	0,970	0,258	0,854	0,246	0,214	<b>0,050</b>
<b>Período de 1-40 dias</b>						
CPF	0,046	2,796 <sup>a</sup>	0,126	2,747 <sup>a</sup>	0,070 <sup>a</sup>	1,792 <sup>c</sup>
CNF	0,047	2,725 <sup>ab</sup>	0,126	2,678 <sup>bc</sup>	0,068 <sup>ab</sup>	1,852 <sup>ab</sup>
CNF125	0,047	2,754 <sup>a</sup>	0,126	2,707 <sup>a</sup>	0,069 <sup>a</sup>	1,816 <sup>bc</sup>
CPD	0,047	2,591 <sup>c</sup>	0,124	2,539 <sup>c</sup>	0,065 <sup>c</sup>	1,912 <sup>ab</sup>
CND	0,047	2,565 <sup>c</sup>	0,124	2,483 <sup>c</sup>	0,064 <sup>c</sup>	1,944 <sup>a</sup>
CND125	0,048	2,603 <sup>bc</sup>	0,127	2,565 <sup>bc</sup>	0,066 <sup>bc</sup>	1,937 <sup>a</sup>
Erro padrão	0,001	0,031	0,021	0,035	0,001	0,022
Valor P	0,97	<b>0,014</b>	0,291	<b>0,014</b>	<b>0,013</b>	<b>0,0011</b>

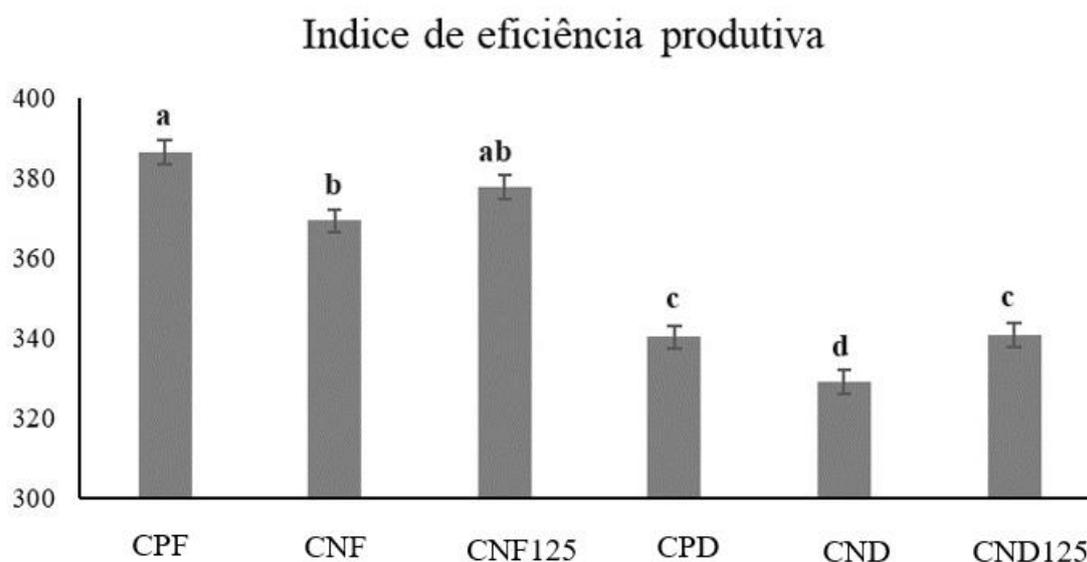
OBS:  $P \leq 0,05$  ilustra diferença entre os tratamentos, sendo a letra subscritas (a-c) diferentes usadas para diferenciar os grupos na mesma coluna. OBS: 2. CPF - Controle Positivo (CPF - Níveis nutricionais que atendem o requerimento com base em farelo de soja); CNF - Controle Negativo (CN = Controle Negativo farelo de soja-aminoácidos); CNF125 (Controle negativo farelo de soja mais 125 g/t do blend de protease), CPD - Controle Positivo (CPF - Níveis nutricionais que atendem o requerimento com 7 % de DDGs); CND - Controle Negativo (CN = Controle Negativo com 7% de DDGs); CND125 (Controle negativo 7% de DDGs mais 125 g/t do blend de protease). OBS 3: PMI – Peso médio Inicial; PMF – Peso médio final, CDR – Consumo diário de ração, GPT – Ganho de peso total, GPD – Ganho de peso diário, CA – Conversão alimentar.

*Tabela 19 - Análise econômica de frangos alimentados com um blend de proteases simultâneo ao uso de um subproduto.*

Variável	CPF	CNF	CNF125	CPD	CND	CND125
Consumo ração (Kg)	4,93	4,91	4,89	4,86	4,89	4,94
Custo médio/kg de ração (R\$)	2,20	2,16	2,17	2,08	2,04	2,05
Kg produzidos/animal	2,75	2,70	2,66	2,54	2,52	2,56
Valor do frango vivo (R\$)	4,58	4,58	4,58	4,58	4,58	4,58
Custo com ração /animal (R\$)	10,86	10,60	10,61	10,11	10,00	10,15
Renda líquida (R\$)	1,70	1,74	1,53	1,50	1,50	1,52
Custo/kg produzido (R\$)	4,04	4,02	4,09	4,07	4,07	4,07
Custo total por tratamento (R\$)	1332,75	1302,38	1303,00	1243,42	1230,39	1248,48
Ganho por tratamento (R\$)	1536,42	1510,59	1486,43	1423,87	1409,86	1430,43
Lucro por tratamento (R\$)	203,67	208,21	183,43	180,45	179,47	181,94

OBS:  $P \leq 0,05$  ilustra diferença entre os tratamentos, sendo a letra subscritas (a-c) diferentes usadas para diferenciar os grupos na mesma coluna. OBS: 2. CPF - Controle Positivo (CPF - Níveis nutricionais que atendem o requerimento com base em farelo de soja); CNF - Controle Negativo (CN = Controle Negativo farelo de soja-aminoácidos); CNF125 (Controle negativo farelo de soja mais 125 g/t do blend de protease), CPD - Controle Positivo (CPF - Níveis nutricionais que atendem o requerimento com 7 % de DDGs); CND - Controle Negativo (CN = Controle Negativo com 7% de DDGs); CND125 (Controle negativo 7% de DDGs mais 125 g/t do blend de protease).

Figura 3 - Índice de eficiência produtiva de frangos de corte alimentados blend de proteases simultâneo ao uso de um subproduto.



OBS:  $P \leq 0,05$  ilustra diferença entre os tratamentos, sendo a letra subscritas (a-c) diferentes usadas para diferenciar os grupos na mesma coluna. OBS: 2. CPF - Controle Positivo (CPF - Níveis nutricionais que atendem o requerimento com base em farelo de soja); CNF - Controle Negativo (CN = Controle Negativo farelo de soja-aminoácidos); CNF125 (Controle negativo farelo de soja mais 125 g/t do blend de protease), CPD - Controle Positivo (CPF - Níveis nutricionais que atendem o requerimento com 7 % de DDGs); CND - Controle Negativo (CN = Controle Negativo com 7% de DDGs); CND125 (Controle negativo 7% de DDGs mais 125 g/t do blend de protease).

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o primeiro experimento, com frangos em fase inicial, observamos que as dosagens de protease ácida mais alcalina, 250 g/ton e 500 g/ton, resultaram em melhor conversão alimentar e manteve o ganho de peso na dosagem 250 g/ton, além de uma maior retenção de nitrogênio. No segundo estudo, verificamos que o uso de protease ácida e alcalina em forma de blend na dosagem 250g/ton melhorou a digestibilidade da proteína bruta e aminoácidos na dieta de frangos de corte até 21 dias de idade. Já no terceiro estudo a dosagem 125g/ton mantém o desempenho de crescimento e conversão alimentar de frangos de corte, com uma dieta de 10% dos níveis proteicos reduzidos, efeito observado tanto em um dieta a base de farelo de soja, quanto uma dieta composta com DDGs, porém observamos que o uso de 7% de DDGs reduz o desempenho zootécnico das aves, em relação a custos de produção a protease reduz o valor da dieta sem que haja perdas no desempenho e o uso do DDGs interfere no desempenho porém reduz o custo da dieta.

Para frangos de corte o uso da protease manteve a produtividade e índices zootécnicos em relação a uma dieta com níveis ótimos de proteína, além disto a protease possibilita uma diminuição no custo de produção de rações.

## REFERÊNCIAS

ABPA, Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório Anual 2022**. Disponível em: <https://abpa-br.org/abpa-lanca-relatorio-anual-2022/>. Acesso em: 26 jan. 2023.

ABPA, Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório Anual 2023**. Disponível em: <https://abpa-br.org/abpa-lanca-relatorio-anual-2023/>. Acesso em: 18 out. 2023.

ADEBIYI, A. O.; OLUKOSI, O. A. Apparent and standardized ileal amino acid digestibility of wheat distillers dried grains with solubles with or without exogenous protease in broilers and turkeys. **Poultry Science**, v. 56, p. 239-246, 2015.

ADEOLA, O.; COWIESON, A. J. Board-invited review: opportunities and challenges in using Exogenous enzymes to improve nonruminant animal production. **Journal of animal science**, v. 89, n. 10, p. 3189-3218, 2011.

ADERIBIGBE, A.; COWIESON, A. J.; SORBARA, J. O.; PAPPENBERGER, G.; ADEOLA, O. Growth performance and amino acid digestibility responses of broiler chickens fed diets containing purified soybean trypsin inhibitor and supplemented with a monocomponent protease. **Poultry science**, v. 99, n. 10, p. 5007-5017, 2020.

AHMADI, M.; YAGHOBFAR, A.; TABATABAEI, S.H. Study of effects difference levels of crude protein and amino acid of diet on intestinal morphological and blood biological parameters of poultry. **Biology Forum**, n. 7, p. 666-670, 2015.

ALVES, W. J. Avaliação do processamento da soja integral extrusada e da protease em dietas para frangos de corte. **Universidade Federal de Viçosa**, 2022.

ANDRIGUETTO, J. M.; PERLY, L.; MINARDI, I. A. As bases e os fundamentos da nutrição animal. **Nutrição animal**, v. 1, 1982.

ANGEL, C. R.; SAYLOR, W.; VIEIRA, S. L.; WARD, N. Effects of a monocomponent protease on performance and protein utilization in 7-to 22-day-old broiler chickens. **Poultry science**, v. 90, p. 2281-2286, 2011.

ANGEL, R.; SORBARA, J. O. B. Why is it important to understand substrates if we are to optimize exogenous enzyme efficacy?. **Poultry Science**, v. 93, n. 9, p. 2375-2379, 2014.

APPLEGATE, T.J.; ANGEL, R. Nutrient requirements of poultry publications: History and need for an update. **Journal Applied Poultry Science**, v. 23, p. 567-575, 2014.

ATTIA, Y. A.; BOVERA, F.; WANG, J.; AL-HARTHI, M. A.; KIM, W. K. Multiple amino acid supplementations to low-protein diets: effect on performance, carcass yield, meat quality and nitrogen excretion of finishing broilers under hot climate conditions. **Animals**, v. 10, p. 973, 2020.

AVAZKHANLOO, M.; SHAHIR, M. H.; KHALAJI, S.; ANARKOOLI, I. J. Flaxseed extrusion and expansion coupled with enzyme and pelleting changed protein and lipid

molecular structure of flaxseed and improved digestive enzymes activity, intestinal morphology, breast muscle fatty acids and performance of broiler chickens. **Animal Feed Science and Technology**, v. 260, p. 114341, 2020.

BARBACARIU, C. A.; RIMBU, C. M.; DIRVARIU, L.; BURDUCEA, M.; BOIANGIU, R. S.; TODIRASCU-CIORNEA, E.; DUMITRU, G. Evaluation of DDGS as a low-cost feed ingredient for common carp (*Cyprinus carpio* Linneus) cultivated in a semi-intensive system. **Life**, v. 12, n. 10, p. 1609, 2022.

BAREKATAIN, M. R.; ANTIPATIS, C.; CHOCT, M.; IJI, P. A. Interaction between protease and xylanase in broiler chicken diets containing sorghum distillers' dried grains with solubles. **Animal Feed Science and Technology**, v.182, n. 1-4, p. 71-81, 2013.

BEDFORD, M. R.; COWIESON, A.J. Matrix values for exogenous enzymes and their application in the real world. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 29, n. 1, p. 15-22, 2020.

BEDFORD, M. R.; APAJALAHTI, J. H. Role of feed enzymes in maintaining gut health in birds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 102, n. 5, p. 1759-1770, 2022.

BENEVIDES, C. M. D. J.; SOUZA, M. V.; SOUZA, R. D. B.; LOPES, M. V. Fatores antinutricionais em alimentos: revisão. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 18, n. 2, p. 67-79, 2011.

BERTECHINI, A.G. Nutrição de monogástricos. **Lavras ufa**. v.301, p. 129-163, 2012.  
BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 21, p. 911-917, 1959.  
BOND, J.S. Proteases: History, discovery, and roles in health and disease. **Journal of Biological Chemistry**, v. 294, n. 5, p. 1643-1651, 2019.

BORDA-MOLINA, D.; ZUBER, T.; SIEGERT, W.; CAMARINHA-SILVA, A. D.; FEUERSTEIN, D.; RODEHUTSCORD, M. Effects of protease and phytase supplements on small intestinal microbiota and amino acid digestibility in broiler chickens. **Poultry science**, v. 98, n. 7, p. 2906-2918, 2019.

CARDINAL, K. M.; MORAES, M. L. D.; ANDRETTA, I.; SCHIRMANN, G. D.; BELOTE, B. L.; BARRIOS, M. A.; RIBEIRO, A. M. L. Desempenho de crescimento e saúde intestinal de frangos de corte alimentados com uma dieta padrão ou com baixo teor de proteína com a adição de uma protease. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 48, 2019.

CARUSO M.; DEMONTE A. Histomorfometria do intestino delgado de ratos submetidos a diferentes fontes protéicas. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 16, n. 2, p. 131-136, 2005.

CEPEA. CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA. [s.l:s.n.]. Disponível em: <<https://www.scotconsultoria.com.br/noticias/autor-ver/39/cepeaesalqusp/>>. Acesso em: 26 jan. 2023.

CHEN, H.; ZHANG, S.; PARK, I.; KIM, S. W. Impacts of energy feeds and supplemental protease on growth performance, nutrient digestibility, and gut health of pigs from 18 to 45 kg body weight. **Animal Nutrition**, v. 3, n. 4, p. 359-365, 2017.

CHESSON, A. Supplementary enzymes to improve the utilization of pig and poultry diets. **Recent advances in animal nutrition**, v. 1987, p. 71-89, 1987.

COBB., 2012. Manual de manejo de frango de corte.

COBB., 2020. Cobb500 pollo de engorde suplemento informativo sobre rendimiento y nutrición.

Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal, 2017, método 45.

CONAB. **COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO**. [s.l: s.n.].

Disponível

em:<[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12\\_03\\_28\\_12\\_11\\_19\\_007a-12\\_-\\_proc\\_simplificado\\_-\\_prod\\_etanol\\_-\\_milho-\\_mt.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_03_28_12_11_19_007a-12_-_proc_simplificado_-_prod_etanol_-_milho-_mt.pdf)>. Acesso em: 19. Mai. 2023.

CONAB. **COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO**. [s.l: s.n.].

Disponível em:<<https://abpa-br.org/wp-content/uploads/2023/04/Relatorio-Anual-2023.pdf>>. Acesso em: 25 ago. 2023.

CORDEIRO, D. A.; DOS SANTOS, F. R.; DOS SANTOS, H. B.; SILVA, M. R. S.; DE OLIVEIRA, N. F.; MINAFRA, C. S. Enzymatic complex for broilers fed on a diet containing different levels of Distiller Dried Grains with Solubles. **Food Chemistry**, v. 386, p. 132761, 2022.

CORZO, A.; FRITTS, C.A.; KIDD, M.T.; KERR, B.J. Response of broiler chicks to essential and non-essential amino acid supplementation of low crude protein diets. **Animal Feed Science Technology**, n. 118, p. 319-327, 2005.

COWIESON, A. J.; ABDOLLAHI, M. R.; ZAEFARIAN, F.; PAPPENBERGER, G.; RAVINDRAN, V. The effect of a mono-component exogenous protease and graded concentrations of ascorbic acid on the performance, nutrient digestibility and intestinal architecture of broiler chickens. **Animal Feed Science and Technology**, v. 235, p. 128-137, 2018.

COWIESON, A. J.; KLUENTER, A. M. Contribution of exogenous enzymes to potentiate the removal of antibiotic growth promoters in poultry production. **Animal Feed Science and Technology**, v. 250, p. 81-92, 2019.

COWIESON, A. J.; ROOS, F. F. Toward optimal value creation through the application of exogenous mono-component protease in the diets of non-ruminants. **Animal Feed Science and Technology**, v. 221, p. 331-340, 2016.

COWIESON, A. J.; ZAEFARIAN, F.; KNAP, I.; RAVINDRAN, V. Interactive effects of dietary protein concentration, a mono-component exogenous protease and ascorbic

acid on broiler performance, nutritional status and gut health. **Animal Production Science**, n. 57, p. 1058–1068, 2017.

DAL PONT, G. C.; LEE, A.; BORTOLUZZI, C.; JUNIOR, N. R.; FARNELL, Y. Z.; PILLA, R.; KOGUT, M. H. Distillers dried grains with soluble and enzyme inclusion in the diet effects broilers performance, intestinal health, and microbiota composition. **Poultry Science**, v. 102, n. 11, p. 102981, 2023.

DAMASCENO, J. L.; ROCHA, C. S.; EYNG, C.; BROCH, J.; SAVARIS, V. D.; WACHHOLZ, L.; NUNES, R. V. Corn distillers' dried grains with solubles to feed broiler chickens from 22 to 42 D of age. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 29, n. 3, p. 573-583, 2020.

DAMASCENO, J. L.; ROCHA, C. S.; EYNG, C.; BROCH, J.; SOUZA, C.; WACHHOLZ, L.; NUNES, R. V. Effect of feeding dried distillers' grains with solubles to broiler chickens from day 0 to 21. **Livestock Science**, v. 241, p. 104232, 2020.

DAMASCENO, J.L.; ROCHA, C.S.; EYNG, C.; BROCH, J.; SAVARIS, V.D.; WACHHOLZ, L.; NUNES, R.V. Grãos secos de destilaria de milho com solúveis para alimentação de frangos de corte de 22 a 42 D de idade. **Jornal de pesquisa aplicada em aves**, v. 29, n. 3, p. 573-583, 2020.

DE ARAÚJO CAMPOS, A. M.; ROSTAGNO, H. S.; NOGUEIRA, E. T.; ALBINO, L. F. T.; PEREIRA, J. P. L.; MAIA, R. C. Atualização da proteína ideal para frangos de corte: arginina, isoleucina, valina e triptofano. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, n. 2, p. 326-332, 2012.

DE FREITAS AMARAL, E. F.; LIMA, H. J. D. Á.; BITTENCOURT, T. M.; QUIRINO, C. S.; MORAIS, M. V. M.; PEREIRA, I. D. B. Grãos secos de destilaria de milho na dieta de codornas japonesas na fase de cria. **Veterinária e Zootecnia**, v. 30, p. 1-9, 2023.

DE LIMA SANTOS, G. C.; DE MELO GARCIA, P. H.; DOS SANTOS, D. G.; NETO, S. G.; DUARTE, A. M. C. Modeling in the nutrition of non-ruminants: general aspects, nutrient dynamics, limitations and service systems. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 3, n. 1, p. 114-132, 2020.

DE SOUZA, C. G.; DE MOURA, A. K. B.; DA SILVA, J. N. P.; SOARES, K. O.; DA SILVA, J. V. C.; VASCONCELOS, P. C. Fatores antinutricionais de importância na nutrição animal: Composição e função dos compostos secundários. **Pubvet**, v. 13, p. 166, 2019.

DÍAZ VARGAS, M.; DUQUE RAMÍREZ, C. F.; PEÑUELA SIERRA, L. M. Proteases na alimentação de frangos de corte. **Pubvet**, v. 16, n. 9, p. 1-7, 2022.

DIPIETRO, C. M.; LIENER, I. E. Heat inactivation of Kunitz and Bowman-Birk soy protease inhibitors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 37, n. 1, p. 39-44, 1989.

EMBRAPA. **EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA E AGRIPECUÁRIA, AVES E SUÍNOS, 2021.** [s.l: s.n.]. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/suinos-e-aves>>. Acesso em: 25 fev. 2023.

ERDAW, M. M.; BHUIYAN, M. M.; IJI, P. A. Enhancing the nutritional value of soy for poultry through supplementation with next-generation feed enzymes. **Poultry Science Journal**, v. 72, n. 2, p. 307-322, 2016.

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

FLEURI, L.F.E.; SATO, H. H. Produção, purificação, clonagem e aplicação de enzimas líticas. **Química Nova**, v. 28, 2005.

FRANZINI, B.D.; SAMPAIO, S. A.; BARROS, H. S. S.; DE CASTRO SANTANA, F. X.; DE PAULO, L. M.; GOUVEIA, A. B. V. S.; MINAFRA, C. S. Beta-glucanases e xilanases na nutrição de não ruminantes. **Veterinária e Zootecnia**, v. 29, p. 1-13, 2022.  
FREITAS, D. M.; VIEIRA, S. L.; ANGEL, C. R.; FAVERO, A.; MAIORKA, A. Performance and nutrient utilization of broilers fed diets supplemented with a novel mono-component protease. **Journal Applied Poultry Research**, n. 20, p. 322-334, 2011.

FRU-NJI, F.; KLUENTER A. M.; FISCHER M.; PONTOPPIDAN, K. A feed serine protease improves broiler performance and increases protein and energy digestibility. **Journal Poultry Science**, v. 48, p. 239-246, 2011.

FURUYA, W. M.; BOTARO, D.; MACEDO, R. M. G. D.; SANTOS, V. G. D.; SILVA, L. C. R.; SILVA, T. D. C.; SALES, P. J. P. Aplicação do conceito de proteína ideal para redução dos níveis de proteína em dietas para tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, p. 1433-1441, 2005.

GOTTSCHALK, G. Catabolic activities of aerobic heterotrophs. **Bacterial metabolism Edited Springer**, n. 144, 1985.

HAGEN, S. R.; FROST, B.; AUGUSTIN, J. Precolumn Phenylisothiocyanate Derivatization And Liquid-Chromatography of Amino-Acids in Food. **Journal of The Association of Official Analytical Chemists**, v. 72, n. 6, p. 912-916, 1989.

HAMM, R. Biochemistry of meat hydration. **Advances in Food Research**, v.10, p.335 – 443, 1960.

HARTMAN, L.; LAGO, R. C. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practice**, v. 22, n. 494, p. 475–477, 1973.

HOFFMANN, D.; THURNER, S.; ANKERST, D.; DAMME, K.; WINDISCH, W.; BRUGGER, D. Performance of growth and development of the pancreas of chickens exposed to soy cake varying in trypsin inhibitory activity, heat-degraded lysine concentration and protein solubility in potassium hydroxide. **Poultry science**, v. 98, p. 2489-2499, 2019.

HONIKEL, K. The meat water connection. **Fleischwirtsch**, v.67, p.109 – 1102, 1987.

INTERNATIONAL, A. Official methods of analysis of aoac international, Volume 2. **Trends in Food Science & Technology**, v. 6, n. 11, p. 382-382, 1995.

JANG, J. C.; ZENG, Z.; URRIOLA, P. E.; SHURSON, G. C. A systematic review and meta-analysis of the growth performance effects of feeding diets containing corn distillers dried grains with solubles (cDDGS) and feed enzymes to broiler chickens. **Animal Feed Science and Technology**, p. 115464, 2022.

JAWORSKI, N.W.; LAERKE, H.N.; BACH KNUDSEN, K.E.; STEIN, H.H. Carbohydrate composition and in vitro digestibility of dry matter and nonstarch polysaccharides in corn, sorghum, and wheat and coproducts from these grains. **Journal of animal science**, v. 93, n. 3, p. 1103-1113, 2015.

JEYAKUMAR, E.; LAWRENCE, R. Microbial fermentation to reduce antinutritional factors. **Current developments in biotechnology and bioengineering**, p. 239-260, 2022.

KAMEL, N. F.; RAGA, N. M.; EL-BANNA, R. A.; MOHAMED, F. F. Effects of a monocomponent protease on performance parameters and protein digestibility in broiler chickens. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**, v. 6, p. 216-225, 2015.

KEREZSI, A. D.; JACQUET, N.; BLECKER, C. Advances in physical treatments to reduce soy allergens. **Trends in Food Science and Technology**, v. 122, p. 24-39, 2022.

KHATTAK, F. M.; PASHA, T. N.; HAYAT, Z.; MAHMUD, A. Enzymes in poultry nutrition. **Journal Animal Poultry Science**, v. 16, n. 1-2, p. 1-7, 2006.

KHODAMBASHI, E. N.; SAMIE, A.; RAHMANI, H. R.; RUIZ-FERIAB, C. A. The effect of peppermint essential oil and fructooligosaccharides as alternatives to virginiamycin, on growth performance, digestibility, gut morphology and immune response of male broilers. **Animal Feed Science Technology**, v. 175, p. 57-64, 2012.

KHOSE, K.; MANWAR, S.; DHORE, R.; KURALKAR, S.; WAGHMARE, S. Feeding corn distillers dried grains with solubles and enzyme supplementation on performance of broiler chicken. **International Journal of Livestock Research**, v. 8, n. 5, p. 313-318, 2017.

KIDD, M. T.; MAYNARD, C. W.; MULLENIX, G. J. Progress of amino acid nutrition for diet protein reduction in poultry. **Journal of animal science and biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 1-9, 2021.

KIM, E.; MORGAN, N. K.; MOSS, A. F.; LI, L.; ADER, P.; CHOCT, M. The flux of non-starch polysaccharides along the gastrointestinal tract of broiler chickens fed a wheat- or corn-based diet. **Animal Nutrition**, v. 9, p. 138-142, 2022.

KUENZ, S.; THURNER, S.; HOFFMANN, D.; KRAFT, K.; WILTAFSKY-MARTIN, M.; DAMME, K.; BRUGGER, D. Effects of graded differences in trypsin inhibitor

- activity on the estimation of digestible amino acids in soybean expellers for broilers. **Poultry Science**, v. 101, n. 4, p. 101740, 2022.
- LEE, J.; OH, H.; KIM, Y.; SONG, D.; AN, J.; CHANG, S.; CHO, J. Effects of exogenous protease on performance, economic evaluation, nutrient digestibility, fecal score, intestinal morphology, blood profile, carcass trait, and meat quality in broilers fed normal diets and diets considered with matrix value. **Poultry Science**, v. 102, n. 5, p. 102565, 2023.
- LEMME, A.; RAVINDRAN, V.; BRYDEN, W. L. Ileal digestibility of amino acids in feed ingredients for broilers. **Worlds Poultry Science Journal**, v. 60, p. 423–437, 2004.
- LIMA, T. L. S.; JESUS, B. M.; SOUZA, R. R. R.; OKAMOTO, K. A.; LIMA, R.; FRACETO, F. L. Estudo da atividade proteolítica de Enzimas Presentes em frutos. **Química Nova**, v. 28, p. 47-9, 2008.
- LIN, Y.; LOURENCO, J.M.; OLUKOSI, O.A. The effects of protease, xylanase, and xylo-oligosaccharides on growth performance, nutrient utilization, short-chain fatty acids, and microbiota in Eimeria-challenged broiler chickens fed low protein diet. **Poultry Science**, p. 102789, 2023.
- LIU, G.; CASTRO, F. L. S.; KIM, W. K. Applied Research Note: Exogenous protease supplementation to reduced-energy, reduced-protein, and reduced-amino acid diets for broiler chickens from days 1 to 42. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 32, n. 3, p. 100362, 2023.
- LIU, Y.; LIU, S.; JIANG, G.; DAI, Q. Optimization of supplemented exogenous carbohydrates in broiler diets using in vitro simulated gastrointestinal digestion and response surface methodology. **Plos one**, v. 16, n. 11, p. e0259865, 2021.
- LUCAS, B.; SOTELO, A. Effect of different alkalies, temperature, and hydrolysis times on tryptophan determination of pure proteins and of foods. **Analytical biochemistry**, v. 109, p. 192-197, 1980.
- MAHMOOD, T.; MIRZA, M. A.; NAWAZ, H.; SHAHID, M.; ATHAR, M.; HUSSAIN, M. Effect of supplementing exogenous protease in low protein poultry by-product meal based diets on growth performance and nutrient digestibility in broilers. **Animal Feed Science Technologi**, n. 228, p. 23–31, 2017.
- MAQSOOD, M. A.; KHAN, E. U.; QAISRANI, S. N.; RASHID, M. A.; SHAHEEN, M. S.; NAZIR, A.; AHMAD, S. Interactive effect of amino acids balanced at ideal lysine ratio and exogenous protease supplemented to low CP diet on growth performance, carcass traits, gut morphology, and serum metabolites in broiler chicken. **Tropical Animal Health and Production**, v. 54, n. 3, p. 186, 2022.
- MCCAFFERTY, K. W.; MORGAN, N. K.; COWIESON, A. J.; CHOCT, M.; MOSS, A. F. Varying apparent metabolizable energy concentrations and protease supplementation affected broiler performance and jejunal and ileal nutrient digestibility from 1 to 35 d of age. **Poultry Science**, v. 101, n. 7, p. 101911, 2022.

- MCCORMACK, U.M.; CURIÃO, T.; BUZOIANU, S.G.; PRIETO, M.L.; RYAN, T.; VARLEY, P.; LAWLOR, P.G. Explorar uma possível ligação entre a microbiota intestinal e a eficiência alimentar em suínos. **Microbiologia aplicada e ambiental**, v. 83, n. 15, p. e00380-17, 2017.
- MENEGHETTI, C. C.; DOMINGUES, J. L. Características nutricionais e uso de subprodutos da agroindústria na alimentação de bovinos. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 5, n. 2, p. 512-536, 2008.
- METZLER- ZEBELI, B. U.; LAWLOR, P. G.; MAGOWAN, E.; MCCORMACK, U. M.; CURIÃO, T.; HOLLMANN, M.; ERTL, R.; ASCHENBACH, J. R.; ZEBELI, Q. Finishing pigs that differ in feed efficiency show small differences in intestinal functionality and structure. **Plos One**, 2017.
- MITCHELL, R. D.; EDWARDS JR, H. M. Effects of phytase and 1, 25-dihydroxycholecalciferol on phytate utilization and the quantitative requirement for calcium and phosphorus in young broiler chickens. **Poultry Science**, v. 75, n. 1, p. 95-110, 1996.
- MOHAN, V. R.; TRESINA, O. S.; DAFFODIL, E. D. Antinutritional factors in leguminous seeds: characteristics and determination. **Encyclopedia of Food and Health**, p. 211-220, 2016.
- MORGAN, N.; BHUIYAN, M. M.; HOPCROFT, R. Degradation of non-starch polysaccharides in the gastrointestinal tract of broilers fed commercial-type diets supplemented with a single dose of xylanase, a double dose of xylanase or a cocktail of non-starch polysaccharide degrading enzymes. **Poultry Science**, v. 101, n. 6, p. 101846, 2022.
- MORGAN, N.; BHUIYAN, M. M.; NGUYEN T. N. A.; MIDDLEBROOK, T.; HOPCROFT, R. The level and composition of soluble non-starch polysaccharides in the diet affect performance in the growing and finishing phases, the moisture content of excreta and the total digestibility of tract nutrients in broilers. **Poultry Science**, v. 100, p. 101383, 2021.
- MOTTET, A.; TEMPIO, G. Global poultry production: current state and future outlook and challenges. **Poultry Science**, v. 73, p. 245-256, 2017.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Conselho Nacional de Pesquisa Exigências Nutricionais de Aves. National Academy Press, 9ª revisão, Washington, 1994.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. NRC. 2012. Nutrients requirements of swine. 11 ed. Washington: NRC, p. 424, 1994.
- NDAZIGARUYE, G.; KIM, D. H.; KANG, C. W.; KANG, K. R.; JOO, Y. J.; LEE, S. R.; LEE, K. W. Effects of low-protein diets and exogenous protease on growth performance, carcass traits, intestinal morphology, cecal volatile fatty acids and serum parameters in broilers. **Animals**, v. 9, n. 5, p. 226, 2019.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. Leninger princípios de bioquímica. **Leninger princípios de bioquímica**, p. 975-975, 2002.

NIKMARAM, N.; LEONG, S. Y.; KOUBAA, M.; ZHU, Z.; BARBA, F. J.; GREINER, R.; ROOHINEJAD, S. Effect of extrusion on the anti-nutritional factors of food products: An overview. **Food Control**, v. 79, p. 62-73, 2017.

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

NITSAN, Z.; LIENER, I. E. Enzymatic activities in the pancreas, digestive tract and feces of rats fed raw or heated soybean meal. **Journal Nutrition**, v. 106, p. 300-305, 1976.

NIU, Y.; ROGIEWICZ, A.; SHI, L.; PATTERSON, R.; SLOMINSKI, B. A. The effect of multi-carbohydrase preparations on non-starch polysaccharide degradation and growth performance of broilers fed diets containing high levels of canola meal inclusion. **Animal Feed Science and Technology**, v. 293, p. 115450, 2022.

NJERI, F.M.; SANCHEZ, J.; PATTERSON, R.; GACHUIRI, C.K.; KIARIE, E.G. Comparative growth performance, gizzard weight, ceca digesta short chain fatty acids and nutrient utilization in broiler chickens and turkey poult in response to cereal grain type, fiber level, and multienzyme supplement fed from hatch to 28 days of life. **Poultry Science**, v. 102, n.10, p.102933, 2023.

NORIOKA, N.; HARA, S.; IKENAKA, T.; ABE, J. Distribution of Kunitz and Bowman-Birk family protease inhibitors in leguminous seeds. **Agricultural and biological chemistry**, v. 52, n. 5, p. 1245-1252, 1988.

OJHA, B. K.; SINGH, P. K.; SHRIVASTAVA, N. Enzymes in the animal feed industry. **Enzymes in food biotechnology**, n. 7, p. 93-109, 2019.

OLUKOSI, O. A.; BEESON, L. A.; ENGLYST, K.; ROMERO, L. F. Effects of exogenous proteases without or with carbohydrases on nutrient digestibility and disappearance of non-starch polysaccharides in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 94, n. 11, p. 2662-2669, 2015.

O'NEILL, H. M.; HALL, H.; CURRY, D.; KNOX, A. Processed soya to improve performance of broiler chickens. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 27, n. 3, p. 325-331, 2018.

PAN, L.; SHANG, Q. H.; MA, X. K.; WU, Y.; LONG, S. F.; WANG, Q. Q.; PIAO, X. S. Coated compound proteases improve nitrogen utilization by decreasing manure nitrogen output for growing pigs fed sorghum soybean meal based diets. **Animal Feed Science and Technology**, v. 230, p. 136-142, 2017.

PARK, J. H.; KIM, I. H. Effects of a protease and essential oils on growth performance, blood cell profiles, nutrient retention, ileal microbiota, excreta gas emission, and breast meat quality in broiler chicks. **Poultry Science**, v. 97, n. 8, p. 2854-2860, 2018.

PEREZ, M.; PIAD, R.; MILIAN, G.; DAS GRAÇAS FELIPE, M.; FERREIRA, A.; DE MANCILHA, I. M.; SILVA, J. B. D. A. Preparation of a crude enzymatic from *Bacillus licheniformis* E-44 and its evaluation in the hydrolysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 452-455, 2007.

PIRGOZLIEV, V.; ROSE, S. P.; IVANOVA, S. Feed additives in poultry nutrition. **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, v. 25, n. 1, p. 8-11, 2019.

QIU, J.; WILKENS, C.; BARRETT, K.; MEYER, A. S. Microbial enzymes catalyzing keratin degradation: Classification, structure, function. **Biotechnology advances**, v. 44, p. 107607, 2020.

RAVINDRAN, V.; HEW, L. I.; RAVINDRAN, G.; BRYDEN, W. L. Apparent ileal digestibility of amino acids in dietary ingredients for broiler chickens. **Animal Science**, v. 81, p. 85-97, 2005.

RAY, G. W.; LI, X.; HE, S.; LIN, H.; YANG, Q.; TAN, B.; ZHANG, S. A review on the use of distillers dried grains with solubles (DDGS) in aquaculture feeds. **Annals of Animal Science**, v. 22, n. 1, p. 21-42, 2022.

RAZA, A.; BASHIR, S.; TABASSUM, ROMANA. An update on carbohydrases: growth performance and intestinal health of poultry. **Heliyon**, v. 5, n. 4, p. 1437, 2019.

REHMAN, Z. U.; KAMRAN, J.; ABD EL-HACK, M. E.; ALAGAWANY, M.; HATTI, S. A.; AHMAD, G.; DING, C. Influence of low-protein and low-amino acid diets with different sources of protease on performance, carcasses and nitrogen retention of broiler chickens. **Animal Production Science**, v. 58, n. 9, p. 1625-1631, 2017.

RHO, Y.; ZHU, C.; KIARIE, E.; DE LANGE, C.F.M. Apparent ileal and total tract digestibility of corn DDGS steeped without or with fiber degrading enzymes and fed to growing pigs. **Journal of Animal Science**, v. 95, n. 4, p. 124-124, 2017.

ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; DONZELE, J. L.; GOMES, P. C.; OLIVEIRA, R. F.; LOPES, D. C.; FERREIRA, A. S.; BARRETO, S. L. T.; EUCLIDES, R. F. Composição de alimentos e exigências nutricionais. In Tabelas brasileiras para aves e suínos. Universidade federal de viçosa, ed. 3, n. 1, i. 1, 2017.

SALEH, A.A.; DAWOOD, M.M.; BADAWI, N.A.; EBEID, T.A.; AMBER, K.A.; AZZAM, M.M. Effect of supplemental serine-protease from *Bacillus licheniformis* on growth performance and physiological change of broiler chickens. **Journal Applied Animal Research**, n. 48, p. 86-92, 2020.

SAMTIYA, M.; ALUKO, R. E; DHEWA, T. Antinutritional factors from plant foods and their reduction strategies: an overview. **Food production, processing and nutrition**, v. 2, p. 1-14, 2020.

SEONG, M.; SEUNGHYUNG, L.; SONG, Y.; BAE, J.; CHANG, K.; BAI, S. C. Os efeitos de diferentes níveis de concentrado de proteína à base de plantas fermentado na dieta no crescimento, hematologia e respostas imunes não específicas em linguado de azeitona juvenil, *Paralichthys olivaceus*. **Aquicultura**, v. 483, p. 196-202, 2018.

Shapiro, S.S.; Wilk, M.B. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**, v. 52, n. 3-4, p.591-611, 1965.

SIEGERT, W.; ZUBER, T.; SOMMERFELD, V.; KRIEG, J.; FEUERSTEIN, D.; KURRLE, U.; RODEHUTSCORD, M. Prececal amino acid digestibility and phytate degradation in broiler chickens when using different oilseed meals, phytase and protease supplements in the feed. **Poultry Science**, v. 98, n. 11, p5700-5713, 2019.

SILVA, D. L.; DALÓLIO, F. S.; TEIXEIRA, L. V.; SENS, R. F.; ALBINO, L. F. T.; ROSTAGNO, H. S. IMPACT of the Supplementation of Exogenous Protease and Carbohydrase on the Metabolizable Energy and Standardized Ileal Amino Acid Digestibility of Soybean Meals in Two Brazilian Regions. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 24, 2022.

SILVA, M. R.; SILVA, M. A. A. P. D. Antinutritional factors: protease and lectin inhibitors. **Nutrition Magazine**, v. 13, p. 3-9, 2000.

SINDIRAÇÕES. **SETOR DE ALIMENTAÇÃO ANIMAL: BOLETIM INFORMATIVO DO SETOR, 2022**. [s.l: s.n.]. Disponível

em:<[https://sindiracoes.org.br/wpcontent/uploads/2022/12/boletim\\_informativo\\_do\\_setor\\_dezembro\\_2022\\_vs\\_final\\_port\\_sindiracoes.pdf](https://sindiracoes.org.br/wpcontent/uploads/2022/12/boletim_informativo_do_setor_dezembro_2022_vs_final_port_sindiracoes.pdf)>. Acesso em: 26. jan. 2023.

SINGH, A. K.; TIWARI, U. P.; BERROCOSO, J. D.; DERSJANT-LI, Y.; AWATI, A.; JHA, R. Effects of a combination of xylanase, amylase and protease, and probiotics on major nutrients including amino acids and non-starch polysaccharides utilization in broilers fed different level of fibers. **Poultry science**, v. 98, n. 11, p. 5571-5581, 2019.

SUN, X.; URRIOLO, P.E.; SHURSON, G.; TIFFANY, D.; HU, B. Enhancing feeding value of corn distiller's grains with solubles via fungal co-cultured solid-state fermentation for monogastric animal nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, v. 303, p. 115673, 2023.

SWIATKIEWICZ, S.; SWIATKIEWICZ, M.; ARCZEWSKAĞWLOSEK, A.; JOZEFIK, D. Efficacy of feed enzymes in pig and poultry diets containing distillers dried grains with solubles: a review. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 100, n. 1, p. 15-26, 2016.

TAJUDEEN, H.; HOSSEINDOUST, A.; HA, S. H.; MOTURI, J.; MUN, J. Y.; LEE, C. B.; KIM, J. S. Effects of dietary level of crude protein and supplementation of protease on performance and gut morphology of broiler chickens. **European Poultry Science**, 355, 2022.

TAVERNARI, F. C.; CARVALHO, T. A.; ASSIS, A. D.; LIMA, H. J. D. Polissacarídeo não-amiláceo solúvel na dieta de suínos e aves. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 5, n. 5, p. 673-689, 2008.

THANABALAN, A.; MOHAMMADIGHEISAR, M.; KIARIE, E. G. Amino acids and energy digestibility in extruded or roasted full fat soybean fed to broiler chickens

without or with multienzyme supplement containing protease, phytase, and fiber degrading enzymes. **Poultry Science**, v. 100, n. 12, p. 101511, 2021.

ULO, Y. B. Key Role of Substitute Enzymes in the Poultry Diet. **World Scientific News**, v. 166, p. 100-115, 2022.

VALDIVIA, A. L.; MATOS, M. M.; RODRÍGUEZ, Z.; PÉREZ, Y.; RUBIO, Y.; VEGA, J. Los aditivos enzimáticos, su aplicación en la crianza animal. **Cuban Journal of Agricultural Science**, v. 53, p. 341–352, 2019.

VASANTHAKUMARI, B.L.; GEDYE, K.R.; ABDOLLAHI, M.R.; DI BENEDETTO, M.; SANCHEZ, D.G.; WEALLEANS, A.; RAVINDRAN, V. Uma nova xilanase monocomponente melhora o desempenho, a digestibilidade ileal de energia e nutrientes, a morfologia intestinal e a microbiota intestinal em frangos de corte jovens. **Jornal de Pesquisa Aplicada em Aves**, v.32, n.1, p.100301, 2023.

VELÁZQUEZ-DE LUCIO, B. S.; HERNÁNDEZ-DOMÍNGUEZ, E. M.; VILLAGARCIA, M.; DIAZ-GODINEZ, G.; MANDUJANO-GONZALEZ, V.; MENDOZA-MENDOZA, B.; ALVAREZ-CERVANTES, J. Exogenous enzymes as zootechnical additives in animal feed: a review. **Catalysts**, v. 11, n. 7, p. 851, 2021.

VISENTAINER, J. V.; FRANCO, M. R. B., 2006. Ácidos Graxos em Óleos e Gorduras: Identificação e Quantificação, 1ª ed, Varela: São Paulo.

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

WARD, N. E. Debranching enzymes in corn/soybean meal–based poultry feeds: a review. **Poultry Science**, v. 100, n. 2, p. 765-775, 2021.

WARPECHOWSKI, M. B. Efeito da fibra insolúvel da dieta sobre a passagem no trato gastrointestinal de matrizes machos pesados intactos, cecectomizados e fistulados no íleo terminal. UFRGS, 1996.

WEDEKIND, K.; CHEN, J.; YAN, F.; ESCOBAR, J.; VAZQUEZ-ANON, M. Efficacy of a mono-component protease is affected by trypsin inhibitor concentration in soybean meal. **Animal Feed Science and Technology**, v. 265, p. 114502, 2020.

WHITE J. A; HART, R.J.; FRY, J. C. An Evaluation of The Waters Pico-Tag System For The Amino-Acid-Analysis of Food Materials. **Journal of Automatic Chemistry**, v. 8, n. 4, p. 170-177, 1986.

WIDYARATNE, G. P.; ZIJLSTRA, R. T. Nutritional value of wheat and corn distiller's dried grain with solubles: Digestibility and digestible contents of energy, amino acids and phosphorus, nutrient excretion and growth performance of grower-finisher pigs. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 87, n. 1, p. 103-114, 2007.

XU, X.; WANG, H. L.; PAN, L.; MA, X. K.; TIAN, Q. Y.; XU, Y. T.; PIAO, X. S. Effects of coated proteases on the performance, nutrient retention, gut morphology and

carcass traits of broilers fed corn or sorghum based diets supplemented with soybean meal. **Animal Feed Science and Technology**, v. 223, p. 119-127, 2017.

ZHANG, P.; LI, C.; XU, D.; YELLEZUOME, D.; WANG, J.; CAI, J. Insights into the kinetics and thermodynamics of distillers dry grains with solubles (DDGS) combustion using an approach that simultaneously determines the frequency factor and reaction model. **Renewable energy**, p. 119559, 2023.

## ANEXO A – COMPROVANTES CEUA



Universidade do Estado de Santa Catarina  
Comissão de Ética no  
Uso de Animais

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito da adição da enzima protease na dieta de frangos de corte, composta com grãos secos de destilaria contendo solúveis (DDGS)", protocolada sob o CEUA nº 6268231023 (ID 001854), sob a responsabilidade de **Aleksandro Schafer da Silva** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Estado de Santa Catarina (CEUA/UDESC) na reunião de 30/10/2023.

We certify that the proposal "Effect of adding the protease enzyme to the diet of broiler chickens, composed of dried distillers grains containing solubles (DDGS)", utilizing 756 Birds (756 males), protocol number CEUA 6268231023 (ID 001854), under the responsibility of **Aleksandro Schafer da Silva** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the University of Santa Catarina State (CEUA/UDESC) in the meeting of 10/30/2023.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 11/2023 a 12/2023 Área: Zootecnia

Origem: Animais provenientes de estabelecimentos comerciais

Espécie: Aves

sexo: Machos

Idade: 1 a 40 dias

Quantidade: 756

Linhagem: Coob500

Peso: 46 a 3000 g

Lages, 17 de janeiro de 2024

José Cristani  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade do Estado de Santa Catarina

Pedro Volkmer de Castilhos  
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade do Estado de Santa Catarina



**CERTIFICADO : RELATÓRIO PARCIAL** v22/05/2023

Certificamos que o RELATÓRIO PARCIAL (versão de 22/05/2023) da proposta intitulada "Avaliação da eficácia de aditivos (ácidos orgânicos, protease ácida e alcalina) sobre a digestibilidade dos nutrientes e o desempenho de frangos", CEUA nº 3559240422 (ID 021657), sob a responsabilidade de **Aleksandro Schafer da Silva** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos vigentes para sua apresentação, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), sendo assim **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Estado de Santa Catarina (CEUA/UDESC) em 26/05/2023.

Pedido apresentado à CEUA: 1. Qual o estágio do estudo no momento? Resp: análises de laboratório nesse momento. 2. Por quanto tempo mais o estudo se estenderá? Resp: 6 meses 3. Resultados parciais ou totais apresentados em congresso? Resp: sim. SEPE 2022 4. Resultados parciais ou totais já publicados? Resp: não

Considerações da CEUA: APROVADO

Término previsto: 10/2022

**ANIMAIS UTILIZADOS**

	Quantidade Aprovada	Quantidade Utilizada
Aves	960	960
Machos	960	960

Lages, 17 de janeiro de 2024



José Cristani  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade do Estado de Santa Catarina



Pedro Volkmer de Castilhos  
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade do Estado de Santa Catarina

