UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

DIANA SUCKEVERIS

**Redução de proteína bruta, de metionina + cistina e suplementação de
protease em dietas de poedeiras de 21 a 70 semanas de idade**

Pirassununga

2015

DIANA SUCKEVERIS

**Redução de proteína bruta, de metionina + cistina e suplementação de
protease em dietas de poedeiras de 21 a 70 semanas de idade**

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de
Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo, como parte
dos requisitos para a obtenção do Título
de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Qualidade e
Produtividade Animal

Orientador: Prof. Dr. Douglas Emygdio
de Faria

Pirassununga

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo

S942r Suckeveris, Diana
Redução de proteína bruta, de metionina + cistina e
suplementação de protease em dietas de poedeiras de 21 a
70 semanas de idade / Dina Suckeveris. -- Pirassununga,
2015.
78 f.
Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo.
Departamento de Ciências Básicas.
Área de Concentração: Qualidade e Produtividade
Animal.
Orientador: Prof. Dr. Douglas Emygdio de Faria.

1. Análise econômica 2. Enzimas 3. Nutrição
4. Qualidade dos ovos 5. Unidade Haugh. I. Título.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SUCKEVERIS, Diana

Título: Redução de proteína bruta, de metionina + cistina e suplementação de protease em dietas de poedeiras de 21 a 70 semanas de idade

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Zootecnia

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

À minha vó Rosa (*in memorian*), eternizada no meu coração e nas minhas lembranças, por me ensinar o que realmente importa na vida, amar e estar próximo daqueles que amamos!

Aos meus amados pais, Koio e Beno, exemplos de caráter e honestidade, por me proporcionarem toda a educação ao longo da vida, pelos valores ensinados, pelo carinho, pelos sábios conselhos e pelo apoio incondicional para a concretização dos meus sonhos. Tenho muito orgulho de ser filha de vocês!

À minha irmã Stela por TUDO! Pelo amor desmedido, pela amizade sincera, por estar sempre presente: Você é minha grande inspiração e motivação para lutar pelos meus ideais!

Ao meu namorado Pedro, meu companheiro para vida toda, por sempre acreditar em mim, pela compreensão nos dias difíceis, pelo carinho e amor. Você me ensina a ser uma pessoa melhor a cada dia!

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela dádiva da vida, pela força para superar os desafios impostos, pela sabedoria para escolher os melhores caminhos, pela proteção e bênçãos durante toda a minha trajetória.

Aos meus pais, Koio e Beno, e minha irmã, Stela, por tornarem os meus sonhos, parte dos seus, e também pelo apoio durante toda a realização desse trabalho. Estendo meus agradecimentos ao meu amado companheiro Pedro. Meu imenso agradecimento por acreditarem em mim!

À Universidade de São Paulo – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Ao meu orientador Professor Dr. Douglas Emygdio de Faria, meus sinceros agradecimentos pela oportunidade de aprendizado, pela demonstração de confiança e pelos grandiosos ensinamentos transmitidos durante esses anos de convivência.

Ao querido Professor Dr. Daniel Emygdio de Faria Filho pela contribuição com ensinamentos técnicos e científicos, principalmente nos conhecimentos em estatística compartilhados. Foram valiosos na minha formação!

Ao Professor Dr. Augusto Gameiro pelas orientações na análise econômica.

Agradeço aos demais professores do Departamento de Zootecnia e Ciência Básicas (FZEA/USP), aos professores da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ/USP), aos funcionários da Secretária de Pós-Graduação e da Biblioteca.

À toda equipe do Laboratório de Avicultura (FZEA/USP), em especial, aos meus colegas Julian, Leandro e Vinícius pela amizade, aprendizado, paciência e risadas compartilhadas e, principalmente ao Claudinho, pelo bom humor diário, pelos ensinamentos e imensa ajuda durante os experimentos conduzidos. Sem vocês esse trabalho teria sido muito mais difícil!

Aos funcionários da Fábrica de Ração, Setor de Fistulados, Laboratório de Bromatologia, Laboratório de Minerais e Laboratório de Qualidade do Leite (FMVZ/USP), agradeço a todos pelo auxílio para a execução do meu experimento.

Aos colegas e amigos feitos durante o mestrado: Kazuo, Lina, Lana, Bel, Yuri, Jairo, Carol (Reina), Mickaël, Lucas, Thiago, Ana Paula, Thaís e Nati, agradeço por tornarem os dias mais leves e a vida em Pirassununga mais divertida.

À minha grande amiga e colega de profissão, Amanda Lapa, pela amizade sincera, pelos conselhos e conhecimentos compartilhados.

Aos meus grandes amigos da minha cidade natal por entenderem minha ausência e me incentivarem a continuar.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

À DSM Nutritional Products Ltd. pelo fornecimento das enzimas para a realização do experimento.

Agradeço a todos que contribuíram de alguma maneira para a realização desse trabalho.

“Não há no mundo exagero mais belo que a gratidão”.

Jean de la Bruyere

“Uma noite eu tive um sonho...

Sonhei que estava andando na praia com o Senhor e no céu passavam cenas de minha vida.

Para cada cena que passava, percebi que eram deixados dois pares de pegadas na areia: um era meu e o outro do Senhor.

Quando a última cena da minha vida passou diante de nós, olhei para trás, para as pegadas na areia, e notei que muitas vezes, no caminho da minha vida, havia apenas um par de pegadas na areia.

Notei também que isso aconteceu nos momentos mais difíceis e angustiantes da minha vida.

Isso aborreceu-me deveras e perguntei então ao meu Senhor:

- Senhor, tu não me disseste que, tendo eu resolvido te seguir, tu andarias sempre comigo, em todo o caminho?

Contudo, notei que durante as maiores tribulações do meu viver, havia apenas um par de pegadas na areia.

Não compreendo por que nas horas em que eu mais necessitava de ti, tu me deixaste sozinho.

O Senhor me respondeu:

- Meu querido filho. Jamais te deixaria nas horas de prova e de sofrimento. Quando viste na areia, apenas um par de pegadas, eram as minhas.

Foi exatamente aí, que te carreguei nos braços”.

Mary Stevenson

RESUMO

SUCKEVERIS, D. **Redução de proteína bruta, de metionina + cistina e suplementação de protease em dietas de poedeiras de 21 a 70 semanas de idade.** 2015. 78f. Dissertação – (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos da redução de proteína bruta e de metionina + cistina e suplementação de protease em dietas de poedeiras comerciais no período de 21 a 70 semanas de idade, dividido em quatro fases de produção. Foram utilizadas 168 poedeiras Hy-Line W36 distribuídas em delineamento inteiramente ao acaso em esquema fatorial 3 x 2, com os fatores: Redução de proteína bruta e metionina + cistina (controle, valorização de uma e duas vezes da enzima protease) e Protease (sem e com). Foram conduzidos dois ensaios simultaneamente, o Ensaio I (21 a 70 semanas) utilizando sete repetições com quatro aves cada e o Ensaio II (32, 44, 58 e 70 semanas) com seis repetições de duas aves cada. As dietas foram formuladas de acordo com as recomendações nutricionais do Manual de Padrões de Desempenho (2011), exceto para os níveis de proteína e metionina + cistina, com inclusão de fitase em 600 FYT/kg de ração e de protease em 9000 PROT/kg de ração. No Ensaio I, as características avaliadas foram: Desempenho - consumo de ração diário, porcentagem de produção, peso e massa dos ovos, conversão alimentar por massa e por dúzia de ovos, peso corporal das aves, porcentagem de ovos vendáveis e viabilidade criatória; Qualidade interna dos ovos – porcentagem de albúmen e gema, Unidade Haugh, índice de gema e cor de gema, e; Qualidade externa dos ovos – porcentagem de casca, espessura de casca e densidade aparente. O Ensaio II foi executado ao término de cada fase de postura (32, 44, 58 e 70 semanas) sendo ensaios de metabolismo para obtenção dos coeficientes de metabolizabilidade de matéria seca, cálcio, fósforo e nitrogênio. Ainda, realizou-se a análise econômica para a avaliação do uso de protease combinado a redução dos níveis de proteína bruta e metionina + cistina em dietas para poedeiras. Conclui-se que a redução de proteína bruta e metionina + cistina e a suplementação de protease é possível por não prejudicar o desempenho e a qualidade de ovos das aves. Em todas as fases avaliadas a inclusão de protease nas dietas proporcionou melhora na qualidade externa dos ovos. Na Fase IV foram obtidos os melhores resultados de consumo de ração, conversão alimentar por massa e por dúzia de ovos, o que corroborou para a maior margem bruta para dietas com valorização da matriz da enzima e suplementação de protease em relação aos demais tratamentos.

Palavras-chave: análise econômica, enzimas, nutrição, qualidade dos ovos, Unidade Haugh

ABSTRACT

SUCKEVERIS, D. **Reduction of crude protein and methionine + cystine and protease supplementation in diets for laying hens from 21 to 70 weeks of age.** 2015. 78f. M. Sc. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

The aim of this study was to evaluate the effects of reduction of crude protein and methionine + cystine and protease supplementation in corn-soybean meal diets for laying hens from 21 to 70 weeks of age, divided in four phases of production. 168 Hy-Line W36 hens were distributed in a completely randomized design in a 3 x 2 factorial scheme: Reduction of protein and methionine + cystine (control, valued once and twice the matrix enzyme) and Protease (with or without). Simultaneously were conducted two trials: Trial 1 (21 to 70 weeks) with 7 replicates of 4 birds each and Trial 2 (32, 44, 58 and 70 weeks) with 6 replicates of 2 birds each. Diets were formulated according to Hy-Line W36 Manual (2011), except for the levels of protein and methionine + cystine, with the inclusion of phytase in 600 FYT/kg of feed and protease in 9000 PROT/kg of feed. In Trial 1 were evaluated: Performance: Feed intake, egg production, egg weight, egg mass, feed conversion ratio per egg mass and per dozen, salable eggs and viability; Internal egg quality: albumen percent, yolk percent, Haugh Unit, yolk index and yolk color, and; External egg quality: shell percent, shell thickness and specific gravity. The Trial 2 was conducted at the end of each phase (32, 44, 58 and 70 weeks) and metabolism assays to obtain the metabolizable coefficients of dry matter, calcium, phosphorus and nitrogen. Economic analysis was executed to evaluate the use of protease with reduction of levels of crude protein and methionine + cystine in diets for laying hens. In conclusion is possible the reduction of crude protein and methionine + cystine and protease supplementation without change performance and quality of eggs of hens. Protease supplementation in the diets provided higher external egg quality at all phases. In phase IV were obtained positive results for feed intake, feed conversion per mass and per dozen eggs, which corroborated to the higher gross margin for diets with valuation of the enzyme matrix and protease supplementation than other treatments.

Key-words: economic analysis, egg quality, enzymes, nutrition, United Haugh

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Vista externa (a) e interna (b) do Aviário Experimental de Postura da FZEA.....	42
Figura 2 - Vista interna do aviário experimental de ensaio de metabolismo	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Indicação dos tratamentos	37
Tabela 2- Dietas experimentais da Fase I (21 a 32 semanas de idade) para poedeiras comerciais (Consumo médio calculado para 84 g/ave/dia)	38
Tabela 3 - Dietas experimentais da Fase II (33 a 44 semanas de idade) para poedeiras comerciais (Consumo médio calculado para 95 g/ave/dia)	39
Tabela 4 - Dietas experimentais da Fase III (45 a 58 semanas de idade) para poedeiras comerciais (Consumo médio calculado para 95 g/ave/dia)	40
Tabela 5 - Dietas experimentais da Fase IV (59 a 70 semanas de idade) para poedeiras comerciais (Consumo médio calculado para 88 g/ave/dia)	41
Tabela 6 – Descrição da matriz nutricional da protease utilizada para cada fase de produção	42
Tabela 7 - Preços médios reais de ingredientes utilizados nas dietas (R\$/kg) e da dúzia de ovos (dúzias)	48
Tabela 8 - Médias de temperatura (T°C) e umidade relativa do ar (UR) máximas e mínimas para Fase I (21 a 32 semanas de idade), Fase II (33 a 44 semanas de idade), Fase III (45 a 58 semanas de idade) e Fase IV (59 a 70 semanas de idade)	49
Tabela 9 – Valores médios calculados de consumo de ração diário (CRD, g/ave/dia), produção de ovos (PP, %), peso (PO, g), massa (MO, g) e conversão alimentar por massa de ovos (CMO), peso corporal das aves (PCA, kg) e Unidade Haugh (UH) conforme o Manual Hy-Line W36 (2011)	50
Tabela 10 - Valores médios de consumo de ração (CRD, g/ave/dia), produção (PP, %), peso (PO, g), massa (MO, g), conversão alimentar por massa (CMO) e por dúzia de ovos (CDZ,	

g/dz), peso corporal das aves (PCA, kg) e ovos vendáveis (OV, %) de poedeiras comerciais para Fase I (21 a 32 semanas de idade) de produção.....51

Tabela 11 - Desdobramento da interação de características peso médio do ovo (g) e peso corporal (kg) de poedeiras comerciais para Fase I (21 a 32 semanas de idade) de produção ..51

Tabela 12 - Valores médios de porcentagem de albúmen (PA, %), porcentagem de gema (PG, %), Unidade Haugh (UH), Índice (IG) e cor de gema (CG) de ovos provenientes de poedeiras comerciais para Fase I (21 a 32 semanas de idade) de produção52

Tabela 13 - Valores médios de porcentagem de casca (PC, %), espessura de casca (EC, mm) e densidade aparente (DA, g/mL) de ovos provenientes de poedeiras comerciais para Fase I (21 a 32 semanas de idade) de produção53

Tabela 14 - Valores médios de consumo de ração (CRD, g/ave/dia), produção (PP, %), peso (PO, g), massa (MO, g), conversão alimentar por massa (CMO) e por dúzia de ovos (CDZ, g/dz), peso corporal das aves (PCA, kg) e ovos vendáveis (OV, %) de poedeiras comerciais 53

Tabela 15 - Valores médios de porcentagem de albúmen (PA, %), porcentagem de gema (PG, %), Unidade Haugh (UH), Índice (IG) e cor de gema (CG) de ovos provenientes de poedeiras comerciais para Fase II (33 a 44 semanas de idade) de produção54

Tabela 16 - Valores médios de porcentagem de casca (PC, %), espessura de casca (EC, mm) e densidade aparente (DA, g/mL) de ovos provenientes de poedeiras comerciais para Fase II (33 a 44 semanas de idade) de produção55

Tabela 17 - Valores médios de consumo de ração (CRD, g/ave/dia), produção (PP, %), peso (PO, g), massa (MO, g), conversão alimentar por massa (CMO) e por dúzia de ovos (CDZ g/dz), peso corporal (PCA, kg) e ovos vendáveis (OV, %) de poedeiras comerciais para Fase III (45 a 58 semanas de idade) de produção55

Tabela 18 - Valores médios de porcentagem de albúmen (PA, %), porcentagem de gema (PG, %), Unidade Haugh (UH), Índice (IG) e cor de gema (CG) de ovos provenientes de poedeiras comerciais Fase III (45 a 58 semanas de idade) de produção56

Tabela 19 - Desdobramento da interação de características índice de gema de ovos de poedeiras comerciais para Fase III (45 a 58 semanas de idade) de produção.....	56
Tabela 20 - Valores médios de porcentagem de casca (PC, %), espessura de casca (EC, mm) e densidade aparente (DA, g/mL) de ovos provenientes de poedeiras comerciais para Fase III (45 a 58 semanas de idade) de produção	57
Tabela 21 - Valores médios de consumo de ração (CRD, g/ave/dia), produção (PP, %), peso (PO, g), massa (MO, g), conversão alimentar por massa (CMO) e por dúzia de ovos (CDZ, g/dz dz), peso corporal (PCA, kg), ovos vendáveis (OV, %) e viabilidade criatória (VC, %) de poedeiras comerciais para Fase IV (59 a 70 semanas de idade) de produção	58
Tabela 22 - Desdobramento da interação de características massa de ovo (g) de poedeiras comerciais para Fase IV (59 a 70 semanas de idade) de produção	59
Tabela 23 - Valores médios de porcentagem de albúmen (PA, %), porcentagem de gema (PG, %), Unidade Haugh (UH), Índice (IG) e cor de gema (CG) de ovos provenientes de poedeiras comerciais Fase IV (59 a 70 semanas de idade) de produção	59
Tabela 24 - Valores médios de porcentagem de casca (PC, %), espessura de casca (EC, mm) e densidade aparente (DA, g/mL) de ovos provenientes de poedeiras comerciais para Fase IV (59 a 70 semanas de idade) de produção	60
Tabela 25 - Valores médios de consumo de ração (CRD, g/ave/dia), produção (PP, %), peso (PO, g), massa (MO, g), conversão alimentar por massa (CMO) e por dúzia de ovos (CDZ, g/dz), peso corporal (PCA, kg), ovos vendáveis (OV%) e viabilidade criatória (VC) de poedeiras comerciais durante o período de 21 a 70 semanas de idade.....	62
Tabela 26 - Valores médios de porcentagem de albúmen (PA, %), porcentagem de gema (PG, %), Unidade Haugh (UH), Índice (IG), cor de gema (CG), porcentagem de casca (PC, %), espessura de casca (EC, mm) e densidade aparente (DA, g/mL) de ovos provenientes de poedeiras comerciais durante o período de 21 a 70 semanas de idade.....	63

Tabela 27 - Desdobramento da interação de Unidade Haugh provenientes de ovos provenientes de poedeiras comerciais durante o período de 21 a 70 semanas de idade 64

Tabela 28 - Coeficiente de metabolizabilidade aparente da matéria seca (CMAMS), do nitrogênio (CMAN), do cálcio (CMACa) e do fósforo (CMAP) de poedeiras comerciais para cada fase de produção..... 65

Tabela 29 - Análise econômica da produção de ovos de poedeiras comerciais alimentadas com dietas com redução de proteína e metionina + cistina e suplementadas com protease para cada fase de produção 69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1x matriz	valorização de uma vez da enzima protease
2x matriz	valorização de duas vezes da enzima protease
Ca	Cálcio
CDZ	conversão alimentar por dúzia de ovos
CMACa	coeficiente de metabolizabilidade aparente do cálcio
CMO	conversão alimentar por massa de ovos
CMAMS	coeficiente de metabolizabilidade aparente da matéria seca
CMAN	coeficiente de metabolizabilidade aparente do nitrogênio
CMAP	coeficiente de metabolizabilidade aparente do fósforo
CN1	controle negativo com uma vez a valorização
CN2	controle negativo com duas vezes a valorização
CP	controle positivo
CRD	consumo de ração diário
CTa	custo total de alimentação
CV	coeficiente de variação
dz	dúzia de ovos
FZEA	Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
g	gramas
IG	índice de gema
kcal	quilocaloria
kg	quilogramas
máx	máximo (a)

MB	margem bruta
µg	micrograma
mg	miligrama
mín	mínimo (a)
met+cis	metionina + cistina
mg	miligramas
MO	massa de ovos
MS	matéria seca
N	Nitrogênio
OV	porcentagem de ovos vendáveis
PA	porcentagem de albúmen
PB	proteína bruta
PC	porcentagem de casca
PCA	peso corporal da ave
P	Fósforo
PG	porcentagem de gema
PO	peso dos ovos
PP	porcentagem de produção de ovos
ppm	partes por milhão
PRO	protease
RB_{total}	receita bruta total
RPB	redução de proteína bruta e metionina + cistina
SAS	<i>statistical analysis system</i>
T°C	temperatura ambiente

UH	Unidade Haugh
U.I.	Unidades internacionais
UR	umidade relativa do ar
USP	Universidade de São Paulo
VC	viabilidade criatória

LISTA DE SIMBOLOS

®	marca registrada
±	mais ou menos
<	menor
>	maior
%	porcentagem
°C	graus Celsius
+	sinal de adição
/	sinal de divisão
=	sinal de igualdade
x	sinal de multiplicação
-	sinal de subtração

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo Geral	23
2.1 Objetivos Específicos	23
3 HIPÓTESES	24
4 REVISÃO DE LITERATURA	25
4.1 Fisiologia da digestão de proteínas	25
4.2 Metabolismo de aminoácidos	26
4.3 Efeitos da redução de proteína bruta e metionina + cistina em dietas para poedeiras sobre o desempenho e qualidade de ovos	27
4.4 Enzimas exógenas	29
4.4.1 Protease	30
4.4.2 Formulação de rações com suplementação de protease	31
4.4.3 Efeitos da suplementação com protease em dietas para poedeiras comerciais sobre o desempenho e qualidade dos ovos	32
4.5 Poder poluente das excretas de poedeiras comerciais	34
5 MATERIAL E MÉTODOS	36
5.1 DESCRIÇÃO GERAL	36
5.1.1 Local e Período	36
5.1.2 Animais, Delineamento Experimental e Procedimentos Afins	36
5.1.3 Dietas Experimentais	37
5.2 ENSAIO I: CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO E QUALIDADE DOS OVOS	42
5.2.1 Características de Desempenho	42
5.2.2 Características de qualidade externa dos ovos	44
5.2.3 Características de qualidade interna dos ovos	44
5.3 ENSAIO II: ENSAIO DE METABOLISMO	45
5.4 ANÁLISE ECONÔMICA	46
5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
6.1 Ensaio I – Desempenho e qualidade dos ovos (Fases I, II, III e IV)	49
6.2 Ensaio I – Desempenho e qualidade dos ovos (21 a 70 semanas de idade)	62
6.4 Análise Econômica	68
7 CONCLUSÕES	71
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

1 INTRODUÇÃO

A produção de proteína (carne e ovos) de elevada qualidade nutricional para a alimentação humana é a principal função econômica da avicultura. Porém, dentro do sistema de produção avícola, a alimentação onera com cerca de 70% dos custos totais, sendo os ingredientes proteicos e energéticos os mais custosos. Em vista dessa situação, o conhecimento do metabolismo proteico tem importância no desenvolvimento dessa função, a qual demanda maior atenção dos nutricionistas para a formulação de dietas de aves, geneticamente selecionadas, com a finalidade de atender as exigências nutricionais, resultando em melhor conversão alimentar, eficiência produtiva e contribuindo com a diminuição dos resíduos finais gerados pelo metabolismo dos animais.

Aminoácidos sintéticos como lisina, metionina, triptofano e treonina são utilizados pelos nutricionistas, permitindo a redução dos níveis de proteína bruta das dietas que resulta na minimização das excreções de nitrogênio para o meio ambiente e redução o custo das rações. Para poedeiras comerciais, a metionina exerce importância na produção e no peso dos ovos, além de ser um aminoácido limitante fornecido nas dietas. No entanto, Costa et al. (2014) mencionam algumas limitações na ferramenta de redução dos níveis de proteína bruta das dietas como a disponibilidade economicamente viável de outros aminoácidos essenciais e/ou limitantes; a escassez de conhecimento das exigências de aminoácidos levando a maiores níveis de inclusão e excessos nas dietas por precaução; a deficiência de potássio e a alteração do balanço eletrolítico, uma vez que a redução de proteína bruta colabora com a diminuição de farelo de soja nas dietas, ingrediente rico em potássio; e a necessidade de adequar os níveis de energia metabolizável aos de proteína bruta.

Combinada a valorização de proteína bruta e metionina + cistina nas dietas de aves, os avanços em biotecnologia possibilitaram a utilização de enzimas exógenas como uma estratégia vantajosa para a produção de poedeiras comerciais. Existem diversos estudos consolidando o uso da enzima fitase nas dietas que garantem sua ampla utilização pela indústria (GLITSØ et al., 2012). Dentre suas funções, a enzima exerce papel na redução de fatores antinutricionais e torna nutrientes (fósforo, cálcio, minerais, entre outros) quelatados disponíveis por meio da hidrólise da molécula de fitato contida em ingredientes de origem vegetal.

Por outro lado, o uso de enzima protease é pouco abordado em relação as demais enzimas, já que sua avaliação é difícil de ser realizada pelo fato de não atuar em um nutriente específico, além de ser utilizada na maioria das vezes como parte de complexos enzimáticos.

Dentre os benefícios conhecidos, a alimentação de aves com suplementação de protease pode completar a ação de enzimas endógenas no processo digestivo, neutralizar fatores antinutricionais, promover a maior hidrólise de moléculas de proteínas, melhorar a absorção dos nutrientes, aumentar o valor energético dos alimentos, melhorar a conversão alimentar, reduzir o desperdício e excreção para o meio ambiente e contribuir para a rentabilidade dos produtores.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da redução de proteína bruta e de metionina + cistina da dieta e da inclusão de protease para poedeiras comerciais de 21 a 70 semanas de idade sobre características de desempenho, qualidade dos ovos, metabolismo (Ca, P e N) e análise econômica.

2.1 Objetivos Específicos

Avaliar os efeitos dos tratamentos sobre as características de desempenho (consumo de ração diário, porcentagem de produção, peso e massa dos ovos, conversão alimentar por massa e por dúzia de ovos, peso corporal, porcentagem de ovos vendáveis, viabilidade criatória), qualidade interna (porcentagem de albúmen e gema, Unidade Haugh, Índice de gema) e qualidade externa (densidade aparente do ovo, porcentagem e espessura de casca).

Avaliar os efeitos das dietas sobre o metabolismo de cálcio, fósforo e nitrogênio das aves, a fim de obter a redução das quantidades de excreções para o meio ambiente.

Analisar economicamente a viabilidade da utilização de dietas com redução de proteína bruta e metionina + cistina com suplementação de protease.

3 HIPÓTESES

- I. A redução dos níveis de proteína bruta e metionina + cistina é possível quando há suplementação de protease.
- II. O desempenho e a qualidade dos ovos não sofrem efeitos negativos ao reduzir os níveis de proteína bruta e metionina + cistina das dietas e adicionar protease.
- III. O uso de dietas contendo protease é economicamente viável.
- IV. A utilização de protease melhora o coeficiente de metabolizabilidade do cálcio, fósforo e nitrogênio.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Fisiologia da digestão de proteínas

As proteínas oriundas de diferentes fontes são utilizadas em variados graus de eficiência pelas espécies animais, sendo a solubilidade e a taxa de hidrólise das proteínas no trato gastrointestinal, especialmente estômago e parte superior do intestino delgado, possivelmente, os primeiros fatores limitantes da digestão de proteínas (YU; LEE; CHIOU, 2002). A proteína dietária é a principal fonte de aminoácidos para aves, pois a quantidade microbiana cecal é insuficiente.

Existem fatores que podem influenciar na digestibilidade da proteína, como a sua origem, a presença de carboidratos e proteínas com elevado teor de aminoácido prolina. Além disso, a estrutura química também influencia na digestão, pois quanto maior a força das ligações que a mantem, mais complexa é a ação das enzimas proteolíticas (MACARI; FURLAN e GONZALES, 1994).

Diferente dos mamíferos, o trato digestório das aves é mais curto (MACARI; FURLAN e GONZALES, 1994), portanto há a necessidade de que os nutrientes contidos nas dietas estejam prontamente disponíveis para sua utilização.

O sistema digestório dos animais não ruminantes tem a capacidade de reduzir os nutrientes dos alimentos a pequenos compostos moleculares, por fragmentação mecânica (mastigação), que no caso das aves ocorre na moela, e a digestão química (atividade enzimática), onde esses nutrientes são absorvidos e utilizados para nutrir as células e manter os tecidos do organismo (ARTONI et al., 2014).

No proventrículo, a presença de alimento estimula glândulas compostas para a secreção de ácido clorídrico (HCl) podendo atingir pH entre 1 a 2, extremamente ácido. Nesse local, a quebra da estrutura química das proteínas ocorre pela desnaturação, pois no proventrículo são secretadas enzimas digestivas, como a pepsina, uma endopeptidase que hidrolisa ligações peptídicas, atuando na digestão parcial proteica. Essa enzima é secretada em forma inativa, pepsinogênio, porém em ambiente ácido transforma-se em pepsina, sua forma ativada. Apesar disso, a digestão proteica é maior na moela, local com maior área para a ação enzimática, em função da trituração dos ingredientes. Através da motilidade proventrículo-moela o alimento

vai sendo triturado e digerido, sendo que as proteínas parcialmente digeridas passam para o duodeno (MACARI; FURLAN e GONZALES, 1994; ARTONI et al., 2014).

No duodeno, as proteínas da digesta sofrem a ação das enzimas proteolíticas do pâncreas e do intestino. Dentre as funções realizadas pelo pâncreas exócrino está a secreção por zimogênios inativos, ativados no lúmen intestinal, resultando na ação de enzimas digestivas. As principais enzimas proteolíticas do pâncreas são: tripsina, quimiotripsina, carboxipeptidases A e B e elastase. A tripsina e a quimiotripsina, assim como a pepsina, são endopeptidases que atuam na quebra de ligações peptídicas em locais específicos, enquanto as carboxipeptidases são exopeptidases que hidrolisam as ligações nos terminais carboxila dos peptídeos (MACARI; FURLAN e GONZALES, 1994; ARTONI et al., 2014).

4.2 Metabolismo de aminoácidos

De acordo com Moreira e Pozza (2014), todas as proteínas, desde as provenientes das formas mais simples (microrganismos) até das formas mais complexas de vida (animais domésticos e humanos), são compostas por um grupo de 20 aminoácidos. Diferente das plantas, os animais não são capazes de sintetizar em quantidade e/ou velocidade suficiente todos os aminoácidos, sendo esses denominados de aminoácidos essenciais que devem ser fornecidos nas rações.

Os aminoácidos livres absorvidos pelo intestino vão para corrente sanguínea e são rapidamente degradados pelo fígado. Em consequência, o consumo de aminoácidos em excesso torna-se oneroso, pois além de não serem armazenados pelos animais, o excesso é catabolizado para geração de energia, função exercida pelos carboidratos e lipídeos a mais baixo custo (MOREIRA; POZZA, 2014).

Os animais necessitam de aminoácidos para: 1) manutenção, como no *turnover* da proteína corporal, onde ocorre a degradação da proteína dos tecidos em aminoácidos que são reutilizados na síntese de novas proteínas e o restante metabolizado para resíduos de nitrogênio, glicose, cetonas e/ou dióxido de carbono; 2) produção, como na deposição de proteína em compostos úteis (MOREIRA; POZZA, 2014).

Dentre as utilizações metabólicas, os aminoácidos participam de reações anabólicas na síntese proteica, produzindo novas moléculas proteicas, assim como em reações catabólicas que

envolvem a degradação com excreção de nitrogênio e a produção de moléculas com esqueleto de carbono.

A metionina é o primeiro aminoácido limitante para aves, ou seja, mesmo presente nas dietas, sua inclusão é menor do que a exigida para o máximo desempenho. É um aminoácido essencial por não ser sintetizado pelos animais não ruminantes. A cisteína, entretanto, é sintetizada pela transferência do átomo de enxofre da metionina para o grupo hidroxil de serina. Havendo metionina suficiente, a cisteína não é essencial (MOREIRA; POZZA, 2014).

4.3 Efeitos da redução de proteína bruta e metionina + cistina em dietas para poedeiras sobre o desempenho e qualidade de ovos

Com os avanços no conhecimento do metabolismo proteico das aves e tecnologias relacionadas a disponibilidade comercial de aminoácidos sintéticos como lisina, metionina, treonina e triptofano (KESHAVARZ; AUSTIC, 2004; SCHMIDT et al., 2008), as dietas com baixo teor de proteína podem ser utilizadas como ferramenta na formulação de rações sem afetar o desempenho zootécnico (VIANA et al., 2014), nas diferentes idades e ciclos de produção, atendendo as exigências das aves combinado com o preço dos ingredientes e o valor do produto final (SUIDA, 2001 apud SILVA et al., 2006).¹

O conhecimento adequado sobre as exigências de aminoácidos essenciais para postura, do teor contido nos ingredientes, digestibilidade e biodisponibilidade dos ingredientes e com a proporção de aminoácidos essenciais em dietas de baixo teor proteico são necessários para que não ocorram resultados inferiores aos esperados (HARMS; RUSSEL, 1998).

De acordo com Peganova e Eder (2003) ao reduzirem o teor de proteína bruta das dietas torna-se necessária a suplementação com aminoácidos sintéticos para que não ocorra queda no consumo de ração, na produção de ovos e alterações no comportamento social das aves causando canibalismo. Além disso, a suplementação com aminoácidos é um recurso para reduzir a excreção de nitrogênio nas excretas (WAIBEL et al., 2000) gerando menor quantidade

¹ SUIDA, D. Formulação por proteína ideal e conseqüências técnicas, econômicas e ambientais. In.: SIMPOSIO INTERNACIONAL DE NUTRIÇÃO ANIMAL: PROTEÍNA IDEAL, ENERGIA LIQUIDA E MODELAGEM, 1., 2001, Santa Maria. *Anais...* Santa Maria: 2001. p.1-17.

de resíduos ao meio ambiente por permitir a formulação de dietas próximas da exigência dos animais resultando em melhor aproveitamento da proteína (SCHMIDT et al., 2008).

Silva et al. (2006) ao avaliarem níveis de PB (14%, 15,25% e 16,5%) com suplementação de metionina, lisina ou de ambos em dietas para poedeiras da linhagem Lohmann LSL com 26 semanas de idade e observaram que dietas com os menores teores de PB sem suplementação não afetaram o consumo de ração, conversão alimentar por massa e por dúzia de ovos. Os mesmos autores verificaram que dietas suplementadas com metionina, mesmo quando não combinadas a lisina apresentaram efeitos positivos. Esse resultado deve-se a importância da metionina para aves por ser o primeiro aminoácido essencial limitante. Resultados semelhantes foram encontrados por Brito et al. (2010) que ao utilizarem dieta com suplementação de metionina comparada a dieta basal obtiveram produção de ovos semelhante. Além disso, foi apresentado o baixo consumo de ração em dietas com baixo teor de PB (14,02%) suplementado com pelo menos um dos aminoácidos (lisina, metionina, treonina, triptofano, isoleucina e valina) para poedeiras colaborando com o atendimento das exigências.

Keshavarz e Austic (2004) ao estudarem níveis de proteína bruta (13% e 16%) suplementadas por aminoácidos (metionina, lisina, treonina, triptofano, isoleucina, valina) em dietas de aves da linhagem Babcock B300 não encontraram diferenças para as características de desempenho ao fornecerem dietas com suplementação, independentemente do nível de proteína bruta.

Ao avaliarem três níveis de proteína bruta (14%, 15,5% e 17%) e de aminoácidos sulfurados (0,57%, 0,64% e 0,71%) em dietas para poedeiras semipesadas Isa Brown, Pavan et al. (2005) obtiveram aumento no peso dos ovos à medida que aumentou a inclusão dos aminoácidos sulfurados. No entanto, os tratamentos não diferiram nas características de consumo de ração, produção de ovos, massa de ovos, conversão alimentar por massa e por dúzia de ovos, porcentagem de quebrados e qualidade externa dos ovos. De acordo com os autores ao manipularem os níveis das dietas, os problemas com a qualidade externa devem diminuir ao final do primeiro e segundo ciclo de produção.

Almeida et al. (2012) estudaram o efeito dos níveis de PB (15% e 18%) e EM (2700 e 3100 kcal/kg) em poedeiras comerciais Hy-Line W36 com 20 a 32 semanas de idade e constataram que os níveis mais elevados resultaram em conversão alimentar melhor devido à redução no consumo das aves. Ademais, a massa de ovos foi maior apenas ao fornecerem dietas com 18% PB.

4.4 Enzimas exógenas

Enzimas são catalisadores biológicos que aceleram reações químicas. São proteínas produzidas por produtos de organismos vivos como bactérias e fungos (ARAÚJO et al., 2007).

A aplicação de enzimas para dietas de aves visando a melhora dos nutrientes disponíveis tem sido relatada desde 1926 (MUNIR; MAQSOOD, 2013). Em torno de 1950, amilase e protease foram adicionados as dietas de vários animais de uma fazenda e os benefícios a produtividade foram observados. Inicialmente, as enzimas eram utilizadas em rações compostas por ingredientes com alta quantidade de polissacarídeos não amiláceos (PNAs). Assim, ao incluir protease em dietas à base de farelo de soja foram observadas melhoras na digestibilidade das proteínas e dos PNAs (MARSMANN et al., 1997; CASTRO, 2011).

Atualmente, as enzimas são utilizadas como excelentes alternativas para reduzir os custos de produção, pois permitem a formulação de ração com alterações, minimizando o custo e maximizando o uso de ingredientes energéticos e proteicos nas dietas (ARAÚJO et al., 2007; CASTRO, 2011).

As enzimas exógenas em combinação as endógenas atuam na degradação de complexos compostos em tamanho de partículas menores que facilitam a utilização pelos animais. Portanto, ao utilizá-las nas rações, as enzimas atuam de maneira complementar as enzimas endógenas produzidas pelos animais. Além disso, a utilização de enzimas deve evitar o aumento na viscosidade da digesta, o que melhora a absorção dos nutrientes das rações (DOSKOVIĆ et al., 2013).

Nos últimos 20 anos, o uso de enzimas foi maior devido a adoção de tecnologias ligadas a fitase (ADEOLA; COWIESON, 2011). Praticamente todas as rações comerciais contêm fitase na sua composição, essa enzima age tornando o fósforo ligado ao fósforo fítico em alimentos vegetais disponível. Apesar disso, existem outras classes de enzimas que podem aumentar a utilização de nutrientes das dietas como as xilanases, β -glucanases, pectinases, amilases e, por último, não menos importante, as proteases (GLITSØ et al., 2012).

As respostas das enzimas dependem da concentração de substrato, interação entre os nutrientes, digestibilidade e fatores antinutricionais dos ingredientes. Dessa forma, a fim de obter respostas fisiológicas mais consistentes, não relacionados as variações de digestibilidade ileal do próprio amido, proteína e lipídio, a valorização desses nutrientes deve ser realizada nas

dietas para poder auxiliar na determinação da amplitude dessas respostas (BAO; ROMERO; COWIESON, 2013).

4.4.1 Protease

As enzimas proteolíticas possuem ação catalisadora sobre clivagem de ligações peptídicas realizando a hidrólise total de proteínas (RAO et al, 1998). As proteases extracelulares catalisam a hidrólise de proteínas grandes em aminoácidos para serem absorvidas pela célula, ao passo que as intracelulares participam da regulação do metabolismo, além disso, possuem a capacidade de aumentar a digestibilidade de aminoácidos em uma grande variedade de fontes de ingredientes.

As proteases podem ser obtidas por diversas fontes. Dentre as proteases de origem animal, a tripsina é a principal enzima responsável pela digestão intestinal para hidrólise de proteínas alimentares. Essa enzima é uma protease serina que hidrolisa ligações peptídicas nas quais o grupo carboxila são fornecidos por resíduos de lisina e arginina. No entanto, a hidrólise destes compostos pela tripsina causa sabor amargo. Além disso, as proteases de origem animal somadas as de origem vegetal não conseguem suprir a demanda mundial. Em vista dessas limitações, existe um grande interesse na utilização de proteases microbianas, uma vez que elas possuem diversidade bioquímica e susceptibilidade para a manipulação genética, características desejáveis para a aplicações biotecnológicas. Ademais, as proteases microbianas (bactérias e fungos, por exemplo) são preferíveis em vista do seu rápido crescimento em espaço reduzido e de pronta acessibilidade para a manipulação genética (RAO et al, 1998).

As proteases bacterianas são caracterizadas pela afinidade por pares de aminoácidos hidrofóbicos, pois devido à baixa tolerância térmica possuem a vantagem de controlar a reatividade durante a produção de alimentos hidrolisados com baixo grau de hidrólise.

A maioria das proteases comerciais são produzidas a partir de bactérias pertencem ao gênero *Bacillus* sendo essencialmente neutras e alcalinas. As neutras (pH 5-8), diferente das proteases de origem animal, ao hidrolisarem proteínas geram pouco sabor amargo, o que confere grande valor para a indústria alimentícia, enquanto as proteases alcalinas (pH 10) são indicadas para a indústria de detergente pela sua ampla especificidade de substrato.

Os fungos têm maior capacidade de elaboração de variedades de enzimas em comparação as bactérias. O *Aspergillus oryzae* atua em larga faixa de pH (4-11) e exibe substrato de grande especificidade, porém a velocidade de reação e a tolerância ao calor são menores em relação as bacterianas (RAO et al, 1998).

As proteases podem ser classificadas em dois grupos: exopeptidases e endopeptidases dependendo do sítio de atuação, as quais clivam a ligação peptídica próxima ao grupo amino ou carboxila e clivam as ligações externas, respectivamente. Assim, com base no grupo funcional, as proteases são classificadas em quatro grupos: serina, aspárticas, cisteína e metaloproteases (RAO et al, 1998).

No grupo da serina encontra-se a enzima comercial *Ronozyme Proact* produzida por fermentação submersa de *Bacillus licheniformis* contendo genes transcritos a partir de *Nocardiopsis prasina* (ANGEL et al., 2011). Para a seleção das características dessa enzima foram considerados os seguintes fatores: 1) capacidade de degradar diferentes proteínas dos ingredientes das dietas; 2) necessidade de complementar as proteases endógenas; 3) estabilidade após serem expostas ao pH baixo da moela e do ventrículo; 4) estabilidade durante o processamento dos ingredientes (SMITH, 2011).

4.4.2 Formulação de rações com suplementação de protease

O uso de proteases não tem sido muito explorado como outras enzimas. Geralmente são adicionadas as dietas como parte de complexos enzimáticos, o que limita o conhecimento sobre a forma de utilização e os seus benefícios. Existem vários perfis de proteases livres e novos mecanismos de ação têm sido propostos, já que diferentes proteases conferem em resultados distintos, o que pode estar relacionado a compatibilidade com as enzimas endógenas e/ou modificações da proteína da soja. Por isso, estudos são necessários para elucidar os mecanismos de interação entre a proteína da soja e a protease suplementada (ADEOLA; COWIESON, 2011).

O farelo de soja contém cerca de 45-48% PB e é altamente digestível. Enquanto, o milho possui baixa quantidade de proteína de 8,5-8,8%, mas com alta inclusão gerando elevada contribuição na proteína total das dietas (ODETALLAH et al., 2005). Embora dietas à base de milho e farelo de soja sejam altamente digestíveis pelas aves, há a possibilidade de utilizar

enzimas as dietas para ocasionar melhorias, uma vez que frequentes variações da composição dos nutrientes ocorrem tanto para o nível de proteína bruta como para os aminoácidos (THORPE; BEAL, 2001 apud DOSKOVIĆ et al., 2013).²

A necessidade de suplementação de enzimas exógenas em dietas à base de milho e farelo de soja é geralmente negligenciada (YU et al., 2007; LIMA et al., 2007), pois o uso dessas dietas foi adotado por não causar problemas digestivos de modo que as enzimas não fossem exigidas. No entanto, diversos pesquisadores demonstraram fatores antinutricionais nessas dietas como β -glucanas, β -manose, inibidores de protease e lectina. Além disso, nos últimos anos, o aumento do custo do farelo de soja tem elevado a busca por alternativas para aperfeiçoar seu valor nutricional. Assim, as dietas vegetais contêm maiores teores de substratos para a atuação das enzimas e sua inclusão reduz a síntese endógena, com isso, o organismo tem à disposição maior quantidade de aminoácidos para a síntese proteica e tecidual (LIMA et al., 2007).

Comumente, o nutricionista escolhe a forma de suplementação enzimática por meio de abordagens econômicas, sendo a aplicação mais simples chamada “*over the top*” ou “*on top*” (em cima). Essa aplicação consiste em acrescentar a enzima com a formulação padrão, sem alterar os níveis nutricionais. Outra forma seria alterando a formulação da ração por meio da redução (valorização) dos nutrientes e adição das enzimas com o intuito de fornecer o mesmo valor nutricional (valores da matriz nutricional) da dieta padrão sem afetar negativamente o desempenho das aves. No entanto, ainda restam dúvidas quanto a matriz dos produtos e como formular as dietas para obter elevada eficiência (BARBOSA et al., 2008; ADEOLA; COWIESON, 2011; DOSKOVIĆ et al., 2013).

4.4.3 Efeitos da suplementação com protease em dietas para poedeiras comerciais sobre o desempenho e qualidade dos ovos

A maioria dos estudos com suplementação de enzimas protease foram conduzidos com frangos de corte sendo relativamente pouco reportado o uso para poedeiras.

² THORPE, J.; BEAL, J. D. (2001) Vegetable Protein Meals and the Effects of Enzymes, In: BEDFORD, M. R.; PARTRIDGE, G.G. (Eds) Enzymes in Farm Animal Nutrition, p. 125-143 (CABI Publishing, Wallingford, Oxford, UK).

Dentre as principais enzimas, as proteases são as mais complicadas de serem avaliadas devido ao fato delas não atuarem em um nutriente específico, diferente da fitase e da amilase que atuam no fósforo e no amido, respectivamente, a protease age sobre os aminoácidos, a proteína bruta e, também possibilitam poupar energia metabolizável das dietas.

Ademais, a interpretação dos dados de estudos com proteases é considerada complexa por causa dos efeitos adversos quando há presença de mais de uma atividade enzimática em um mesmo tratamento. As variações nos resultados também podem ocorrer devido aos diversos ingredientes utilizados na alimentação e da não especificidade do tipo de protease. Estudos com somente uma atividade enzimática são mais fáceis de serem interpretados, por não proporcionarem competição pelo mesmo substrato, porém esse tipo de estudo é escasso (FREITAS et al., 2011), tornando as respostas em relação ao uso de protease pouco consolidadas.

As proteases podem contribuir para melhorar o valor nutricional das dietas através da hidrólise de certos tipos de proteínas que resistem ao processo digestivo complementando as enzimas endógenas digestivas das aves (CASTRO, 2011). Para atuarem nesse processo devem conferir a propriedade de serem resistentes as condições gastrointestinais, sendo resistência ao baixo pH estomacal e as proteases digestivas secretadas pelo estômago e intestino delgado (GLITSØ et al., 2012).

Yadav e Sah (2006) ao estudarem os efeitos de dietas com redução de proteína bruta e níveis crescentes de inclusão de protease em poedeiras com 24 semanas de idade, verificaram aumento significativo da produção de ovos no período de 24 a 40 semanas de idade ao fornecerem dietas com 0,1% de protease, sem haver diferença no peso do ovo. As dietas com inclusão de enzima e redução de PB também tiveram efeitos positivos para conversão alimentar, espessura da casca dos ovos e foi obtida maior retorno econômico.

O uso de complexo enzimático contendo fitase, celulase, pectinase, protease, amilase, β -glucanase e xilanase em diferentes níveis em dietas *on top* para poedeiras com 60 semanas de idade não influenciou os parâmetros produtivos avaliados (OBA et al., 2013). Esse estudo mostrou que os nutrientes fornecidos na dieta basal são suficientes para suprir as exigências das aves.

Ao suplementarem poedeiras Isa Brown de 44 semanas de idade com níveis de EM de 2715 e 2730 kcal/kg e 500 g/ton de protease, Vieira Filho et al. (2015) não encontraram diferenças no consumo de ração das aves e na qualidade de casca dos ovos. No entanto, os

autores relataram que a produção de ovos ao utilizar dietas contendo protease foi significativamente semelhante ao tratamento controle positivo. Esse resultado sugere que a produção de ovos pode ser influenciada pela mudança dos níveis de EM nas dietas, assim a protease tem a capacidade de atuar aumentando a disponibilidade de energia e de aminoácidos contidos nas dietas.

4.5 Poder poluente das excretas de poedeiras comerciais

As proteases são aplicadas na indústria de alimentos tendo em vista tecnologias que respeitam o meio ambiente. Oxenboll, Pontoppidan e Fru-Nji (2011) ao avaliarem o ciclo de vida de uma protease no meio ambiente, concluíram que seu uso contribui significativamente na redução de emissões de nitrogênio provindas da produção animal intensiva. Atualmente, a utilização de protease está entre as técnicas preventivas para minimizar a excreção de nitrogênio pelas aves, pois a inclusão de proteases em ração de aves tem o intuito de aperfeiçoar o aproveitamento da dieta e buscando evidenciar os conceitos de proteína ideal.

Além disso, o conhecimento das exigências de aminoácidos nas dietas evita o fornecimento em excesso que é altamente prejudicial por sofrerem desaminação e o nitrogênio ser excretado na forma de ácido úrico pelas aves refletindo em gastos energéticos para o animal (DESSIMONI, 2011).

A concentração de ácido úrico na urina das aves varia de 0,1 a 1,0 mol/L. Embora o ácido úrico seja o mais prevalente produto nitrogenado de excreção, a excreção de amônia é relativamente elevada em aves. Frangos alimentados com dietas ricas em proteína excretam cerca de 25% do nitrogênio na forma de amônia (MOREIRA; POZZA, 2014).

Com a redução de proteína bruta das dietas tem sido demonstrado que a cada ponto percentual de redução ocorre redução de 10% na excreção fecal de nitrogênio e redução de 3 a 5% no consumo de água em animais no período de crescimento (CAPUTI; COSTA; NOGUEIRA, 2011) colaborando com a diminuição da umidade das excretas.

Yadav & Sav (2006) verificaram que aves alimentadas com dietas com redução de proteína bruta e suplementação por níveis de protease apresentaram aumentos significativos nos coeficientes de digestibilidade para os nutrientes proteína bruta e extrato etéreo. Além disso,

houve aumento do coeficiente de extrato não nitrogenado ao usar dietas com suplementação de 0,075% e 0,1% de protease.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 DESCRIÇÃO GERAL

5.1.1 Local e Período

Os experimentos foram conduzidos no Aviário Experimental do Laboratório de Avicultura da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo – FZEA/USP, localizado no Campus Administrativo de Pirassununga, São Paulo, durante 52 semanas, divididas em quatro períodos, Fase I (21 a 32 semanas de idade), Fase II (33 a 44 semanas de idade), Fase III (45 a 58 semanas de idade) e Fase IV (59 a 70 semanas de idade), de 11 de março de 2014 a 13 de março de 2015.

5.1.2 Animais, Delineamento Experimental e Procedimentos Afins

Os procedimentos realizados nesse estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/FZEA/USP, processo N° 14.1.541.74.0.

Foram utilizadas 168 poedeiras comerciais, da linhagem Hy-Line W36, distribuídas em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 2, com os fatores: Redução de proteína bruta e metionina + cistina (controle, valorização de uma e duas vezes da enzima protease) e Protease (sem e com), totalizando seis tratamentos com sete repetições, de acordo com as recomendações nutricionais do Manual de Padrões de Desempenho Hy-Line W36 (2011).

O Ensaio I (Desempenho) foi realizado com sete repetições de quatro aves cada e o Ensaio II (Metabolismo) com seis repetições de duas aves cada.

A temperatura (T°C) e umidade relativa do ar (UR) do interior do aviário foram monitoradas diariamente pelo aparelho HOBO® Data Logger (Onset®, Bourne, Massachusetts). Esses dados foram captados por sensores a cada hora do dia.

As aves foram submetidas ao programa de iluminação artificial visando adequar a idade da ave com o fotoperíodo natural conforme o descrito no manual da linhagem. Durante o período experimental foram fornecidas 16 h/luz/dia com a intensidade luminosa de 38,57 lumén/m².

5.1.3 Dietas Experimentais

As dietas fareladas foram formuladas à base de milho e farelo de soja para atender as exigências sugeridas pelo Manual de Padrões de Desempenho Hy-Line W36 (HY-LINE, 2011), exceto para o nível de proteína bruta e de metionina + cistina, nas diferentes fases de produção (Tabela 1). Água e ração foram fornecidas *ad libitum*.

Tabela 1 - Indicação dos tratamentos

Tratamentos	Fatores	
	Redução de proteína bruta e metionina + cistina	Protease
1	Controle	Sem
2	Controle menos uma vez a valorização da matriz da enzima	Sem
3	Controle menos duas vezes a valorização da matriz da enzima	Sem
4	Controle	Com
5	Controle menos uma vez a valorização da matriz da enzima	Com
6	Controle menos duas vezes a valorização da matriz da enzima	Com

Foram inclusas as dietas 600 FYT/kg da enzima fitase valorizando 0,15% do fósforo disponível e 0,15% do cálcio. A enzima fitase utilizada foi a RONOZYME[®] HiPhos (GT) na forma granulada termoestável, a qual possui o sítio ativo 6-phytase (E.C. 3.1.3.26) obtida por fermentação por meio de fungos *Aspergillus Oryzae*.

A enzima protease utilizada foi a RONOZYME[®] ProAct (CT), produzida por fermentação submergida a partir de *Bacillus licheniformis* contendo genes transcritos *Nocardiosis prasina*. A atividade dessa protease é medida em unidades PROT, sendo uma unidade definida como a quantidade liberada de 1 µmol de *p-nitroanilina* a partir de 1 µM de substrato (Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-*p-Nitroanilina*) por minuto a pH 9,0 e 37°C. Essa protease comercial consiste em 75000 PROT/g de enzima.

A composição percentual e os níveis calculados das dietas experimentais referentes a Fase I (21 a 32 semanas de idade), Fase II (33 a 44 semanas de idade), Fase III (45 a 58 semanas de idade) e Fase IV (59 a 70 semanas de idade) encontram-se nas tabelas 2, 3, 4, e 5, respectivamente.

Tabela 2- Dietas experimentais da Fase I (21 a 32 semanas de idade) para poedeiras comerciais (Consumo médio calculado para 84 g/ave/dia)

Ingredientes (%)	Tratamentos					
	CP	CN1	CN2	CP+ protease	CN1+ protease	CN2+ protease
Milho (7,87%)	45,872	48,053	50,264	45,872	48,053	50,264
Farelo de Soja (45%)	33,748	31,953	30,124	33,748	31,953	30,124
Calcário	10,752	10,752	10,753	10,752	10,752	10,753
Óleo de soja	6,691	6,305	5,910	6,691	6,305	5,910
Fosfato bicálcico	1,882	1,897	1,911	1,882	1,897	1,911
Sal comum	0,489	0,489	0,489	0,489	0,489	0,489
Metionina ¹	0,340	0,309	0,278	0,340	0,309	0,278
L-Lisina	0,007	0,023	0,052	0,007	0,023	0,052
Cloreto de colina	0,030	0,030	0,030	0,030	0,030	0,030
Antioxidante ²	0,013	0,013	0,013	0,013	0,013	0,013
Suplemento ³	0,150	0,150	0,150	0,150	0,150	0,150
Inerte ⁴	0,020	0,020	0,020	0,008	0,008	0,008
Fitase	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006
Protease	-	-	-	0,012	0,012	0,012
Total	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
Níveis calculados (%)						
EM (kcal/kg)	2900	2900	2900	2900	2900	2900
Proteína bruta	19,05	18,41	17,77	19,05	18,41	17,77
Cálcio	4,61	4,61	4,61	4,61	4,61	4,61
Fósforo Disponível	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45
Sódio	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21
Cloro	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34
Potássio	0,75	0,72	0,70	0,75	0,72	0,70
Xantofila (mg/kg)	10,03		10,99	10,03		10,99
Aminoácidos digestíveis (%)						
Metionina	0,47	0,45	0,45	0,47	0,45	0,45
Metionina+cistina	0,80	0,76	0,72	0,80	0,76	0,72
Lisina	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96
Triptofano	0,22	0,21	0,20	0,22	0,21	0,20
Treonina	0,65	0,63	0,61	0,65	0,63	0,61

CP – Controle positivo (T1); CN1 - Controle negativo com menos uma vez a valorização da enzima protease (T4); CN2 – Controle negativo com menos duas vezes a valorização da enzima protease (T3); CP + protease – CP com 120 ppm de protease (T4); CN1 + protease – CN1 com 120 ppm de protease (T5); CN2 + protease – CN2 com 120 ppm de protease (T6).

¹Metionina Hidroxi-Análoga (MHA): 88% de metionina;

²Feed Guard®: Etoxiquina, BHT, TBHQ e Ácido cítrico.

³Suplementação de minerais e vitaminas por kg do produto: Cobre (mínimo) 0,024 g; Ferro (mínimo) 0,15 g; Manganês (mínimo) 0,21 g; Zinco (mínimo) 0,15 g; Iodo (mínimo) 3,6 mg; Selênio (mínimo) 0,6 mg; Vitamina A (mínimo) 9.000 U.I; Vitamina D3 (mínimo) 3.000 U.I; Vitamina E (mínimo) 15 U.I; Vitamina K3 (mínimo) 2,4 mg; Vitamina B1 (mínimo) 2,1 mg; Vitamina B2 (mínimo) 6 mg; Vitamina B6 (mínimo) 3 mg; Vitamina B12 (mínimo) 12 mcg; Niacina (mínimo) 0,0375 g; Ácido Pantotênico (mínimo) 0.0165 g; Ácido Fólico (mínimo) 0,6 mg. 4Inerte: Areia lavada.

Tabela 3 - Dietas experimentais da Fase II (33 a 44 semanas de idade) para poedeiras comerciais (Consumo médio calculado para 95 g/ave/dia)

Ingredientes (%)	Tratamentos					
	CP	CN1	CN2	CP+ protease	CN1+ protease	CN2+ protease
Milho (7,87%)	57,374	59,387	61,415	57,374	59,387	61,415
Farelo de Soja (45%)	25,779	24,090	22,359	25,779	24,090	22,359
Calcário	10,171	10,172	10,172	10,171	10,172	10,172
Óleo de soja	4,302	3,937	3,571	4,302	3,937	3,571
Fosfato bicálcico	1,453	1,467	1,481	1,453	1,467	1,481
Sal comum	0,437	0,437	0,437	0,437	0,437	0,437
Metionina ¹	0,241	0,216	0,208	0,241	0,216	0,208
L-Lisina	0,024	0,075	0,128	0,024	0,075	0,128
L-Triptofano	-	-	0,010	-	-	0,010
Cloreto de colina	0,030	0,030	0,030	0,030	0,030	0,030
Antioxidante ²	0,013	0,013	0,013	0,013	0,013	0,013
Suplemento ³	0,150	0,150	0,150	0,150	0,150	0,150
Inerte ⁴	0,020	0,020	0,020	0,008	0,008	0,008
Fitase	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006
Protease	-	-	-	0,012	0,012	0,012
Total	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
Níveis calculados (%)						
EM (kcal/kg)	2900	2900	2900	2900	2900	2900
Proteína bruta	16,32	15,75	15,18	16,32	15,75	15,18
Cálcio	4,27	4,27	4,27	4,27	4,27	4,27
Fósforo Disponível	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36
Sódio	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19
Cloro	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31
Potássio	0,64	0,61	0,59	0,64	0,61	0,59
Xantofila (mg/kg)	12,55	12,99	13,43	12,55	12,99	13,43
Aminoácidos digestíveis (%)						
Metionina	0,39	0,39	0,39	0,39	0,39	0,39
Metionina+cistina	0,66	0,62	0,59	0,66	0,62	0,59
Lisina	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79
Triptofano	0,18	0,17	0,17	0,18	0,17	0,17
Treonina	0,56	0,54	0,52	0,56	0,54	0,52

CP – Controle positivo (T1); CN1 - Controle negativo com menos uma vez a valorização da enzima protease (T4); CN2 – Controle negativo com menos duas vezes a valorização da enzima protease (T3); CP + protease – CP com 120 ppm de protease (T4); CN1 + protease – CN1 com 120 ppm de protease (T5); CN2 + protease – CN2 com 120 ppm de protease (T6).

¹Metionina Hidroxi-Análoga (MHA): 88% de metionina;

²Feed Guard®: Etoxiquina, BHT, TBHQ e Ácido cítrico.

³ Suplementação de minerais e vitaminas por kg do produto: Cobre (mínimo) 0,024 g; Ferro (mínimo) 0,15 g; Manganês (mínimo) 0,21 g; Zinco (mínimo) 0,15 g; Iodo (mínimo) 3,6 mg; Selênio (mínimo) 0,6 mg; Vitamina A (mínimo) 9.000 U.I; Vitamina D3 (mínimo) 3.000 U.I; Vitamina E (mínimo) 15 U.I; Vitamina K3 (mínimo) 2,4 mg; Vitamina B1 (mínimo) 2,1 mg;

Vitamina B2 (mínimo) 6 mg; Vitamina B6 (mínimo) 3 mg; Vitamina B12 (mínimo) 12 mcg; Niacina (mínimo) 0,0375 g; Ácido Pantotênico (mínimo) 0.0165 g; Ácido Fólico (mínimo) 0,6 mg. 4Inerte: Areia lavada.

Tabela 4 - Dietas experimentais da Fase III (45 a 58 semanas de idade) para poedeiras comerciais (Consumo médio calculado para 95 g/ave/dia)

Ingredientes (%)	Tratamentos					
	CP	CN1	CN2	CP+ protease	CN1+ protease	CN2+ protease
Milho (7,87%)	58,171	59,815	61,478	58,171	59,815	61,478
Farelo de Soja (45%)	25,094	23,714	22,294	25,094	23,714	22,294
Calcário	10,701	10,702	10,702	10,701	10,702	10,702
Óleo de soja	3,853	3,554	3,253	3,853	3,554	3,253
Fosfato bicálcico	1,297	1,308	1,319	1,297	1,308	1,319
Sal comum	0,437	0,437	0,436	0,437	0,437	0,436
Metionina ¹	0,211	0,192	0,185	0,211	0,192	0,185
L-Lisina	-	0,035	0,078	-	0,035	0,078
L-Treonina	-	-	0,004	-	-	0,004
L-Triptofano	0,017	0,024	0,032	0,017	0,024	0,032
Cloreto de colina	0,030	0,030	0,030	0,030	0,030	0,030
Antioxidante ²	0,013	0,013	0,013	0,013	0,013	0,013
Suplemento ³	0,150	0,150	0,150	0,150	0,150	0,150
Inerte ⁴	0,020	0,020	0,020	0,008	0,008	0,008
Fitase	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006
Protease	-	-	-	0,012	0,012	0,012
Total	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
Níveis calculados (%)						
EM (kcal/kg)	2872	2872	2872	2872	2872	2872
Proteína bruta	16,05	15,59	15,12	16,05	15,59	15,12
Cálcio	4,43	4,43	4,43	4,43	4,43	4,43
Fósforo Disponível	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33
Sódio	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19
Cloro	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31
Potássio	0,63	0,61	0,59	0,63	0,61	0,59
Xantofila (mg/kg)	12,72		13,45	12,72		13,45
Aminoácidos digestíveis (%)						
Metionina	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37
Metionina+cistina	0,63	0,60	0,57	0,63	0,60	0,57
Lisina	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
Triptofano	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19
Treonina	0,55	0,53	0,52	0,55	0,53	0,52

CP – Controle positivo (T1); CN1 - Controle negativo com menos uma vez a valorização da enzima protease (T4); CN2 – Controle negativo com menos duas vezes a valorização da enzima protease (T3); CP + protease – CP com 120 ppm de protease (T4); CN1 + protease – CN1 com 120 ppm de protease (T5); CN2 + protease – CN2 com 120 ppm de protease (T6).

¹Metionina Hidroxi-Análoga (MHA): 88% de metionina;

²Feed Guard®: Etoxiquina, BHT, TBHQ e Ácido cítrico.

³ Suplementação de minerais e vitaminas por kg do produto: Cobre (mínimo) 0,024 g; Ferro (mínimo) 0,15 g; Manganês (mínimo) 0,21 g; Zinco (mínimo) 0,15 g; Iodo (mínimo) 3,6 mg; Selênio (mínimo) 0,6 mg; Vitamina A (mínimo) 9.000 U.I; Vitamina D3 (mínimo) 3.000 U.I; Vitamina E (mínimo) 15 U.I; Vitamina K3 (mínimo) 2,4 mg; Vitamina B1 (mínimo) 2,1 mg; Vitamina B2 (mínimo) 6 mg; Vitamina B6 (mínimo) 3 mg; Vitamina B12 (mínimo) 12 mcg; Niacina (mínimo) 0,0375 g; Ácido Pantotênico (mínimo) 0.0165 g; Ácido Fólico (mínimo) 0,6 mg. 4Inerte: Areia lavada.

Tabela 5 - Dietas experimentais da Fase IV (59 a 70 semanas de idade) para poedeiras comerciais (Consumo médio calculado para 88 g/ave/dia)

Ingredientes (%)	Tratamentos					
	CP	CN1	CN2	CP+ protease	CN1+ protease	CN2+ protease
Milho (7,87%)	53,397	54,966	57,259	53,397	54,966	57,259
Farelo de Soja (45%)	28,170	26,890	24,928	28,170	26,890	24,928
Calcário	12,210	12,211	12,211	12,210	12,211	12,211
Óleo de soja	4,217	3,942	3,538	4,217	3,942	3,538
Fosfato bicálcico	1,113	1,124	1,140	1,113	1,124	1,140
Sal comum	0,463	0,463	0,462	0,463	0,463	0,462
Metionina ¹	0,211	0,187	0,187	0,211	0,187	0,187
L-Lisina	-	-	0,052	-	-	0,052
L-Treonina	-	-	0,004	-	-	0,004
Cloreto de colina	0,030	0,030	0,030	0,030	0,030	0,030
Antioxidante ²	0,013	0,013	0,013	0,013	0,013	0,013
Suplemento ³	0,150	0,150	0,150	0,150	0,150	0,150
Inerte ⁴	0,020	0,020	0,020	0,008	0,008	0,008
Fitase	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006
Protease	-	-	-	0,012	0,012	0,012
Total	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
Níveis calculados (%)						
EM (kcal/kg)	2811	2811	2811	2811	2811	2811
Proteína bruta	17,05	16,58	15,93	17,05	16,58	15,93
Cálcio	4,96	4,96	4,96	4,96	4,96	4,96
Fósforo Disponível	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30
Sódio	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
Cloro	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32
Potássio	0,67	0,65	0,62	0,67	0,65	0,62
Xantofila (mg/kg)	11,68	12,02	12,52	11,68	12,02	12,52
Aminoácidos digestíveis (%)						
Metionina	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38
Metionina+cistina	0,65	0,62	0,59	0,65	0,62	0,59
Lisina	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79
Triptofano	0,19	0,18	0,17	0,19	0,18	0,17
Treonina	0,59	0,57	0,55	0,59	0,57	0,55

CP – Controle positivo (T1); CN1 - Controle negativo com menos uma vez a valorização da enzima protease (T4); CN2 – Controle negativo com menos duas vezes a valorização da enzima protease (T3); CP + protease – CP com 120 ppm de protease (T4); CN1 + protease – CN1 com 120 ppm de protease (T5); CN2 + protease – CN2 com 120 ppm de protease (T6).

¹Metionina Hidroxi-Análoga (MHA): 88% de metionina;

²Feed Guard®: Etoxiquina, BHT, TBHQ e Ácido cítrico.

³ Suplementação de minerais e vitaminas por kg do produto: Cobre (mínimo) 0,024 g; Ferro (mínimo) 0,15 g; Manganês (mínimo) 0,21 g; Zinco (mínimo) 0,15 g; Iodo (mínimo) 3,6 mg; Selênio (mínimo) 0,6 mg; Vitamina A (mínimo) 9.000 U.I; Vitamina D3 (mínimo) 3.000 U.I; Vitamina E (mínimo) 15 U.I; Vitamina K3 (mínimo) 2,4 mg; Vitamina B1 (mínimo) 2,1 mg; Vitamina B2 (mínimo) 6 mg; Vitamina B6 (mínimo) 3 mg; Vitamina B12 (mínimo) 12 mcg; Niacina (mínimo) 0,0375 g; Ácido Pantotênico (mínimo) 0,0165 g; Ácido Fólico (mínimo) 0,6 mg. ⁴Inerte: Areia lavada.

A valorização dos níveis de proteína bruta e metionina + cistina foi realizada a partir da formulação da dieta (composição e níveis nutricionais calculados) controle positivo sem

inclusão de protease (CP) de cada fase de produção. Utilizando a base de dados de ensaios de digestibilidade, periodicamente revisados, fornecida pela empresa que desenvolveu, é possível determinar o valor nutricional da enzima em determinado substrato permitindo a redução dos níveis através do cálculo da matriz nutricional da protease (Tabela 6).

Tabela 6 – Descrição da matriz nutricional da protease utilizada para cada fase de produção

Níveis valorizados (%)	Fase I		Fase II		Fase III		Fase IV	
	1x matriz	2x matriz	1x matriz	2x matriz	1x matriz	2x matriz	1x matriz	2x matriz
Proteína Bruta	0,64	1,28	0,57	1,14	0,46	0,92	0,47	0,94
Metionina + Cistina	0,04	0,08	0,04	0,08	0,03	0,06	0,03	0,06

5.2 ENSAIO I: CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO E QUALIDADE DOS OVOS

5.2.1 Características de Desempenho

Foram utilizadas 168 poedeiras comerciais Hy-Line W36 alojadas em Aviário Experimental de Poedeiras e distribuídas em gaiolas metálicas (1,00m x 0,40m x 0,45m) divididas em quatro compartimentos (uma ave por compartimento), munidas de comedouro frontal externo e bebedouro tipo copo (Figura 1).

Figura 1 - Vista externa (a) e interna (b) do Aviário Experimental de Postura da FZEA

Fonte: Próprio autor.

As características de desempenho avaliadas foram consumo de ração diário (CRD), porcentagem de produção (PP), peso (PO) e massa dos ovos (MO), conversão alimentar por massa (CMO) e por dúzia de ovos (CDZ), peso corporal das aves (PCA), porcentagem de ovos vendáveis (OV) e viabilidade criatória (VC).

A cada quatro semanas (28 dias), caracterizando um período de avaliação, as aves e as rações foram pesadas para obtenção das características de desempenho. A produção de ovos foi registrada diariamente para a obtenção do número de ovos colhidos por parcela experimental dividido pelo número de aves da mesma e o quociente multiplicado por 100. A porcentagem de ovos vendáveis foi obtida pela quantidade de ovos quebrados por parcela experimental dividido pelo número de aves da mesma e o quociente multiplicado por 100.

Ao término de cada período de avaliação, três ovos por repetição foram colhidos aleatoriamente, identificados e pesados individualmente para obtenção do peso médio.

A massa do ovo foi calculada pela multiplicação da porcentagem de ovos produzidos pelo peso médio do ovo. Assim, a conversão alimentar por massa de ovo foi expressa pela relação entre o consumo de ração/ave/dia e a massa do ovo. A conversão alimentar por dúzia foi expressa pela relação entre o consumo total de ração e a quantidade de dúzias de ovos produzidas. Posteriormente, estes ovos passaram por análise da qualidade externa e interna.

5.2.2 Características de qualidade externa dos ovos

A análise da densidade aparente do ovo que consiste na imersão dos ovos em soluções salinas, cuja concentração irá variar de 1,060 a 1,100 g/mL de H₂O, sendo que a densidade aparente será o valor da concentração da solução salina em que o ovo irá flutuar (MORENG; AVENS, 1990). Conforme Faria et al. (2000), após essa operação os ovos foram quebrados e as respectivas cascas mergulhadas em água para retirar parte da clara que estiver aderida. As cascas devidamente identificadas foram secadas a temperatura ambiente por 72 horas para posterior pesagem.

A medida de espessura da casca foi realizada com um micrômetro digital de resolução 0,001 mm (Mitutoyo, Japão). Em seguida, as cascas foram pesadas para a obtenção da porcentagem de casca calculada através da seguinte fórmula: casca (%) = (peso da casca / peso do ovo) x 100.

5.2.3 Características de qualidade interna dos ovos

Os ovos foram quebrados sobre uma superfície lisa e plana. Para a determinação da Unidade Haugh (HAUGH, 1937) foi realizada utilizando um paquímetro manual, a medida de altura de albúmen. Em seguida, a UH foi calculada de acordo com a equação: $UH = 100 \log (H + 7,57 - 1,7W^{0,37})$, onde H=altura de albúmen e W=peso do ovo inteiro.

Para a obtenção das características índice e porcentagem de gema foram medidos com o auxílio de um paquímetro manual e uma balança digital de precisão 0,001 g, a altura, diâmetro e peso da gema para obtenção das características índice de gema e porcentagem de gema. O índice da gema foi calculado pela razão entre a altura e a média do diâmetro da gema (MORENG; AVENS, 1990). Quanto maior o índice da gema, melhor a qualidade do ovo. A porcentagem de gema foi calculada pela relação entre o peso da gema e o peso do ovo inteiro e o resultado obtido multiplicado por 100.

Para o cálculo da porcentagem de albúmen foi utilizada a equação: $PA = 100 - (PC + PG)$, em que PC=porcentagem de casca e PG=porcentagem de gema.

A cor de gema foi obtida através da comparação visual com leque colorimétrico *Yolk Color Fun DSM®*, variando o escore de 1 a 15, sendo 1 para o amarelo mais claro e 15 para o mais escuro.

5.3 ENSAIO II: ENSAIO DE METABOLISMO

Após o término de cada fase de postura (I, II, III e IV) foram realizados ensaios de metabolismo para quantificar os teores de cálcio, fósforo e nitrogênio das excretas. O delineamento experimental foi mantido, porém com seis repetições por tratamento com duas aves cada (duas aves por gaiola), totalizando 72 aves. As aves foram selecionadas e transferidas para o Aviário Experimental de Ensaio de Metabolismo e alojadas em gaiolas de arame galvanizado (0,90m x 0,70m x 0,50m) contendo bandejas para colheita de excretas, piso adequado, munidas de bebedouros do tipo *nipple* ajustáveis e comedouros do tipo calha (Figura 2). A água e a ração foram fornecidas *ad libitum* durante todo o período experimental.

Figura 2 - Vista interna do aviário experimental de ensaio de metabolismo

Fonte: Próprio autor.

O método utilizado foi de colheita total de excretas adaptado de Sakomura e Rostagno (2007). Os ensaios tiveram duração de oito dias, sendo três para adaptação e cinco dias para colheitas diárias das excretas às 16h30. Foi adicionado 1,0% de óxido férrico, em todas as rações, no primeiro e no último dia, como marcador do início e do término da coleta das excretas. Durante o ensaio foram anotadas as quantidades de rações consumidas e de excretas produzidas.

As amostras de cada parcela experimental foram armazenadas em potes plásticos devidamente identificadas e congeladas em freezer (-18 a -22°C) para posterior análise. O descongelamento foi feito em ambiente natural à sombra.

As amostras das rações e das excretas foram submetidas as análises laboratoriais de matéria seca (SILVA; QUEIROZ, 2006), cálcio e fósforo (AOAC, 1996). O nitrogênio (N) foi analisado pelo método de DUMAS (250 mg padrão) pelo equipamento Elementar Rapid N Cube (Elementar, Hanau, Alemanha) que é basicamente uma técnica de oxidação seca. Com esses dados foram calculados os coeficientes de metabolizabilidade aparente de MS (CMAMS), nitrogênio (CMAN), cálcio (CMACa) e fósforo (CMAP) das dietas através da fórmula:

$$CMNT (\%) = \left[\frac{CRNT - EXNT}{CRNT} \right] \times 100$$

Sendo,

CMNT = coeficiente de metabolizabilidade do nutriente;

CRNT = quantidade do nutriente consumida em gramas;

EXNT = quantidade do nutriente excretada em gramas;

5.4 ANÁLISE ECONÔMICA

A análise econômica foi baseada no consumo e custo da ração e na quantidade das dúzias de ovos produzidas por tratamento dentro de cada fase de postura.

A margem bruta de comercialização (*MB*) foi escolhida para a análise por representar a rentabilidade do produtor. A *MB* considera a receita da venda dos animais e o custo da dieta. Portanto, não considera nos cálculos os custos com processamento, energia, mão de obra, transporte, entre outros, pois estes não interferem nos resultados, vistos que são iguais para todos os tratamentos.

A margem bruta (*MB*) é a diferença entre a receita bruta total (*RB*) e o custo total da dieta (*CT*) (1), sendo *RB* o total obtido pela venda da produção (dúzias de ovos) e o custo variável é a remuneração por fatores de produção empregados no processo produtivo cujas as quantidades variam em proporção direta com o volume de produção, sendo neste estudo representado pelo *CT_a* que significa custo total de alimentação (GAMEIRO, 2009).

$$MB = RB - CT \quad (1)$$

Os preços nominais mensais dos últimos 10 anos, compreendendo o período de março de 2005 a março de 2015, para os ingredientes milho, farelo de soja e ovos grandes brancos foram obtidos na base de dados do Instituto de Economia Agrícola (IEA – APTA). Esses preços foram corrigidos pelo Índice Nacional de Preços ao Consumidor (INPC), do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) utilizando o Número Índice Acumulado, para o mês de março de 2015, de acordo com o método usual (2), apresentado, por exemplo, em Hoffman (2006). Os preços dos demais ingredientes das dietas não possuem séries históricas, portanto foram obtidos por meio de cotações junto aos fornecedores referentes ao mês de março de 2015. A cotação do dólar adotada para as enzimas fitase e protease foi de 3,15 (abril de 2015).

Os preços reais dos ingredientes utilizados encontram-se na Tabela 7.

$$P_{real,n} = P_{nominal,n} \times \frac{INPC_{março/2015}}{INPC_n} \quad (2)$$

Sendo,

$P_{real, n}$ = Preço real do ingrediente no mês n;

$P_{nominal, n}$ = Preço nominal do ingrediente no mês n;

$INPC_{março/2015}$ = Número Índice Acumulado para o mês de março de 2015;

$INPC_n$ = Número Índice Acumulado, para o mês n;

Prosseguiu-se com o cálculo do custo do quilograma das dietas (CTd) por tratamento para cada fase de postura considerando as quantidades de ingredientes calculadas anteriormente na formulação das dietas. Assim, com o custo por quilograma das dietas, calculou-se o custo total com alimentação (CTa) através da multiplicação do CTd pela quantidade total consumida (CR) em cada fase por tratamento.

Os dados de consumo de ração e dúzias de ovos produzidas no total foram obtidos previamente no Ensaio I (desempenho). Por fim, a análise dos indicadores foi realizada comparando as diferenças numéricas entre os tratamentos dentro de cada fase de produção.

Tabela 7 - Preços médios reais de ingredientes utilizados nas dietas (R\$/kg) e da dúzia de ovos (dúzias)

Ingredientes	Preços médios reais (R\$/kg)
Milho ¹	0,47
Farelo de Soja 45% ¹	1,11
Calcário ²	0,14
Óleo de Soja ²	2,65
Fosfato Bicálcico ²	2,19
Sal Comum ²	0,28
Suplemento Mineral e Vitamínico ²	7,60
Metionina Hidroxi-Análoga ²	22,59
L-Lisina ²	5,09
L-Treonina ²	10,11
L-Triptofano ²	86,69
Cloreto de Colina ²	4,15
Fitase ²	40,95
Protease ²	56,70
Antioxidante ²	15,94
Dúzia de ovos grandes brancos ¹	2,19

Fonte: ¹IEA – APTA; ²Levantamento de dados

5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos nos Ensaio I e II foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando o procedimento *General Linear Model* (GLM) e as médias dos tratamentos, quando significativas, foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5% com o auxílio do programa estatístico *Statistical Analysis System* – SAS (2002).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Ensaio I – Desempenho e qualidade dos ovos (Fases I, II, III e IV)

Os valores médios de temperatura e umidade relativa do ar máximas e mínimas para cada fase de postura encontram-se na Tabela 8. De acordo com o manual da linhagem (HY-LINE, 2011), a temperatura recomendada para as aves em produção é de 26 a 27 °C em ambiente com ventilação capaz de manter a qualidade do ar adequada.

As médias de temperatura registradas na Fase I e II, compreendendo as estações de outono e inverno, estão de acordo com o recomendado pelo manual da linhagem. Entretanto, na Fase III, período que abrangeu a estação da primavera e início do verão, as médias foram elevadas, podendo ter interferido na expressão do desempenho das aves. A Fase IV ocorreu durante o verão onde as médias mantiveram-se elevadas.

Tabela 8 - Médias de temperatura (T°C) e umidade relativa do ar (UR) máximas e mínimas para Fase I (21 a 32 semanas de idade), Fase II (33 a 44 semanas de idade), Fase III (45 a 58 semanas de idade) e Fase IV (59 a 70 semanas de idade)

Períodos	T°C máx (°C)	T°C mín (°C)	UR máx (%)	UR mín (%)
Fase I	27,68 ± 2,55	17,04 ± 2,74	70,57 ± 7,60	31,12 ± 8,41
Fase II	27,60 ± 2,09	15,20 ± 1,36	59,10 ± 11,64	26,18 ± 5,96
Fase III	30,78 ± 2,26	20,39 ± 1,81	64,01 ± 14,44	31,27 ± 8,83
Fase IV	32,56 ± 2,76	21,94 ± 0,80	81,34 ± 5,92	33,97 ± 7,78
Média Total	29,66 ± 2,44	18,64 ± 3,08	68,76 ± 9,62	30,63 ± 3,25

De acordo com o manual da linhagem (HY-LINE, 2011) foram calculadas as médias de consumo de ração diário, produção de ovos, peso dos ovos, massa de ovos, conversão alimentar por massa de ovos, peso corporal das aves e Unidade Haugh para corroborar com a discussão dos resultados obtidos nesse estudo (Tabela 9).

Tabela 9 – Valores médios calculados de consumo de ração diário (CRD, g/ave/dia), produção de ovos (PP, %), peso (PO, g), massa (MO, g) e conversão alimentar por massa de ovos (CMO), peso corporal das aves (PCA, kg) e Unidade Haugh (UH) conforme o Manual Hy-Line W36 (2011)

	Idade (Semanas)				
	21 a 32 sem	33 a 44 sem	45 a 58 sem	59 a 70 sem	21 a 70 sem
CRD	87,58	97,08	100,21	98,75	95,91
PP¹	90,33	92,08	87,86	83,25	88,38
PO	54,36	59,99	61,54	63,30	59,80
MO	49,10	55,24	54,07	52,70	52,78
CMO	1,78	1,76	1,85	1,87	1,82
PCA	1,49	1,54	1,56	1,56	1,54
UH	95,15	91,28	88,24	86,55	90,31

¹Produção de ovos em condições normais

Fonte: Adaptado do Manual Hy-Line W36 (2011)

Na Fase I de produção, não foram verificadas diferenças significativas ($P>0,05$) entre os fatores estudados para as variáveis consumo de ração diário, produção de ovos, massa de ovos, conversão alimentar por massa e dúzia de ovos, peso corporal das aves e ovos vendáveis (Tabela 10). De acordo com o manual da linhagem (HY-LINE, 2011), os resultados de produção de ovos, massa de ovos, conversão alimentar por massa de ovos e peso corporal das aves apresentaram médias melhores, mesmo obtendo a média do consumo de ração diário menor do que o esperado.

Constatou-se interação significativa ($P<0,05$) entre os fatores redução de proteína bruta e metionina + cistina e protease para peso de ovos e peso corporal das aves (Tabela 11). As aves alimentadas com suplementação da enzima em dietas controle obteve-se maior peso de ovos em comparação as isentas de protease. Ademais, ao incluir protease nas dietas, o peso de ovos obtido na dieta controle não diferiu da dieta com uma vez a valorização da protease. Esse resultando deve-se, possivelmente, a melhora da digestibilidade dos aminoácidos ao incluir protease nas dietas, uma vez que a metionina é o primeiro aminoácido limitante para o peso dos ovos. Os valores obtidos de peso de ovos foram melhores que o esperado (54,37 g), de acordo com o manual da linhagem (HY-LINE, 2011), diferente de Pavan et al. (2005) que observaram aumento do peso dos ovos conforme aumentaram a suplementação de aminoácidos sulfurados nas rações. Para peso corporal, aves alimentadas com dietas controle sem inclusão da enzima protease apresentaram maior peso, no entanto esse resultado não afetou no desempenho das poedeiras.

Tabela 10 - Valores médios de consumo de ração (CRD, g/ave/dia), produção (PP, %), peso (PO, g), massa (MO, g), conversão alimentar por massa (CMO) e por dúzia de ovos (CDZ, g/dz), peso corporal das aves (PCA, kg) e ovos vendáveis (OV, %) de poedeiras comerciais para Fase I (21 a 32 semanas de idade) de produção

	Redução de proteína bruta e metionina + cistina			Protease		ANOVA (p-valor)			
	Controle	1x matriz	2x matriz	Sem	Com	RPB	PRO	RPBx PRO	CV ¹ (%)
CRD	84,72	84,70	86,51	86,43	84,19	0,44	0,10	0,78	4,98
PP	90,56	91,84	92,30	92,39	90,75	0,41	0,14	0,92	3,86
PO*	57,43	56,88	56,47	56,71	57,14	0,30	0,39	0,04	2,84
MO	52,02	52,26	52,12	52,42	51,85	0,97	0,51	0,23	5,24
CMO	1,63	1,62	1,66	1,65	1,63	0,64	0,41	0,23	6,58
CDZ	1,26	1,23	1,26	1,26	1,24	0,59	0,52	0,76	5,26
PCA*	1,45	1,43	1,42	1,45	1,41	0,38	0,03	0,05	3,79
OV	99,87	99,55	99,81	99,63	99,86	0,11	0,08	0,73	0,41

Médias seguidas de diferentes letras em cada linha para cada fator diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05)

¹CV - Coeficiente de variação

*Houveram interações significativas (P<0,05) entre os fatores e o desdobramento dos tratamentos encontra-se na Tabela 11

Tabela 11 - Desdobramento da interação de características peso médio do ovo (g) e peso corporal (kg) de poedeiras comerciais para Fase I (21 a 32 semanas de idade) de produção

Peso do ovo (g)			Peso corporal (kg)	
Protease			Protease	
RPB	Sem	Com	Sem	Com
Controle	56,27Ba	58,59Aa	1,45	1,44
1x matriz	56,99	56,77ab	1,44	1,43
2x matriz	56,86	56,07b	1,47A	1,37B

Médias seguidas de letras minúsculas (maiúsculas) diferem entre si nas colunas (linhas) para cada característica desdobrada pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade

Vieira Filho et al. (2015) ao avaliarem a redução do nível energético de dietas com e sem suplementação de protease para poedeiras, não encontraram efeitos significativos na produção de ovos (P>0,05), no entanto obtiveram menor peso de ovos ao fornecerem dietas com redução do nível de energia com ou sem suplementação de protease em relação a dieta basal.

Para a qualidade interna dos ovos, não foram encontrados efeitos significativos (P>0,05) para as características porcentagem de albúmen e gema, Unidade Haugh e Índice de gema. A variável cor da gema apresentou diferenças (P<0,05) com coloração mais intensa para ovos de poedeiras alimentadas por dietas com valorização de uma e duas vezes a matriz da protease,

assim como ao fornecer dietas com suplementação de protease (Tabela 12). Esse resultado corrobora com Leeson e Summers (2005) que verificaram a relação entre o aumento do nível de xantofila nas dietas com a melhora na cor de gema dos ovos avaliados através do leque colorimétrico *Yolk Color Fun DSM®*, na escala de 1 a 15.

Tabela 12 - Valores médios de porcentagem de albúmen (PA, %), porcentagem de gema (PG, %), Unidade Haugh (UH), Índice (IG) e cor de gema (CG) de ovos provenientes de poedeiras comerciais para Fase I (21 a 32 semanas de idade) de produção

	Redução de proteína bruta e metionina + cistina			Protease		ANOVA (p-valor)			
	Controle	1x matriz	2x matriz	Sem	Com	RPB	PRO	RPBx PRO	CV ¹ (%)
PA	66,88	66,95	66,49	66,62	66,93	0,59	0,43	0,28	1,92
PG	24,19	24,96	24,40	24,24	24,13	0,37	0,64	0,24	3,37
UH	105,59	104,99	105,80	105,32	105,60	0,63	0,69	0,65	2,19
IG	0,43	0,43	0,42	0,43	0,42	0,71	0,26	0,34	3,53
CG	6,91b	7,09ab	7,24a	7,00b	7,16a	0,01	0,04	0,31	3,68

Médias seguidas de diferentes letras em cada linha para cada fator diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05)

¹CV - Coeficiente de variação

Para qualidade externa, a redução de proteína bruta e metionina + cistina proporcionou efeitos positivos sobre a porcentagem de casca dos ovos de aves alimentadas com dieta controle e com valorização de duas vezes da enzima protease. Houve efeito da protease para as características de qualidade externa dos ovos avaliadas que apresentaram respostas positivas ao fornecer dietas com suplementação da enzima (Tabela 13). A qualidade externa da casca pode ter sido melhorada devido a interação entre as enzimas presentes nas dietas das poedeiras, onde as proteases colaboraram para a hidrólise das proteínas deixando o ácido fítico mais livre para a ação da fitase.

Na Fase II de produção, houveram diferenças (P<0,05) na redução de proteína bruta e metionina + cistina para a característica conversão alimentar por dúzia de ovos que foi melhor ao alimentar as aves utilizando dietas com valorização de duas vezes a enzima. A inclusão de protease nas dietas não apresentou efeito sobre o peso das aves, sendo maior em dietas isentas da enzima. Não foram apresentados efeitos significativos (P>0,05) dos tratamentos sobre as variáveis consumo de ração diário, produção de ovos, peso de ovos, massa de ovos, conversão alimentar por massa de ovos e ovos vendáveis (Tabela 14). No entanto, as características

produção de ovos, peso de ovos, massa de ovos e conversão alimentar por massa de ovos apresentaram melhores resultados que o esperado (HY-LINE, 2011).

Tabela 13 - Valores médios de porcentagem de casca (PC, %), espessura de casca (EC, mm) e densidade aparente (DA, g/mL) de ovos provenientes de poedeiras comerciais para Fase I (21 a 32 semanas de idade) de produção

	Redução de proteína bruta e metionina + cistina			Protease		ANOVA (p-valor)			CV ¹ (%)
	Controle	1x matriz	2x matriz	Sem	Com	RPB	PRO	RPBx PRO	
PC	9,33ab	9,28b	9,52a	9,27b	9,48a	0,03	0,01	0,55	2,64
EC	0,42	0,42	0,43	0,42b	0,43a	0,26	0,03	0,25	2,50
DA	1,090	1,090	1,090	1,089b	1,090a	0,71	0,01	0,39	0,14

Médias seguidas de diferentes letras em cada linha para cada fator diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05)

¹CV - Coeficiente de variação

Tabela 14 - Valores médios de consumo de ração (CRD, g/ave/dia), produção (PP, %), peso (PO, g), massa (MO, g), conversão alimentar por massa (CMO) e por dúzia de ovos (CDZ, g/dz), peso corporal das aves (PCA, kg) e ovos vendáveis (OV, %) de poedeiras comerciais Fase II (33 a 44 semanas de idade) de produção

	Redução de proteína bruta e metionina + cistina			Protease		ANOVA (p-valor)			CV ¹ (%)
	Controle	1x matriz	2x matriz	Sem	Com	RPB	PRO	RPBx PRO	
CRD	90,38	90,65	89,81	91,33	89,23	0,86	0,11	0,67	4,67
PP	94,36	93,92	94,30	94,38	94,01	0,89	0,64	0,53	2,75
PO	60,76	60,85	60,20	60,44	60,77	0,64	0,58	0,06	3,22
MO	57,33	57,16	56,79	57,04	57,14	0,85	0,91	0,22	4,61
CMO	1,58	1,59	1,58	1,60	1,56	0,97	0,22	0,28	6,49
CDZ	1,31a	1,32a	1,16b	1,27	1,25	<0,0001	0,28	0,69	5,32
PCA	1,52	1,50	1,49	1,53a	1,49b	0,44	0,05	0,12	4,44
OV	99,86	99,77	99,68	99,73	99,81	0,47	0,47	0,10	0,39

Médias seguidas de diferentes letras em cada linha para cada fator diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05)

¹CV - Coeficiente de variação

Ao avaliar as características de qualidade interna dos ovos, as médias de porcentagem de gema, Unidade Haugh e Índice de gema não apresentaram diferenças (P>0,05) entre os tratamentos estudados. A variável porcentagem de albúmen foi influenciada (P<0,05) pela

redução de proteína bruta e metionina + cistina com maiores valores observados para ovos de aves alimentadas com dietas controle e com uma vez a valorização da enzima protease, no entanto, essa diferença não apresenta influência negativa para a qualidade dos ovos. A redução de proteína bruta e metionina + cistina apresentou efeitos sobre os ovos de poedeiras alimentadas com dietas com uma e duas vezes a valorização da protease mantendo a cor da gema mais intensa em relação ao controle, assim como na Fase I (Tabela 15).

Tabela 15 - Valores médios de porcentagem de albúmen (PA, %), porcentagem de gema (PG, %), Unidade Haugh (UH), Índice (IG) e cor de gema (CG) de ovos provenientes de poedeiras comerciais para Fase II (33 a 44 semanas de idade) de produção

	Redução de proteína bruta e metionina + cistina			Protease		ANOVA (p-valor)			
	Controle	1x matriz	2x matriz	Sem	Com	RPB	PRO	RPBx PRO	CV ¹ (%)
PA	64,86ab	65,05a	64,22b	64,89	64,54	0,03	0,17	0,18	1,28
PG	26,17	25,92	26,63	26,10	26,38	0,06	0,24	0,21	2,91
UH	102,87	102,80	103,32	103,38	102,62	0,73	0,20	0,47	1,83
IG	0,42	0,41	0,41	0,41	0,41	0,30	0,37	0,29	3,18
CG	6,13b	6,51a	6,48a	6,32	6,43	0,01	0,33	0,50	5,77

Médias seguidas de diferentes letras em cada linha para cada fator diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

¹CV - Coeficiente de variação

Para qualidade externa dos ovos, a protease apresentou efeitos significativos ($P < 0,05$) positivos para as características de densidade aparente e espessura de casca quando utilizadas dietas com suplementação da enzima (Tabela 16). Esse resultado pode ser devido a interação entre as enzimas das dietas que possibilitam a maior liberação de ácido fítico para a ação da fitase, em virtude da hidrólise de proteínas pela protease.

Para Fase III, verificou-se efeito ($P < 0,05$) do fator protease para a característica de peso corporal das aves que obteve maior média para aves alimentadas com dietas isentas de protease em relação as dietas com inclusão da enzima, sendo este resultado maior em relação ao confiado pelo no manual da linhagem. Não houveram diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os fatores avaliados para as características consumo de ração diário, produção de ovos, peso de ovos, massa de ovos, conversão alimentar por massa e por dúzia de ovos e ovos vendáveis (Tabela 17).

Tabela 16 - Valores médios de porcentagem de casca (PC, %), espessura de casca (EC, mm) e densidade aparente (DA, g/mL) de ovos provenientes de poedeiras comerciais para Fase II (33 a 44 semanas de idade) de produção

	Redução de proteína bruta e metionina + cistina			Protease		ANOVA (p-valor)			
	Controle	1x matriz	2x matriz	Sem	Com	RPB	PRO	RPBx PRO	CV ¹ (%)
PC	8,97	9,00	9,15	9,01	9,12	0,17	0,10	0,24	2,37
EC	0,43	0,42	0,42	0,42b	0,43a	0,42	0,05	0,55	1,95
DA	1,090	1,090	1,090	1,085b	1,090a	0,57	0,05	0,46	0,14

Médias seguidas de diferentes letras em cada linha para cada fator diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05)

¹CV - Coeficiente de variação

Tabela 17 - Valores médios de consumo de ração (CRD, g/ave/dia), produção (PP, %), peso (PO, g), massa (MO, g), conversão alimentar por massa (CMO) e por dúzia de ovos (CDZ g/dz), peso corporal (PCA, kg) e ovos vendáveis (OV, %) de poedeiras comerciais para Fase III (45 a 58 semanas de idade) de produção

	Redução de proteína bruta e metionina + cistina			Protease		ANOVA (p-valor)			
	Controle	1x matriz	2x matriz	Sem	Com	RPB	PRO	RPBx PRO	CV ¹ (%)
CRD	83,38	81,51	83,36	82,71	82,76	0,34	0,98	0,95	4,57
PP	87,62	86,85	87,98	88,26	86,71	0,65	0,13	0,93	3,72
PO	62,49	61,63	61,22	62,04	61,51	0,18	0,35	0,62	2,93
MO	54,73	53,56	53,85	54,76	53,33	0,44	0,07	0,94	4,60
CMO	1,53	1,53	1,53	1,52	1,54	0,98	0,29	0,32	4,32
CDZ	1,13	1,12	1,12	1,12	1,12	0,55	0,72	0,36	3,28
PCA	1,72	1,67	1,69	1,73a	1,66b	0,42	0,03	0,14	5,87
OV	83,93	83,95	84,34	84,31	83,84	0,58	0,19	0,92	1,37

Médias seguidas de diferentes letras em cada linha para cada fator diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05)

¹CV - Coeficiente de variação

Não foram verificados efeitos (P>0,05) entre os fatores para as características de porcentagem de albumen, porcentagem e cor de gema. Constatou-se diferença significativa (P<0,05) para a característica de Unidade Haugh, a qual apresentou melhor média para ovos de aves alimentadas com dieta controle. No entanto, ao considerar a classificação adotada pelo *United States Department of Agriculture* (USDA) ilustrada no *USDA Egg-Grading Manual* (USDA, 2000), quanto mais elevado o valor de Unidade Haugh, melhor a qualidade dos ovos, sendo estes classificados por tipo: AA (excelente) apresentando valores superiores a 72, A (alta) entre 60 e 71 e B (inferior) com valores menores que 60. Portanto, mesmo apresentando

diferenças envolvendo a redução de proteína bruta e metionina + cistina, as médias de Unidade Haugh estão classificadas como excelentes (Tabela 18).

Tabela 18 - Valores médios de porcentagem de albúmen (PA, %), porcentagem de gema (PG, %), Unidade Haugh (UH), Índice (IG) e cor de gema (CG) de ovos provenientes de poedeiras comerciais Fase III (45 a 58 semanas de idade) de produção

	Redução de proteína bruta e metionina + cistina			Protease		ANOVA (p-valor)			
	Controle	1x matriz	2x matriz	Sem	Com	RPB	PRO	RPBx PRO	CV ¹ (%)
PA	65,33	64,50	65,10	64,74	65,21	0,36	0,34	0,62	2,41
PG	26,86	27,03	26,96	27,11	26,78	0,81	0,16	0,42	2,65
UH	102,92a	101,57b	100,76b	101,66	101,69	0,001	0,81	0,53	1,28
IG*	0,40	0,39	0,39	0,39	0,39	0,17	0,09	0,02	2,32
CG	6,42	6,30	6,56	6,45	6,40	0,13	0,64	0,79	5,06

Médias seguidas de diferentes letras em cada linha para cada fator diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05)

¹CV - Coeficiente de variação

*Houveram interações significativas (P<0,05) entre os fatores e o desdobramento dos tratamentos encontra-se na Tabela 19

Houve interação (P<0,05) envolvendo os fatores redução de proteína bruta e metionina + cistina e protease para a variável Índice de gema. Foi verificado melhor índice para ovos de aves alimentadas com dietas contendo protease com duas vezes a valorização da enzima em relação a dieta sem suplementação (Tabela 19).

Tabela 19 - Desdobramento da interação de características índice de gema de ovos de poedeiras comerciais para Fase III (45 a 58 semanas de idade) de produção

RPB	Protease	
	Sem	Com
Controle	0,40a	0,39
1x matriz	0,39ab	0,39
2x matriz	0,38Bb	0,40A

Médias seguidas de letras minúsculas (maiúsculas) diferem entre si nas colunas (linhas) para cada característica desdobrada pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Para qualidade externa dos ovos, não foram encontradas diferenças significativas (P>0,05) para os fatores estudados sobre as características avaliadas (Tabela 20).

Tabela 20 - Valores médios de porcentagem de casca (PC, %), espessura de casca (EC, mm) e densidade aparente (DA, g/mL) de ovos provenientes de poedeiras comerciais para Fase III (45 a 58 semanas de idade) de produção

	Redução de proteína bruta e metionina + cistina			Protease		ANOVA (p-valor)			
	Controle	1x matriz	2x matriz	Sem	Com	RPB	PRO	RPBx PRO	CV ¹ (%)
PC	8,73	8,71	8,74	8,74	8,72	0,95	0,73	0,83	2,48
EC	0,41	0,40	0,41	0,41	0,41	0,35	0,86	0,53	2,98
DA	1,085	1,085	1,085	1,085	1,085	0,89	0,79	0,87	0,16

Médias seguidas de diferentes letras em cada linha para cada fator diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05)

¹CV - Coeficiente de variação

Para Fase IV de produção, houve influência significativa (P<0,05) da protease para as variáveis consumo de ração diário, conversão por massa e por dúzia de ovos. Foi observado menor consumo ao alimentar as aves com dietas suplementadas com protease em comparação as dietas isentas, colaborando com os resultados positivos para as conversões alimentares (Tabela 21).

Esse resultado corrobora com Yadav e Sah (2006) que obtiveram melhora na conversão alimentar por massa de ovos ao fornecerem dietas com redução 1,0 % PB e inclusão 0,1 % de protease, assim como Vieira Filho et al. (2015), em experimento semelhante, ao alimentarem as aves com dietas contendo protease e nível de energia reduzido, não diferindo do controle positivo. Em estudo com frangos de corte, Fru-Nji et al. (2011) analisaram dois níveis de proteína bruta para fase inicial (211 e 200 g PB por kg de ração) e de crescimento (200 e 190 g PB por kg de ração) em dietas com adição ou não de protease (15000 PROT/kg) e mostraram significantes reduções no consumo de ração e melhoras na conversão alimentar de aves alimentadas com dietas suplementadas em relação as dietas sem enzima.

Embora exista ampla variedade de proteases endógenas sintetizadas e liberadas no trato gastrointestinal serem suficientes para o aproveitamento da proteína das rações, quantidade expressivas de proteína bruta e aminoácidos passam pelo trato sem serem completamente digeridos, portanto a suplementação com proteases exógenas possibilita o incremento da utilização desses nutrientes (ANGEL et al., 2011). Portanto, a redução no consumo de ração das aves alimentadas com suplementação de protease, com resultados positivos de conversão alimentar, pode ter ocorrido em virtude do aumento da digestibilidade dos nutrientes. Além disso, conforme o envelhecimento das aves, suas exigências nutricionais diminuem

demonstrando a necessidade de conhecer os requerimentos para cada idade (MOGHADDAN et al., 2012).

Tabela 21 - Valores médios de consumo de ração (CRD, g/ave/dia), produção (PP, %), peso (PO, g), massa (MO, g), conversão alimentar por massa (CMO) e por dúzia de ovos (CDZ, g/dz dz), peso corporal (PCA, kg), ovos vendáveis (OV, %) e viabilidade criatória (VC, %) de poedeiras comerciais para Fase IV (59 a 70 semanas de idade) de produção

	Redução de proteína bruta e metionina + cistina			Protease		ANOVA (p-valor)			
	Controle	1x matriz	2x matriz	Sem	Com	RPB	PRO	RPBx PRO	CV ¹ (%)
CRD	101,98	101,85	102,64	102,75a	100,55b	0,84	0,001	0,12	3,72
PP	84,62	85,01	84,38	84,39	84,94	0,90	0,62	0,48	4,25
PO	62,72	62,66	61,98	62,42	62,49	0,53	0,90	0,78	3,05
MO*	52,63	53,24	52,41	52,81	52,81	0,45	0,89	0,001	3,26
CMO	1,93	1,90	1,96	1,95a	1,90b	0,20	0,05	0,22	4,08
CDZ	1,28	1,26	1,29	1,29a	1,26b	0,21	0,02	0,37	3,82
PCA	1,64	1,62	1,61	1,65	1,59	0,69	0,06	0,06	5,44
OV	84,10	83,85	83,90	83,64	84,26	0,89	0,18	0,48	1,75
VC	98,21	98,43	98,21	95,24b	100,00a	0,76	0,04	0,76	7,57

Médias seguidas de diferentes letras em cada linha para cada fator diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05)

¹CV - Coeficiente de variação

*Houveram interações significativas (P<0,05) entre os fatores e o desdobramento dos tratamentos encontra-se na Tabela 22

Nessa fase, os resultados de consumo de ração diário e produção de ovos foram maiores que a média esperada, entretanto, a conversão alimentar por massa de ovos foi pior que o esperado. Apesar disso, o peso e a massa de ovos foram semelhantes ao confiado pelo manual da linhagem.

Não foram observadas diferenças (P>0,05) entre os tratamentos para as características de produção de ovos, peso do ovo, peso corporal das aves e ovos vendáveis (Tabela 21).

Houveram interações significativas (P<0,05) envolvendo os fatores estudados para massa de ovos. Os ovos de aves alimentadas com dietas valorizadas em duas vezes a matriz da enzima isentas de protease apresentaram maior média de massa de ovos em comparação a dietas com adição da enzima (Tabela 22).

Tabela 22 - Desdobramento da interação de características massa de ovo (g) de poedeiras comerciais para Fase IV (59 a 70 semanas de idade) de produção

RPB	Protease	
	Sem	Com
Controle	51,35a	53,90a
1x matriz	53,03ab	53,45ab
2x matriz	54,00Ab	50,81Bb

Médias seguidas de letras minúsculas (maiúsculas) diferem entre si nas colunas (linhas) para cada característica desdobrada pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Não foram constatados efeitos ($P>0,05$) dos fatores sobre as variáveis de qualidade interna dos ovos (Tabela 23).

Para qualidade externa dos ovos, a redução de proteína bruta e metionina + cistina apresentou diferenças significativas ($P<0,05$) para as características de porcentagem e espessura de casca. Verificou-se que ambas obtiveram médias melhores e semelhantes para ovos de aves alimentadas com dietas controle e com duas vezes a valorização da protease (Tabela 24).

Tabela 23 - Valores médios de porcentagem de albúmen (PA, %), porcentagem de gema (PG, %), Unidade Haugh (UH), Índice (IG) e cor de gema (CG) de ovos provenientes de poedeiras comerciais Fase IV (59 a 70 semanas de idade) de produção

	Redução de proteína bruta e metionina + cistina			Protease		ANOVA (p-valor)			
	Controle	1x matriz	2x matriz	Sem	Com	RPB	PRO	RPBx PRO	CV ¹ (%)
PA	64,25	64,04	64,39	64,02	64,43	0,50	0,11	0,81	1,23
PG	27,09	27,59	27,02	27,44	27,04	0,06	0,06	0,72	2,38
UH	98,87	98,83	99,20	98,69	99,27	0,88	0,35	0,11	2,13
IG	0,38	0,38	0,37	0,38	0,37	0,79	0,56	0,78	3,27
CG	6,33	6,23	6,41	6,30	6,35	0,51	0,71	0,27	6,50

Médias seguidas de diferentes letras em cada linha para cada fator diferem entre si pelo teste de Tukey ($P<0,05$)

¹CV - Coeficiente de variação

Tabela 24 - Valores médios de porcentagem de casca (PC, %), espessura de casca (EC, mm) e densidade aparente (DA, g/mL) de ovos provenientes de poedeiras comerciais para Fase IV (59 a 70 semanas de idade) de produção

	Redução de proteína bruta e metionina + cistina			Protease		ANOVA (p-valor)			
	Controle	1x matriz	2x matriz	Sem	Com	RPB	PRO	RPBx PRO	CV ¹ (%)
PC	8,65a	8,37b	8,60ab	8,55	8,53	0,03	0,85	0,48	3,26
EC	0,38a	0,36b	0,37a	0,37	0,37	0,0002	0,17	0,21	2,38
DA	1,080	1,080	1,080	1,080	1,080	0,16	0,09	0,15	0,16

Médias seguidas de diferentes letras em cada linha para cada fator diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05)

¹CV - Coeficiente de variação

Os resultados exibidos nesse estudo são coerentes com o apresentado por Jacob et al. (2000) que não encontraram diferenças significativas para produção de ovos ao reduzirem o nível de proteína bruta e incluírem protease nas dietas de poedeiras. Assim como, em estudo semelhante, Vieira Filho et al. (2015) não obtiveram diferenças ao avaliarem dietas com redução do nível de energia metabolizável, com ou sem suplementação de protease. Entretanto, esses resultados diferem de Yadav e Sah (2006) que obtiveram aumento na produção de ovos de aves poedeiras alimentadas com redução de 1,0% PB e suplementação de 0,1% de protease em comparação a dieta basal.

As dietas com redução de proteína e metionina + cistina com a valorização de uma e duas vezes a matriz da protease foram suficientes para a manutenção das aves e produção de ovos, uma vez que não houve aumento e/ou diferenças no consumo de ração em relação ao controle para todas as fases de produção.

De acordo com Bedford (2002) o fornecimento de dietas que atendam às exigências das aves para todos os nutrientes e energia não possibilita que as enzimas demonstrem o seu valor, diminuindo o tamanho da resposta esperada, assim como da identificação da forma de atuação das enzimas. Estudo conduzido por Oba et al. (2013) reforça essa afirmação ao avaliarem dietas “on top” com níveis de inclusão de complexo enzimático contendo fitase, celulase, pectinase, protease, β -glucanase e xilanase para poedeiras no final do ciclo de produção (60 semanas de idade) não foram apontadas melhoras para as características de desempenho e qualidade dos ovos. Deste modo, a utilização de matrizes nutricionais ligeiramente deficientes com a inclusão de enzima pode ocorrer a liberação de nutrientes que o animal não necessita ou que não irão resultar em maiores índices produtivos (LECZNIESKI, 2006 apud MURAKAMI et al., 2007),

evidenciando a importância do conhecimento dos ingredientes utilizados para a valorização dos nutrientes das dietas.³

O aumento do peso do ovo é de considerável importância econômica, especialmente no início da produção de ovos e em períodos de elevada temperatura (ANTAR et al., 2004). Nesse estudo, a interação entre os fatores estudados mostrou maior peso de ovos ao alimentar as aves com dietas controle contendo protease na Fase I de produção, no entanto nas demais fases não houveram diferenças dentro dos fatores estudados, mesmo com a elevação da temperatura ambiente.

Geralmente, não foram encontrados efeitos dos fatores estudados sobre as características de qualidade interna dos ovos, apesar disso, os resultados de Unidade Haugh obtidos foram superiores aos esperados, segundo o manual da linhagem (HY-LINE, 2011).

Os fatores estudados influenciaram nas características de qualidade externa dos ovos observando-se melhores resultados para ovos de poedeiras alimentadas com dietas suplementadas em comparação as dietas isentas de protease. De maneira semelhante, Yadav e Sah (2006) ao incluírem 0,075% de protease em dietas com redução de 1,0 % PB para poedeiras obtiveram melhores valores de espessura de casca. Por outro lado, Viera Filho et al. (2015) que não constataram diferenças significativas para as características de qualidade externa dos ovos avaliadas.

Comumente, a enzima protease é utilizada em pesquisas como componente de complexos enzimáticos que não permitem o emprego de seus dados para a avaliação de experimentos com a inclusão de protease como única enzima estudada, principalmente para galinhas poedeiras. Além disso, existem diversas proteases no mercado que implicam em diferentes formas de utilização, atividades enzimáticas, recomendações para inclusão, assim como tomadas de decisões para a formulação das dietas, modificação da matriz dos ingredientes, (ADEOLA; COWIESON, 2011; ANGEL et al., 2011; GLITSØ et al., 2012).

³ LECZNIESKI, J.L. Enzimas, visão brasileira. In: FORUM DE ENZIMAS, 2006, Curitiba. Anais... Curitiba: DSM Nutritional Products, 2006. p. 1-13.

6.2 Ensaio I – Desempenho e qualidade dos ovos (21 a 70 semanas de idade)

Os resultados de desempenho, qualidade interna e externa dos ovos provenientes de poedeiras comerciais para o período total de produção encontram-se nas Tabelas 25, 26 e 27.

Não foram encontradas diferenças significativas ($P>0,05$) dos fatores estudados para as características de consumo de ração diário, produção de ovos, peso de ovos, conversão alimentar por massa de ovos e ovos vendáveis (Tabela 25). A variável conversão alimentar por massa de ovos apresentou melhores médias ao fornecer dietas com valorização de uma ou duas vezes da matriz da enzima protease em relação ao controle dentro do fator redução de proteína bruta e metionina + cistina, assim como ao fornecer dietas com inclusão de protease.

Verificou-se efeitos ($P<0,05$) sobre o peso corporal e a viabilidade criatória para aves alimentadas com inclusão de protease nas dietas apresentando menor peso e melhor viabilidade, em comparação a dietas sem a enzima.

As características de consumo de ração diário, produção de ovos, peso de ovos e peso corporal das aves ao considerar o período total de produção estão abaixo do esperado pelo manual da linhagem, no entanto, os resultados melhores de conversão alimentar foram melhores (HY-LINE, 2011).

Tabela 25 - Valores médios de consumo de ração (CRD, g/ave/dia), produção (PP, %), peso (PO, g), massa (MO, g), conversão alimentar por massa (CMO) e por dúzia de ovos (CDZ, g/dz), peso corporal (PCA, kg), ovos vendáveis (OV%) e viabilidade criatória (VC) de poedeiras comerciais durante o período de 21 a 70 semanas de idade

	Redução de proteína bruta e metionina + cistina			Protease		ANOVA (p-valor)			
	Controle	1x matriz	2x matriz	Sem	Com	RPB	PRO	RPBx PRO	CV ¹ (%)
CRD	89,69	86,69	90,58	90,80	89,18	0,68	0,11	0,56	3,44
PP	88,09	88,33	88,53	88,69	87,95	0,85	0,26	0,63	2,38
PO	60,85	60,51	59,97	60,40	60,48	0,19	0,84	0,10	2,10
MO	53,60	53,44	53,09	53,57	53,19	0,72	0,47	0,17	3,17
CMO	1,70	1,68	1,72	1,71	1,68	0,60	0,25	0,29	4,92
CDZ	1,24a	1,23ab	1,20b	1,23a	1,21b	0,02	0,04	0,67	3,00
PCA	1,58	1,56	1,55	1,58a	1,54b	0,46	0,02	0,06	4,47
OV	92,04	91,78	92,07	91,97	91,94	0,27	0,80	0,56	0,54
VC	98,21	96,43	98,21	95,24b	100,00a	0,76	0,04	0,76	7,57

Médias seguidas de diferentes letras em cada linha para cada fator diferem entre si pelo teste de Tukey ($P<0,05$)

¹CV = Coeficiente de variação

Não houve efeito ($P>0,05$) dos fatores estudados sobre as variáveis de porcentagem de albúmen, de gema, de casca e Índice de gema. A cor da gema mostrou-se significativamente ($P<0,05$) mais intensa em ovos de aves alimentadas com valorização de duas vezes da matriz da enzima protease, o que confere com Leeson e Summers (2005) que demonstraram que a coloração mais intensa das gemas dos ovos está relacionado com o fornecimento de xantofilas consumidos pelas aves nas dietas. Houveram efeitos significativos ($P<0,05$) para protease sobre as características de espessura da casca e densidade aparente de ovos provenientes de poedeiras alimentados com dietas contendo a enzima (Tabela 26).

Houveram interações significativas ($P<0,05$) envolvendo redução de proteína bruta e metionina + cistina e protease para a variável Unidade Haugh. Ovos provenientes de aves alimentadas com dieta controle e inclusão de protease obtiveram melhor média de Unidade Haugh em relação as dietas sem inclusão da enzima, no entanto, dietas com protease não diferiram entre si. Apesar das diferenças apresentadas, todas as médias obtidas encontram-se dentro da classificação AA como tipo excelentes de ovos de acordo com *United States Department Of Agriculture* (USDA, 2000).

Tabela 26 - Valores médios de porcentagem de albúmen (PA, %), porcentagem de gema (PG, %), Unidade Haugh (UH), Índice (IG), cor de gema (CG), porcentagem de casca (PC, %), espessura de casca (EC, mm) e densidade aparente (DA, g/mL) de ovos provenientes de poedeiras comerciais durante o período de 21 a 70 semanas de idade

	Redução de proteína bruta e metionina + cistina			Protease		ANOVA (p-valor)			
	Controle	1x matriz	2x matriz	Sem	Com	RPB	PRO	RPBx PRO	CV ¹ (%)
PA	65,49	65,14	65,05	65,11	65,34	0,30	0,35	0,36	1,17
PG	25,92	26,13	26,20	26,07	26,10	0,47	0,85	0,35	2,36
UH*	101,63	102,01	102,28	101,65	102,39	0,17	0,01	0,01	0,84
IG	0,41	0,40	0,40	0,40	0,40	0,48	0,65	0,32	2,41
CG	6,45b	6,54b	6,72a	6,52	6,61	0,01	0,08	0,87	2,65
PC	8,90	8,85	9,00	8,88	8,95	0,08	0,20	0,39	1,98
EC	0,41	0,40	0,41	0,40b	0,41a	0,06	0,05	0,66	1,67
DA	1,090	1,080	1,085	1,085b	1,090a	0,57	0,04	0,12	0,09

Médias seguidas de diferentes letras em cada linha para cada fator diferem entre si pelo teste de Tukey ($P<0,05$)

¹CV = Coeficiente de variação

*Houveram interações significativas ($P<0,05$) entre os fatores e o desdobramento dos tratamentos encontra-se na Tabela 27

A variável Unidade Haugh apresentou-se excelente durante toda as fases de produção, consequentemente, durante a avaliação do período total de produção, onde as médias alcançadas foram superiores ao confiado pelo manual da linhagem (90,31).

Tabela 27 - Desdobramento da interação de Unidade Haugh provenientes de ovos provenientes de poedeiras comerciais durante o período de 21 a 70 semanas de idade

RPB	PRO	
	Sem	Com
Controle	100,58Bb	102,67A
1x matriz	101,68ba	102,34
2x matriz	102,39a	102,15

Médias seguidas de letras minúsculas (maiúsculas) diferem entre si nas colunas (linhas) para cada característica desdobrada pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade

6.3 Ensaio II – Ensaio de Metabolismo

As médias dos coeficientes de metabolizabilidade aparente da matéria seca, nitrogênio, cálcio e fósforo para cada fase de produção estão apresentados na Tabela 28.

Tabela 28 - Coeficiente de metabolizabilidade aparente da matéria seca (CMAMS), do nitrogênio (CMAN), do cálcio (CMACa) e do fósforo (CMAP) de poedeiras comerciais para cada fase de produção

	RPB			PRO		ANOVA (p-valor)			
	Controle	1x matriz	2x matriz	Sem	Com	RPB	PRO	RPBx PRO	CV ¹ (%)
Fase I (21 a 32 semanas de idade)									
CMAMS	82,22	82,67	80,62	81,52	82,29	0,88	0,74	0,06	2,26
CMAN	63,32	62,82	62,27	62,88	62,70	0,56	0,80	0,06	8,64
CMACa	76,69	72,86	73,02	74,03	76,28	0,47	0,24	0,36	9,00
CMAP	57,13	56,05	56,49	56,41b	56,71a	0,06	0,03	0,34	1,97
Fase II (33 a 44 semanas de idade)									
CMAMS	77,55	77,72	79,05	79,80	76,99	0,70	0,11	0,87	5,15
CMAN	75,69	73,91	73,69	73,97	75,07	0,53	0,42	0,85	8,28
CMACa	61,69	56,28	56,37	61,24	55,12	0,21	0,60	0,52	14,85
CMAP	77,51	79,79	76,78	77,08	78,58	0,63	0,41	0,77	7,09
Fase III (45 a 58 semanas de idade)									
CMAMS	85,88	86,23	86,26	85,93	86,39	0,89	0,62	0,90	2,35
CMAN	68,97	67,64	71,93	68,67	66,67	0,57	0,21	0,47	5,33
CMACa	75,81	74,23	70,64	73,40	73,54	0,43	0,84	0,33	10,86
CMAP	62,43	62,37	65,33	64,34	61,85	0,09	0,11	0,53	6,81
Fase IV (59 a 70 semanas de idade)									
CMAMS	85,49	85,83	83,92	85,26	84,83	0,18	0,61	0,20	2,90
CMAN	68,79	63,02	61,80	66,39	61,94	0,19	0,17	0,28	10,67
CMACa	65,03	65,27	63,75	62,93	67,08	0,84	0,10	0,51	10,89
CMAP	61,70	63,02	57,49	60,22	61,68	0,04	0,49	0,12	8,11

Médias seguidas de diferentes letras em cada linha para cada fator diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05)

¹CV - Coeficiente de variação

Verificou-se efeito significativo (P<0,05) para o coeficiente de metabolizabilidade aparente do fósforo na Fase I de produção ao fornecer dietas contendo protease em comparação as dietas sem a suplementação da enzima. Este efeito da melhora da metabolizabilidade do

fósforo é devido à interação entre as enzimas, pois a protease hidrolisa as proteínas complexadas ao fitato e, assim deixando-o mais disponível para a ação da fitase.

Esse resultado permite a redução da suplementação de fósforo nas dietas, atenuando o impacto ambiental com o melhor aproveitamento desse mineral pelas aves. Além disso, colabora com a redução nos custos das dietas, já que o fósforo representa cerca de 2,5 % do custo total com alimentação (CAPUTI; COSTA e NOGUEIRA, 2011). Para os demais coeficientes analisados não foram apresentadas diferenças ($P>0,05$).

Para as Fases II, III e IV, não foram observados efeitos ($P>0,05$) dos fatores estudados sobre os coeficientes de metabolizabilidade aparente da matéria seca, do nitrogênio, do cálcio e do fósforo.

Algumas pesquisas utilizando complexo enzimático contendo protease demonstraram respostas semelhantes não encontrando diferenças no conteúdo de matéria seca (OBA et al., 2013), assim como proteína bruta, extrato etéreo e fibra bruta (MURAKAMI et al., 2007).

Por outro lado, Meluzzi et al. (2001) observaram que dietas com reduções de proteína bruta (130 e 150 g/kg PB) causaram aumento de 23,5 % na excreção diária de nitrogênio em relação ao tratamento controle (170 g/kg PB). Enquanto, Blair et al. (1999) obtiveram redução de 30-35% na excreção diária de nitrogênio, além da maior retenção de matéria seca conferindo menor produção de resíduos ao fornecerem dietas com redução de proteína bruta para poedeiras e Pavan et al. (2005) mostraram redução de 27% do nitrogênio excretado.

Yadav e Sah (2006) obtiveram uma significativa redução dos coeficientes de digestibilidade de proteína bruta, extrato etéreo, fibra bruta e nitrogênio ao fornecerem dietas com redução de proteína bruta para poedeiras, no entanto ao suplementarem essas dietas com protease foi observada melhora na digestibilidade de proteína bruta e extrato etéreo, demonstrando que o melhor aproveitamento dos nutrientes da dieta, pode ter sido possivelmente, pela atuação da protease exógenas junto as enzimas proteolíticas endógenas.

Em estudo semelhante com frangos de corte, Fru-Nji et al. (2011) observaram que a adição da enzima protease nas dietas teve benefícios significativos para o desempenho dos animais, principalmente com o aumento da digestibilidade de proteína bruta e da energia. Os mesmos autores relataram que o aumento da digestibilidade de gordura registrado foi provavelmente um efeito secundário da degradação de proteína, já que utilizaram lipase pura nas dietas sem atuação de nenhuma lipase. Assim, como a protease degrada grandes moléculas

de proteína num complexo quimo, podendo permitir um melhor acesso à área de superfície total das moléculas lipídicas de formação de micelas.

A valorização de proteína bruta nas dietas combinada a suplementação por aminoácidos sintéticos, além de evitar a queda no consumo de ração e produção de ovos, é uma prática importante para reduzir a excreção de nitrogênio nas excretas (WAIBEL et al., 2000). Caputi, Costa e Nogueira (2011) relataram que a suplementação de aminoácidos em formulações para aves e para suínos pode gerar, em média, diminuição de 8,5 % da excreção de nitrogênio por unidade percentual de proteína bruta reduzida na ração. De tal modo, essas práticas possibilitam a geração de menores quantias de resíduos ao meio ambiente, sem afetar o desempenho zootécnico das aves (PAVAN et al., 2005).

Para as aves cerca de 55% do nitrogênio ingerido é excretado para o ambiente (CAPUTI, COSTA e NOGUEIRA, 2011). O nitrogênio excretado representa os resíduos do metabolismo da proteína no organismo dos animais. Apesar do valor como fertilizante em plantações, há um limite por hectare que pode ser aplicado (PAVAN et al., 2005).

O fósforo presente na forma de fitato em dietas de origem vegetal, não é totalmente aproveitado pelas aves devido à ausência de enzima fitase no trato digestório, além disso, o fósforo fitico complexa-se com outros nutrientes da dieta, atuando como fator antinutricional, reduzindo a biodisponibilidade de nutrientes (SANTOS et al., 2011). Nesse estudo, não foram encontradas diferenças nos coeficientes de metabolizabilidade de fósforo e, consequentemente de cálcio, provavelmente, devido a suplementação de fitase e a revisão dos níveis de fósforo e cálcio em todas as dietas fornecidas, o que garantiu o melhor aproveitamento desses nutrientes durante as fases de produção.

6.4 Análise Econômica

A principal razão para o uso de enzimas exógenas em rações para aves é o seu potencial de rendimento econômico.

O farelo de soja é um dos principais ingredientes utilizados nas dietas de poedeiras como fonte de proteína, porém, nos últimos anos ocorreram diversas variações de preço ocasionadas por fatores como a demanda maior que a oferta e a limitação na produção dos grãos em locais com escassez de chuva. Assim, ao analisar a série de 10 anos de preços históricos obtidos pelo IEA e corrigidos pelo INPC (março/2015) foram encontrados valores máximo de R\$1,76/kg e mínimo de R\$0,68/kg, evidenciando essa variação. Da mesma forma, o preço da dúzia de ovos sofre com as oscilações que interferem diretamente na demanda, logo, ao observar os valores obtidos em série histórica foram encontradas variações com preços máximo de R\$3,04/kg e mínimo R\$1,56/kg.

No presente estudo foi utilizada a enzima protease. Apesar das vantagens atribuídas a suplementação de enzimas nas dietas para poedeiras, esses aditivos ainda possuem elevado custo de aquisição, podendo restringir sua utilização em determinados cenários de mercado. Os resultados de custo da dieta (R\$/kg), receita bruta total (R\$), custo total de alimentação (R\$) e margem bruta (R\$) para as Fases I, II, III e IV de postura encontram-se na Tabela 29.

Os resultados obtidos foram comparados numericamente. Em todas as fases, os custos por quilograma de ração CP + protease foram maiores em comparação aos demais tratamentos. Isso se deve ao fato dessa dieta ser formulada atendendo os níveis de exigências das poedeiras com inclusão “*on top*” da enzima protease.

Nas Fases I e II, o tratamento CN2 obteve menor custo da dieta, em consequência da redução de proteína bruta e metionina + cistina e a isenção de protease, ingredientes onerosos, nas rações. Com isso, foi proporcionada melhor MB, uma vez que as reduções desses níveis nas dietas não tiveram efeito negativo na produção de ovos, a qual não obteve diferença ($P < 0,05$) entre os tratamentos.

Na Fase III, o tratamento CN1 apresentou maior MB, no entanto, não foi obtido menor custo da dieta, sendo esse índice resultante da diminuição do consumo de ração total pelas poedeiras, conferindo na redução do custo total de alimentação.

Tabela 29 - Análise econômica da produção de ovos de poedeiras comerciais alimentadas com dietas com redução de proteína e metionina + cistina e suplementadas com protease para cada fase de produção

Indicadores	Tratamentos					
	CP	CN1	CN2	CP + protease	CN1 + protease	CN2 + protease
Fase I (21 a 32 semanas de idade)						
CTd (R\$/kg)¹	0,92	0,89	0,87	0,93	0,90	0,88
RB (R\$)¹	390,92	398,40	400,41	386,54	390,00	392,01
CTa (R\$)¹	208,59	199,99	200,45	202,80	198,36	195,33
MB (R\$)¹	182,32	198,40	199,96	183,73	191,64	196,68
Fase II (33 a 44 semanas de idade)						
CTd (R\$/kg)¹	0,79	0,77	0,76	0,80	0,78	0,77
RB (R\$)¹	337,26	335,07	339,45	335,07	337,26	332,88
CTa (R\$)¹	162,21	149,02	135,87	157,22	156,90	134,58
MB (R\$)¹	175,05	186,05	203,58	177,85	180,36	198,30
Fase III (45 a 58 semanas de idade)						
CTd (R\$/kg)¹	0,78	0,77	0,76	0,79	0,77	0,77
RB (R\$)¹	402,96	400,77	402,96	402,96	400,77	405,15
CTa (R\$)¹	165,17	148,79	156,67	165,31	158,96	160,32
MB (R\$)¹	237,79	251,98	246,29	237,65	241,81	244,83
Fase IV (59 a 70 semanas de idade)						
CTd (R\$/kg)¹	0,78	0,76	0,75	0,79	0,77	0,76
RB (R\$)¹	317,55	310,98	321,93	335,07	337,26	328,50
CTa (R\$)¹	147,59	138,92	144,70	151,62	148,34	142,61
MB (R\$)¹	169,96	172,06	177,23	183,45	188,92	185,89

CP – Controle positivo (T1); CN1 - Controle negativo com menos uma vez a valorização da enzima protease (T4); CN2 – Controle negativo com menos duas vezes a valorização da enzima protease (T3); CP + protease – CP com 120 ppm de protease (T4); CN1 + protease – CN1 com 120 ppm de protease (T5); CN2 + protease – CN2 com 120 ppm de protease (T6).

¹CTd – Custo total da dieta; RB - Receita bruta; CTa - Custo total de alimentação; MB – Margem Bruta

Resultados semelhantes foram encontrados por Burley, Patterson e Elliot (2013) ao avaliarem economicamente dietas com taxas baixa, intermediária e alta de proteína bruta para poedeiras de 18 a 51 semanas de idade e obtiveram dietas mais econômicas ao reduzirem o nível de proteína bruta, sem influenciarem no peso corporal e nas características de qualidade dos ovos em relação aos demais tratamentos.

Na Fase IV, o tratamento CN2 apresentou menor custo da dieta, no entanto, mesmo não sendo observadas diferenças significativas ($P < 0,05$) para produção de ovos entre os tratamentos, as maiores MB foram verificadas para os tratamentos CN1 + protease e CN2 +

protease resultantes da redução no consumo de ração. Resultado semelhante foi obtido por Yadav e Sah (2006) ao avaliarem a renda do custo alimentar das dietas com redução de proteína bruta e suplementação ou não por níveis de protease para poedeiras comerciais de 24 a 44 semanas de idade, encontraram maior renda ao utilizarem protease nas dietas, devido ao menor consumo das aves, sem prejuízos na produção, quando comparadas as dietas com o nível de proteína bruta reduzido.

7 CONCLUSÕES

Nas condições em que o presente estudo foi conduzido a redução dos níveis de proteína bruta e metionina + cistina, mesmo sem a inclusão de protease, não afeta diretamente nas características de desempenho e qualidade interna dos ovos. Além disso, a redução dos níveis das dietas nas Fases I, II e III é economicamente viável.

Considerando a Fase IV de produção, a redução de proteína bruta e metionina + cistina combinada a inclusão de protease é viável de forma produtiva e econômica.

O uso de protease nas dietas de poedeiras proporciona melhora nas características de qualidade externa dos ovos.

A redução de proteína bruta e metionina + cistina com suplementação de protease não interfere nos coeficientes de metabolizabilidade da matéria seca, cálcio, fósforo e nitrogênio.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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, p. 3189-3218, 2011.

ALMEIDA, V. R.; DIAS, A. N.; BUENO, C. F. D.; RODRIGUES, P. A.; NOGUEIRA, W. C. L.; FARIA FILHO, D. E. Crude protein and metabolizable energy levels for layers reared in hot climates. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 14, n. 3, p. 159-232, 2012.

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.

ANTAR, R. S.; HARMS, R. H.; SHIVAZAD, M.; FARIA, D. E., RUSSELL, G. B. Performance of Commercial Laying Hens when Six Percent Corn Oil Is Added to the Diet at Various Ages and with Different Levels of Tryptophan and Protein. **Poultry Science**, v. 83, p. 447-455, 2004.

ARAÚJO, J. A.; SILVA, J. H. V.; AMÂNCIO, A. L. L.; LIMA, M. R.; LIMA, C. B. Uso de aditivos na alimentação de aves. **Acta Veterinária Brasília**, v. 1, n. 3, p. 69-77, 2007.

ARTONI, S. M. B.; NAKAGHI, L. S.; BORGES, L. L.; MACARI, M. Sistema Digestório das Aves. In: SAKOMURA, N. K.; SILVA, J. H. V.; COSTA, F. G. P.; FERNANDES, J. B. K.; HAUSCHILD, L. **Nutrição de Não Ruminantes**. Jaboticabal: Funep, 2014. cap. 1, p. 01-17.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 16 ed. Arlington. 1996. 1298p.

BARBOSA, N. A. A.; SAKOMURA, N. K.; FERNANDES, J. B. K.; DOURADO, L. R. B. Enzimas exógenas no desempenho e na digestibilidade ileal de nutrientes em frangos de corte. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 6, p. 755-762, jun. 2008.

BAO, Y. M.; ROMERO, L. F.; COWIESON, A. J. Functional patterns of exogenous enzymes in diferente feed ingredients. **World's Poultry Science Journal**, v. 69, p. 759-774, 2013.

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

BLAIR, R.; JACOB, J. P.; IBRAHIM, S.; WANG, P. A quantitative assessment of reduced protein diets and supplements to improve nitrogen utilization. **Journal Applied Poultry Research**, v. 8, p. 25-47, 1999.

BRITO, J. M. F.; MELO, T. S.; VIEIRA, D. V. G.; SILVA, J. H. V.; SILVA, A. N.; CRUZ, E. Y. G. S.; RIBEIRO, M. L. G.; LOPES, G. M. D. Determinação da ordem de aminoácidos limitantes em dietas de baixa proteína sobre o desempenho de poedeiras leves de 43 a 54 semanas de idade. **Revista Científica de Produção Animal**, v. 12, n. 2, p. 169-172, 2010.

BURLEY, H. K.; PATTERSON, P. H.; ELLIOT, M. A. Effect of a reduced crude protein, amino acid-balanced diet on hen performance, production costs, and ammonia emissions in a commercial laying hen flock. **Journal Applied Poultry Research**, v. 22, p. 217-228, 2013.

CAPUTI, B; COSTA, A. C.; NOGUEIRA, E. T.; Nutrição responsável: contribuindo com o meio ambiente – estratégias para reduzir a excreção e perda de nutrientes em aves e suínos. Toledo: GFM Gráfica & Editora, 2011. 112 p. Disponível em: < http://sindiracoes.org.br/wp-content/uploads/2012/06/livro_nutricao_responsavel_sindiracoes2012.pdf >. Acesso em: 31 de maio de 2015.

CASTRO, S. F. **Digestibilidade ileal e total de nutrientes utilizando correções nutricionais e uma protease para aves**. 2011. 79 f. Dissertação (Mestrado em Produção e Nutrição de Monogástricos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011. Disponível em: <[http://repositorio.ufla.br/bitstream/1/3732/1/DISSERTA%C3%87%C3%83O_Digestibilidade e%20ileal%20e%20total%20de%20nutrientes%20utilizando%20corre%C3%A7%C3%B5es %20nutricionais%20e%20uma%20protease%20para%20aves.pdf](http://repositorio.ufla.br/bitstream/1/3732/1/DISSERTA%C3%87%C3%83O_Digestibilidade%20ileal%20e%20total%20de%20nutrientes%20utilizando%20corre%C3%A7%C3%B5es%20nutricionais%20e%20uma%20protease%20para%20aves.pdf)>. Acesso em: 31 de maio de 2015.

COSTA, F. G. P.; SILVA, J. H. V.; GOULART, C. C.; NOGUEIRA, E. T.; SÁ, L. M. Exigências de Aminoácidos para Aves. In: SAKOMURA, N. K.; SILVA, J. H. V.; COSTA, F. G. P.; FERNANDES, J. B. K.; HAUSCHILD, L. **Nutrição de Não Ruminantes**. Jaboticabal: Funep, 2014. cap. 3, p. 240-261.

DESSIMONI, G. V. **Planos nutricionais com suplementação de protease em dietas de frangos de corte**. 2011. 48 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2011. Disponível em: <http://ufvjm.edu.br/zootecnia/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=42&Itemid=>>. Acesso em: 31 de maio de 2015.

DOSKOVIĆ, V.; BOGOSAVLJEVIĆ-BOSKOVIĆ, S.; PAVLOVSKI, Z.; MILOŠEVIĆ, B.; ŠKRBIĆ, Z.; RAKONJAC, S.; PETRIČEVIĆ, V. Enzymes in broiler diets with special reference to protease. **World's Poultry Science Journal**, v. 69, p. 343-359, 2013.

FARIA, D. E.; JUNQUEIRA, O. M.; SAKOMURA, N. K.; SANTANA, A. E. Sistemas de Alimentação e Suplementação de Farinha de Casca de Ostras Sobre o Desempenho e a Qualidade da Casca dos Ovos de Poedeiras Comerciais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 5, p. 1394-1401, 2000.

FREITAS, D. M.; VIEIRA, S. L.; ANGEL, C. R.; FAVERO, A.; MAIORKA, A. Performance and nutriente utilization of broilers fed diets supplemented with a novel mono-component protease. **Journal Applied Poultry Research**, v. 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. **Japan Poultry Science**, v. 48, p. 239-246, 2011.

GAMEIRO, A. H. Avaliação econômica aplicada à zootecnia: avanços e desafios. In: SANTOS, M. V.; PRADA E SILVA, L. F.; RENNÓ, F. P.; ALBUQUERQUE, R. (Ed.). **Novos desafios da pesquisa em nutrição e produção animal**. Pirassununga: Editora 5D, 2009. 215 p.

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

HARMS, R. H.; RUSSEL, G. B. The influence of methionine of comercial laying hens. **Journal Applied Poultry Research**, v. 7, p. 45-52, 1998.

HAUGH, R.R. The Haugh unit for measuring egg quality. **United States Egg Poultry Magazine**, v. 43, p. 552-555, 1937.

HOFFMANN, R. **Estatística para economistas**. 4ed. rev. e ampl. São Paulo: Pioneira Thomson Learning, 2006.

HY-LINE. Hy-Line W-36 – Manual de Padrões de Desempenho. Nova Granada, SP: Hy-Line Brasil, 2011.

JACOB, J. P.; IBRAHIM, S.; BLAIR, R.; NAMKUNG, H.; PAIK, I. K. Use enzyme supplemented, reduced protein diets to decrease nitrogen and phosphorus excretion of White

leghorn hens. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 13, n. 12, p. 1743-1749, 2000.

KESHAVARZ, K.; AUSTIC, R. E. The Use of Low-Protein, Low-Phosphorus, Amino Acid- and Phytase-Supplemented Diets on Laying Hen Performance and Nitrogen and Phosphorus Excretion. **Poultry Science**, v.83, n. 1, p. 75-83, Jan. 2004.

LEESON, S.; SUMMERS, J. D. **Commercial Poultry Nutrition**. Guelph: University Brooks, 2005.

LIMA, M. R.; SILVA, J. H. V.; ARAUJO, J. A.; LIMA, C. B.; OLIVEIRA, E. R. A. Enzimas exógenas na alimentação de aves. **Acta Veterinária Brasileira**, v. 1, n. 4, p. 99-110, 2007.

MACARI, M, FURLAN, R. L.; GONZALES, E. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 1994.

MARSMANN, G. J. P.; GRUPPEN, A. F. B.; POEL, V. D.; KWAKKEL, R. P.; VERSTEGEN, M. W. A.; VORAGEN, A. G. J. The Effect of Thermal Processing and Enzyme Treatments of Soybean Meal on Growth Performance, Ileal Nutrient Digestibilities, and Chyme Characteristics in Broiler Chicks. **Poultry Science**, v. 76, p. 864-872, 1997.

MELUZZI, A.; SIRRI, F.; TALLARICO, N.; FRANCHINI, A. Nitrogen retention and performance of brown laying hens on diets with diferente protein contente and constant concentration of amino acids and energy. **British Poultry Science**, v. 42, p. 213-217, 2001.

MOGHADDAM, H. N.; FARD, M. K.; AGAH, M. J.; HOSSEINI, S. J.; MIRAKZEHI, M. T. Effect of Different Levels of Methionine, Protein and Tallow on the Productive Performance and Egg Quality of Laying Hens in the Late-phase Production. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 14, n. 2, p. 149-158, 2012.

MOREIRA, I.; POZZA, P. C. Metabolismo Proteico. In: SAKOMURA, N. K.; SILVA, J. H. V.; COSTA, F. G. P.; FERNANDES, J. B. K.; HAUSCHILD, L. **Nutrição de Não Ruminantes**. Jaboticabal: Funep, 2014. cap. 2, p. 110-126.

MORENG, R.E.; AVENS, J.S. **Ciência e produção de aves**. 1. ed. São Paulo: Rocca, 1990.

MUNIR, K.; MAQSOOD, S. A review on role of exogenous enzyme supplementation in poultry production. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 25, n. 1, p. 66-80, 2013.

MURAKAMI, A. E.; FERNANDES, J. I. M.; SAKAMOTO, M. I.; SOUZA, L. M. G.; FURLAN, A. C. Efeito da suplementação enzimática no desempenho e qualidade dos ovos de poedeiras comerciais. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 29, n. 2, p. 165-172, 2007.

OBA, A.; PINHEIRO, J. W.; SILVA, C. A.; CASTRO-GOMEZ, R. J. H.; BENITEZ, C. R.; UENO, F. Y.; BORGES, C. A.; ALMEIDA, M. Características produtivas, qualitativas e microbiológicas de galinhas poedeiras alimentadas com diferentes níveis de complexo enzimático. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 6, suplemento 2, p. 4179-4186, 2013.

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

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

PAVAN, A. C.; MÓRI, C.; GARCIA, E. A.; SCHERER, M. R.; PIZZOLANTE, C. C. Níveis de proteína bruta e de aminoácidos sulfurados totais sobre o desempenho, a qualidade dos ovos e a excreção de nitrogênio de poedeiras de ovos marrons. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 2, p. 568-574, 2005.

PEGANOVA, S.; EDER, K. Interactions of various supplies of isoleucine, valine, leucine and tryptophan on the performance of laying hens. **Poultry Science**, v. 82, p. 100-105, 2003.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.

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. **Tabelas Brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. 3 ed. – Viçosa: UFV, Departamento de Zootecnia, 252 p., 2011.

SANTOS, L. M.; RODRIGUES, P. B.; FREITAS, R. T. F.; BETERCHINI, A. G.; FIALHO, E. T.; GOMIDE, E. M.; NAVES, L. P. Níveis de cálcio e fósforo disponível em rações com fitase para frangos de corte nas fases pré-inicial e inicial. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 11, p. 2476-2485, 2011.

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

SAS. 2002. 'SAS user's guide: statistics.' (SAS Institute Inc.: Cary, NC).

SCHMIDT, M.; GOMES, P. C.; ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; NUNES, R. V.; CALDERANO, A. A. Exigência nutricional de lisina digestível para poedeiras leves no segundo ciclo de produção. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 6, p. 1029-1035, 2008.

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. de. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3.ed. Viçosa: UFV, 2006.

SILVA, E. L.; SILVA, J. H. V.; JORDÃO FILHO, J.; RIBEIRO, M. L. G.; MARTINS, T. D. D.; COSTA, F. G. P. Redução dos níveis proteicos e suplementação de metionina e lisina em rações para poedeiras leves. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 2, p. 491-496, 2006.

SMITH, A. Proteases in broiler diets require careful selection. **All About Feed**, Doetinchem, 25 de nov de 2011. Disponível em: <<http://www.allaboutfeed.net/Nutrition/Feed-Additives/2011/11/Proteases-in-broiler-diets-require-careful-selection-AAF012699W/>>. Acesso em: 31 de maio de 2015.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Egg-Grading Manual**. Washington: USDA, 2000.

VIANA, G. S.; GOMES, P. C.; BARRETO, S. L. T.; HANNAS, M. I.; ALMEIRA, R. L.; PASTORE, S. M.; SILVA, E. A.; BARBOSA, L. V. S. Redução da proteína bruta em rações formuladas com conceito de proteína ideal para poedeiras leves de 24 a 40 semanas de idade. In: XII Congresso APA – Produção e Comercialização de Ovos, 12., 2014, Ribeirão Preto. Anais... Ribeirão Preto: XII Congresso APA, 1CDROM.

VIEIRA FILHO, J. A.; GERALDO, A.; MACHADO, L. C.; BRITO, J. A.; BERTECHINI, A. G.; MURAKAMI, E. S. F. Effect of protease supplementation on production performance of laying hens. **Acta Scientiarum**, v. 37, n. 1, p. 29-33, 2015.

WAIBEL, P.E.; CARLSON, C.W.; BRANNON, J.A. NOLL, S. L. Limiting amino acids after methionine and lysine with growing turkeys fed low-protein diets. **Poultry Science**, v. 79, p. 1290-1298, 2000.

YADAV, J. L.; SAH, R. A. Supplementation of corn-soybean based layers diets with diferente levels of acid protease. **Journal of the Institute of Agriculture and Animal Science**, v. 27, p. 93-102, 2006.

YU, B.; LEE, T. T.; CHIOU, P. W. Effects of sources of protein and enzyme supplementation on protein digestibility and chyme characteristics in broilers. **British Poultry Science**, v. 43, n. 3, p. 424-431, 2002.

YU, B.; WU, S. T.; LIU, C. C.; GAUTHIER, R.; CHIOU, P. W. S. Effects of enzyme inclusion in a maize-soybean diet on broiler performance. **Animal Feed Science and Technology**, v. 134, p. 283-294, 2007.