

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

BÁRBARA COLCETTA

**ASSOCIAÇÃO DE ENZIMAS AMILASE E XILANASE SOBRE O DESEMPENHO E
SAÚDE INTESTINAL DE FRANGOS DE CORTE**

MARECHAL CÂNDIDO RONDON

2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

BÁRBARA COLCETTA

**ASSOCIAÇÃO DE ENZIMAS AMILASE E XILANASE SOBRE O DESEMPENHO E
SAÚDE INTESTINAL DE FRANGOS DE CORTE**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná como requisito parcial do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição Animal, para obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Cinthia Eyng

MARECHAL CÂNDIDO RONDON

2023

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Colcetta, Bárbara

Associação de enzimas amilase e xilanase sobre o desempenho e saúde intestinal de frangos de corte / Bárbara Colcetta; orientadora Cinthia Eyng. -- Marechal Cândido Rondon, 2021.

67 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico Campus de Marechal Cândido Rondon) -- Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, 2021.

1. Zootecnia. 2. Nutrição animal. 3. Avicultura. 4. Enzimas. I. Eyng, Cinthia, orient. II. Título.

BÁRBARA COLCETTA

Associação de enzimas amilase e xilanase sobre o desempenho e saúde intestinal de frangos de corte

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de “Mestra em Zootecnia”, Área de Concentração “Produção e Nutrição Animal”, Linha de Pesquisa “Produção e Nutrição de Não-Ruminantes / Aquicultura, APROVADA pela seguinte Banca Examinadora:

Orientadora / Presidente – Prof.^a Dr.^a Cinthia Eyng
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste) - *Campus* de Mal. Cândido Rondon

Membro – Prof. Dr. Paulo Levi de Oliveira Carvalho
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste) - *Campus* de Mal. Cândido Rondon

Membro – Dr.^a Andreia Massuquetto
Gerente Técnica de Avicultura - Tectron

Marechal Cândido Rondon, 05 de setembro de 2023.



unioeste

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Campus de Marechal Cândido Rondon - CNPJ 78680337/0003-46

Rua Pernambuco, 1777 - Centro - Cx. P. 91 - <http://www.unioeste.br>

Fone: (45) 3284-7878 - Fax: (45) 3284-7879 - CEP 85960-000

Marechal Cândido Rondon - PR.



PARANÁ

GOVERNO DO ESTADO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

DECLARAÇÃO E PARECER DE PARTICIPAÇÃO EM BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO REALIZADA À DISTÂNCIA, DE FORMA SÍNCRONA, POR VIDEOCONFERÊNCIA

Eu, **Prof.^a Dr.^a Cinthia Eyng**, declaro como **ORIENTADORA** que presidi os trabalhos de defesa à **distância, de forma síncrona e por videoconferência**, da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação da candidata **Bárbara Colcetta**, aluna de Mestrado deste Programa de Pós-Graduação.

Considerando o trabalho entregue, a apresentação e a arguição dos membros da Banca Examinadora, **formalizo como Orientadora**, para fins de registro, por meio desta declaração, a decisão da Banca Examinadora de que a candidata foi considerada **APROVADA** na banca realizada em 05/09/2023, com o trabalho intitulado **“Associação de enzimas amilase e xilanase sobre o desempenho e saúde intestinal de frangos de corte na fase de crescimento”**.

Descreva abaixo observações e/ou restrições (se julgar necessárias):

O título da dissertação foi modificado para: “Associação de enzimas amilase e xilanase sobre o desempenho e saúde intestinal de frangos de corte”.

Cinthia Eyng

Prof.^a Dr.^a Cinthia Eyng – ORIENTADORA/PRESIDENTE

Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste) / *Campus* de Mal. Cândido Rondon

Programa de Pós-Graduação em Zootecnia

Modelo 2 – Para orientador(a) da Banca Examinadora de Programa de Pós-graduação da UNIOESTE



unioeste

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Campus de Marechal Cândido Rondon - CNPJ 78680337/0003-46
Rua Pernambuco, 1777 - Centro - Cx. P. 91 - <http://www.unioeste.br>
Fone: (45) 3284-7878 - Fax: (45) 3284-7879 - CEP 85960-000
Marechal Cândido Rondon - PR.



PARANÁ
GOVERNO DO ESTADO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

DECLARAÇÃO E PARECER DE PARTICIPAÇÃO EM BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE MESTRADO REALIZADA À DISTÂNCIA, DE FORMA SÍNCRONA, POR VIDEOCONFERÊNCIA

Eu, **Prof. Dr. Paulo Levi de Oliveira Carvalho**, declaro que **participei à distância, de forma síncrona e por videoconferência**, da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação da candidata **Bárbara Colcetta**, aluna de Mestrado deste Programa de Pós-Graduação.

Considerando o trabalho entregue, apresentado e a arguição realizada, **formalizo como Membro Interno**, para fins de registro, por meio desta declaração, minha decisão de que a candidata pode ser considerada APROVADA na banca realizada em 05/09/2023, com o trabalho intitulado "**Associação de enzimas amilase e xilanase sobre o desempenho e saúde intestinal de frangos de corte na fase de crescimento**".

Descreva abaixo observações e/ou restrições (se julgar necessárias):

Discente aprovada. Apenas com sugestão de Título alterado: **Associação de enzimas amilase e xilanase sobre o desempenho e saúde intestinal de frangos de corte**

Prof. Dr. Paulo Levi de Oliveira Carvalho
Unioeste / Campus de Mal. Cândido Rondon
Centro de Ciências Agrárias



unioeste

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Campus de Marechal Cândido Rondon - CNPJ 78680337/0003-46
Rua Pernambuco, 1777 - Centro - Cx. P. 91 - <http://www.unioeste.br>
Fone: (45) 3284-7878 - Fax: (45) 3284-7879 - CEP 85960-000
Marechal Cândido Rondon - PR.



PARANÁ
GOVERNO DO ESTADO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

DECLARAÇÃO E PARECER DE PARTICIPAÇÃO EM BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE MESTRADO REALIZADA À DISTÂNCIA, DE FORMA SÍNCRONA, POR VIDEOCONFERÊNCIA

Eu, **Dr.^a Andreia Massuquetto**, declaro que **participei à distância, de forma síncrona e por videoconferência**, da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação da candidata **Bárbara Colcetta**, aluna de Mestrado deste Programa de Pós-Graduação.

Considerando o trabalho entregue, apresentado e a arguição realizada, **formalizo como Membro Externo**, para fins de registro, por meio desta declaração, minha decisão de que a candidata pode ser considerada APROVADA na banca realizada em 05/09/2023, com o trabalho intitulado "**Associação de enzimas amilase e xilanase sobre o desempenho e saúde intestinal de frangos de corte na fase de crescimento**".

Descreva abaixo observações e/ou restrições (se julgar necessárias):

Alteração de título para:

"Associação de enzimas amilase e xilanase sobre o desempenho e saúde intestinal de frangos de corte"

Dr.^a Andreia Massuquetto
Gerente Técnica de Avicultura - Tectron

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, que sempre estiveram dispostos a me ajudar e apoiar minhas decisões, e que tornaram possível os meus sonhos.

Ao meu marido Bruno Gregório, meu companheiro de vida, por estar sempre ao meu lado dando suporte e incentivo, principalmente nos momentos difíceis de nossas vidas, e que nunca me deixou desistir.

A professora Cinthia Eyng, pela orientação, ensinamentos e oportunidade para a realização do estudo.

A Universidade Estadual do Oeste do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, pela oportunidade.

Ao grupo GEMADA, que possibilitou a realização de todo o estudo, pois sozinhos não somos nada! A todos que participaram e ajudaram de alguma forma, muito obrigada!

Aos meus amigos, que mesmo distantes, sempre me dão apoio e me incentivam a crescer.

Aos colegas de trabalho, pela motivação, risadas e, principalmente, compreensão por todo o período em que estive ausente. Muito obrigada!

A empresa Tectron, pelo financiamento da pesquisa.

Por fim, a todos que de alguma forma contribuíram e me fizeram evoluir nessa etapa da minha vida.

RESUMO

Este trabalho teve por objetivo avaliar a associação das enzimas amilase e xilanase em dietas de frangos de corte na fase de crescimento sobre o desempenho, morfometria e histopatologia intestinal, perfil de ácidos graxos de cadeia curta do conteúdo cecal, concentração de citocinas séricas e análise econômica de produção. Ao todo, foram utilizados 980 pintos de corte Cobb 500[®], machos, de um dia de idade, distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 3 + 1, sendo dois níveis de amilase (100 e 200 U kg⁻¹) x três níveis de xilanase (0, 1000 e 2000 U kg⁻¹) + um controle positivo (CP), totalizando sete tratamentos, com sete repetições e 20 aves por unidade experimental. O CP foi formulado conforme a recomendação das necessidades nutricionais da linhagem. Os tratamentos contendo amilase e xilanase tiveram a matriz nutricional valorizada em 100 kcal de EM e 6% de proteína bruta e aminoácidos digestíveis (lisina, metionina, metionina + cistina, treonina e triptofano). Aos 14 dias, as aves que receberam dieta com 1000 U kg⁻¹ de xilanase apresentaram melhor CA em relação às aves que não receberam dietas contendo enzimas, enquanto com a suplementação enzimática o CR e GP foi semelhante ao CP. As dietas contendo 100 U kg⁻¹ de amilase, sem xilanase, proporcionaram melhores índices de *score I See Inside* (ISI). Não foi encontrado diferença para as variáveis morfométricas, a concentração de ácido acético, butírico e isovalérico e para a concentração de interleucinas 6, 10 e 16 dos frangos aos 28 dias de idade. A análise do custo alimentar mostrou que a suplementação enzimática, tanto de amilase quanto de xilanase, é economicamente viável, reduzindo em torno de 3,3% do custo de produção em relação ao CP. O desempenho dos frangos de corte que receberam amilase e xilanase com redução de energia e proteína não equipararam ao grupo que receberam dietas sem inclusão de enzimas e níveis nutricionais superiores, não prejudicando a saúde intestinal e os parâmetros imunológicos das aves aos 28 dias de idade. Considerando a análise de viabilidade econômica, a suplementação enzimática proporcionou redução no custo alimentar de produção dos frangos de corte até os 28 dias de idade.

Palavras-chave: *blend* enzimático, citocinas, *I See Inside*, morfometria intestinal.

ABSTRACT

ENZYMES AMYLASE AND XYLANASE ASSOCIATION ON PERFORMANCE AND INTESTINAL HEALTH OF BROILERS

This work aimed to evaluate the association of amylase and xylanase enzymes in broiler chicken diets during the grower phase on performance, intestinal morphometry and histopathology, short-chain fatty acid profile of cecal content, serum cytokine concentration and economic analysis of production. In the experiment, a total of 980 one-day-old male Cobb 500[®] broiler chicks were distributed in a completely randomized design, in a 2 x 3 + 1 factorial scheme, with two levels of amylase (100 and 200 U kg⁻¹) x three levels of xylanase (0, 1000 and 2000 U kg⁻¹) + one positive control (PC), totaling seven treatments, with seven replications of 20 birds per experimental unit. The PC was formulated according to the nutritional requirements of the lineage. The diets containing amylase and xylanase had the nutritional matrix valued at 100 kcal of metabolizable energy and 6% of crude protein and digestible amino acids (lysine, methionine, methionine + cystine, threonine and tryptophan). At 14 days, birds that consumed 1000 U kg⁻¹ of xylanase had better feed conversion compared to birds that did not receive diets containing enzymes, while with enzymatic supplementation feed intake and weight gain was similar to PC. Diets containing 100 U kg⁻¹ of amylase, without xylanase, provided better I See Inside (ISI) score indices. No difference was found for the morphometric parameters, in the concentration of acetic, butyric and isovaleric acids and in the concentration of interleukins 6, 10 and 16 of the chickens at 28 days of age. The analysis of the feed cost showed that enzymatic supplementation, both amylase and xylanase, is economically viable, reducing approximately 3.3% the production cost in relation to PC. The performance of broilers that received amylase and xylanase with reduced energy and protein did not match the group that received diets without inclusion of enzymes and higher nutritional levels and did not affect the intestinal health and immunological parameters of the birds at 28 days of age. Considering the economic viability analysis, the enzyme supplementation provided a reduction in the feed cost of production of broiler chickens up to 28 days of age.

Keywords: Cytokines, enzymatic blend, intestinal morphometry, I See Inside.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição percentual e níveis calculados das dietas experimentais nas fases inicial (1 a 14 dias de idade) e crescimento (15 a 28 dias de idade).	26
Tabela 2: Composição analisada pelo espectrofotômetro NIR das dietas experimentais na fase inicial (1 a 14 dias de idade) e fase de crescimento (15 a 28 dias).....	28
Tabela 3: Atividade declarada e analisada (U kg ⁻¹) de protease e xilanase das dietas experimentais (fase inicial).....	29
Tabela 4: Desempenho de frangos de corte na fase inicial (1 a 14 dias) e de crescimento (15 a 28 dias) alimentados com dietas contendo diferentes doses de amilase e xilanase.....	35
Tabela 5: Morfometria do segmento jejuno de frangos de corte, aos 28 dias de idade, alimentados com dietas contendo diferentes doses de amilase e xilanase.	38
Tabela 6: Avaliações histológicas pelo método I See Inside (ISI®) do segmento jejuno de frangos de corte, aos 28 dias de idade, alimentados com dietas contendo diferentes doses de amilase e xilanase.	42
Tabela 7: Desdobramento da interação entre nível de amilase e de xilanase sobre os scores I See Inside no jejuno de frangos de corte, aos 28 dias de idade, alimentados com dietas contendo diferentes doses de amilase e xilanase.....	43
Tabela 8: Concentração de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) no conteúdo cecal de frangos de corte, aos 28 dias de idade, alimentados com dietas contendo diferentes doses de amilase e xilanase.	46
Tabela 9: Concentração de interleucinas de frangos de corte, aos 28 dias de idade, alimentados com dietas contendo diferentes doses de amilase e xilanase.	48
Tabela 10: Custo alimentar por tonelada de frangos produzidos alimentados com dietas contendo diferentes doses de amilase e xilanase aos 28 dias de idade.....	50

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	REVISÃO	10
	2.1 Enzimas na nutrição de frangos de corte	10
	2.2 Utilização de amido pelos frangos de corte e a ação da enzima amilase	11
	2.3 Polissacarídeos não-amiláceos e a ação da enzima xilanase	14
	2.4 Saúde intestinal de frangos de corte	16
	2.5 Efeito das enzimas sobre a saúde intestinal	18
3	MATERIAL E MÉTODOS	23
	3.1 Comitê de ética	23
	3.2 Local de execução	23
	3.3 Instalações, animais e delineamento experimental	23
	3.4 Dietas experimentais	24
	3.5 Coleta de amostras e análises realizadas	29
	3.6 Desempenho zootécnico	29
	3.7 Morfometria intestinal	30
	3.8 <i>Score I See Inside</i> ®	30
	3.9 Ácidos graxos de cadeia curta	31
	3.10 Concentrações séricas de citocinas	32
	3.11 Análise econômica	32
	3.12 Análises estatísticas	33
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
	4.1 Desempenho zootécnico	34
	4.2 Morfometria intestinal	37
	4.3 Avaliação <i>I See Inside</i> - ISI®	40
	4.4 Ácidos graxos de cadeia curta	45
	4.5 Concentração de citocinas	47
	4.6 Análise econômica	49
5	CONCLUSÕES	52
6	REFERÊNCIAS	53

1 INTRODUÇÃO

O setor avícola busca constantemente inovações nas práticas de manejo, sanidade, genética e nutrição para enfrentar barreiras que dificultam as aves de atingir máxima eficiência produtiva. Considerando a área da nutrição, atualmente os ingredientes que compõem as rações são, principalmente: o milho e a soja, bem como outros cereais alternativos, como o trigo, a cevada, a aveia, o centeio e o triticale.

Apesar destes ingredientes apresentarem excelente qualidade nutricional, contêm polissacarídeos não-amiláceos (PNAs), também chamados de fibra dietética. Estes componentes são considerados fatores antinutricionais indigestíveis pelos animais não ruminantes, devido à ausência de atividade enzimática específica (FILHO et al., 2018).

Os PNAs são classificados quanto à solubilidade de seus componentes, podendo ser classificados como solúveis ou insolúveis (KIM et al., 2022a). Os PNAs solúveis são compostos por pentosanas, beta-glucanas, mananas, xiloglucanas, dentre outras substâncias que possuem a característica de se ligarem à grande quantidade de água durante a passagem no trato gastrointestinal (TGI). Esta característica resulta em aumento da viscosidade da digesta, formando uma barreira física que impede as enzimas digestivas de atuarem sobre o alimento (MENDIS; LECLERC; SIMSEK, 2016). Em decorrência disto, os nutrientes não digeridos ficam disponíveis para a fermentação microbiana, que pode afetar negativamente a saúde intestinal das aves (WANG et al., 2021a) o que acarreta baixo desempenho zootécnico (JÓZEFIAK et al., 2007). Em contrapartida, os PNAs insolúveis são formados por celulose, lignina e algumas frações de hemicelulose, componentes que aprisionam outros nutrientes, como amido e proteína, na matriz celular vegetal, e este efeito diminui o valor nutricional dos alimentos (MACAMBIRA et al., 2015).

Como forma de contornar os efeitos fisiológicos provocados por estes componentes e no intuito de otimizar a utilização dos nutrientes das dietas como um todo, a indústria tem utilizado enzimas exógenas na alimentação de frangos de corte. As enzimas possuem ação sobre um substrato específico, por exemplo, as fitases, xilanases, beta-glucanases e amilases, atuam, respectivamente, sobre os fitatos, xilanos, beta-glucanos e amido, e podem ser adicionadas de forma isolada ou em associações. Acredita-se que as associações proporcionam melhores resultados sobre a saúde intestinal e no desempenho de frangos de corte por agirem de forma sinérgica (BEDFORD, 2018).

As enzimas exógenas complementam a ação das enzimas endógenas do TGI e/ou suprem a falta destas. A ação das carboidrases, como xilanase e beta-glucanase, pode expor o conteúdo celular pela hidrólise da parede celular rica em fibras solúveis de alguns cereais, disponibilizando mais energia devido à liberação de nutrientes como amido, lipídios e proteínas para o metabolismo das aves (COWIEON; ADEOLA 2005; KIARIE et al., 2013).

Os beta-glucanos e arabinoxilanos conferem a característica viscosa da parede celular, e a hidrólise desses componentes resulta em unidades menores, como os xilooligossacarídeos (XOs), fazendo com que a capacidade de retenção de água seja reduzida (BEDFORD, 2018). Além disso, os XOs formados são fermentados pelas bactérias gerando ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs), os quais influenciam positivamente os enterócitos, proporcionando melhora na saúde intestinal e reduzindo quadros inflamatórios (BARKER et al., 2021).

Além dessas carboidrases, a inclusão de amilase também beneficia o desempenho de frangos de corte, pois atua sobre o amido não digerido. A digestibilidade desta fração varia de acordo com o tipo do grão e o processamento o qual é submetido. Em adição, a taxa de aproveitamento dos nutrientes é influenciada pelas limitações fisiológicas das aves, como a idade, local de digestão, e o alto consumo de ração dos frangos de corte que ofertam maior quantidade de substrato para a digestão (COWIESON; VIEIRA; STEFANELLO, 2019; STEFANELLO et al., 2019).

Diante do exposto, a hipótese deste trabalho é que a utilização de cereais como o milho, a soja e o trigo, nas rações de frangos de corte, apesar da alta digestibilidade, pode alterar a saúde intestinal desses animais impactando sobre o seu desempenho. Além disso, presume-se que a inclusão dietética de enzimas exógenas (amilase e xilanase) reduz estes efeitos adversos além de beneficiar o organismo de maneira indireta.

Desta maneira, o objetivo deste estudo foi avaliar a inclusão de níveis de amilase e xilanase e suas associações em rações experimentais com redução energética e proteica sobre o desempenho, alterações histológicas e morfometria intestinal, perfil de ácidos graxos de cadeia curta do conteúdo cecal, concentração sérica de interleucinas e análise de viabilidade econômica da ração de frangos de corte.

2 REVISÃO

2.1 Enzimas na nutrição de frangos de corte

As enzimas são constituídas por cadeias de aminoácidos e possuem uma estrutura proteica tridimensional com a finalidade de acelerar processos químicos (ANGEL; SORBARA, 2014). Para que os processos de digestão ocorram as aves produzem enzimas digestivas para realizar a hidrólise dos componentes da dieta.

No entanto, enzimas exógenas podem ser adicionadas na dieta para auxiliar na digestão dos nutrientes. A inclusão dietética de enzimas visa suprir a falta de enzimas endógenas ou de complementar a ação de enzimas específicas, o que pode reduzir efeitos adversos ocasionados por fatores antinutricionais presentes em alguns ingredientes, que tornam os nutrientes indisponíveis à absorção (BARBOSA et al., 2014).

As enzimas exógenas são classificadas como aditivos zotécnicos, utilizadas para melhorar o processo de digestão por meio da hidrólise das ligações, liberando substratos para absorção de nutrientes pela mucosa intestinal (SAKOMURA et al., 2014; WARD, 2021). As enzimas são produzidas usualmente por microrganismos (DELMASCHIO, 2018) e possuem capacidade catalítica de alta especificidade (substrato – dependente). Comumente as amilases são produzidas por *Bacillus* sp., já as espécies de fungos *Trichoderma* ou *Aspergilli* produzem celulases e hemicelulases, como a xilanase (MASEY-O’NEIL; SMITH; BEDFORD, 2014).

As enzimas podem ser incluídas nas dietas de maneira isolada (individualmente) ou na forma de complexos ou *blends* enzimáticos. Os complexos enzimáticos incluem enzimas oriundas da fermentação de um mesmo microrganismo e, portanto, exercem mais de uma atividade específica. Os *blends* enzimáticos, diferentemente dos complexos, são misturas de enzimas que foram obtidas a partir de diferentes meios de cultivo e que possuem a composição e quantidade de cada enzima bem definidas (AMERAH et al., 2017; FILHO et al., 2018).

O uso de associações enzimáticas demonstra resultados positivos, pois proporciona ação sinérgica. Neste contexto, por exemplo, a ruptura da parede celular pela xilanase torna os nutrientes mais acessíveis às enzimas endógenas, e quando há suplementação concomitante de amilase e protease, proporciona maior digestibilidade de amido e proteína, bem como reduz a necessidade energética de produção de enzimas endógenas (AMERAH et al., 2017; DIANA et al., 2020; FERNANDES et al., 2017).

Os benefícios da inclusão de enzimas foram observados por Giacobbo et al. (2021), que avaliaram a inclusão de amilase de maneira isolada ou em associação com a xilanase e protease. De acordo com os autores, a conversão alimentar dos frangos de corte na fase inicial foi melhor utilizando a combinação enzimática, indicando sinergismo entre as enzimas.

Em adição, as enzimas podem ser incluídas nas dietas de maneira *on top*, sem utilizar sua valorização nutricional para a formulação, apenas com o intuito de melhorar o desempenho dos animais ou considerando a matriz nutricional da enzima (valorização enzimática). A estratégia de valorização considera a quantidade de energia e/ou nutrientes que a enzima pode disponibilizar para o animal, visando obter o mesmo desempenho zootécnico de uma dieta com os níveis nutricionais normais, tornando a dieta mais econômica (PASQUALI et al., 2017).

Os benefícios de se utilizar enzimas ocorrem pelos aspectos nutricionais, disponibilizando nutrientes para o metabolismo, e aspectos econômicos, reduzindo a quantidade de ingredientes de alto custo na ração e/ou possibilitando o uso de ingredientes alternativos. Além disso, há que se considerar os benefícios quanto a saúde intestinal e questão ambiental (ALAGAWANY; ELNESR; FARAG, 2018), visto que a ação das enzimas reduz a quantidade de substrato disponível para fermentação por bactérias patogênicas no intestino grosso e a excreção de nutrientes no meio ambiente.

2.2 Utilização de amido pelos frangos de corte e a ação da enzima amilase

As rações de frangos de corte têm como base matérias-primas de origem vegetal, como o milho, que possui a maior parte dos carboidratos na forma de amido, tendo como principal função fornecer energia para o organismo (STEFANELLO et al., 2019).

O amido é formado por dois tipos de polímeros de glicose, sendo aproximadamente 25% de amilose (parte amorfa) e 75% de amilopectina (parte cristalina). A amilose consiste em cadeias longas, não ramificadas, de resíduos de D-glicose conectados por ligações α -1,4. A amilopectina possui cadeia altamente ramificada, apresentando ligações α -1,4 e α -1,6 (NELSON; COX, 2014; SAKOMURA et al., 2014; SVIHUS, 2014).

As ligações glicosídicas, α -1,4 e α -1,6, são facilmente degradadas pelas enzimas digestivas endógenas proporcionando alta digestibilidade do amido (JACOB; PESCATORE, 2012; MACARI; MAIORKA, 2017). A amilase pancreática de animais não-ruminantes tem especificidade pelas ligações α -1,4, no entanto, a velocidade de digestão da amilopectina (α -

1,4 e α -1,6) é maior devido principalmente a conformação da cadeia, com grande número de ramificações, o que possibilita maior ação enzimática no TGI (BERTECHINI, 2012).

Segundo Rostagno (1994), a digestão do amido se inicia no papo das aves pela ação fermentativa de microrganismos. No entanto, a quantidade de energia produzida é pequena, contribuindo apenas com aproximadamente 3% da manutenção do animal. Dessa maneira, a digestão do amido ocorre efetivamente quando a digesta entra em contato com a α -amilase pancreática no duodeno, que hidrolisa a amilose em maltose e maltotriose, e a amilopectina em maltose, maltotriose e dextrinas. Esses oligossacarídeos formados são degradados, glicose pela maltase e sacarase-isomaltase, enzimas sintetizadas pelos enterócitos na superfície das vilosidades, e então absorvidos e aproveitados pelo metabolismo energético (COWIESON; VIEIRA; STEFANELLO, 2019; CÓRDOVA-NOBOA et al., 2020).

Embora o amido seja um polissacarídeo de fácil digestão, nem todo amido presente nos ingredientes é absorvido pelo animal. O estado fisiológico do animal pode interferir, considerando que o sistema digestório de aves jovens é imaturo apresentando uma produção de α -amilase pancreática baixa (JIN; CORLESS; SELL, 1998). Além disso, o valor nutricional do milho depende da variedade, das condições climáticas, do processamento pós-colheita e armazenamento (WILLIAMS et al., 2018). Além do milho, outros ingredientes também influenciam a digestibilidade da ração, como o trigo ou outros alimentos ricos em PNAs, que encapsulam o conteúdo celular, tornando indisponível o amido do alimento (SVIHUS, 2014; DELMASCHIO, 2018).

A adição de amilase na ração visa suplementar a produção de enzima endógena da ave e pode ocorrer em qualquer fase de vida do animal, pois qualquer melhoria na digestibilidade do amido resulta em maior contribuição em energia metabolizável para as aves. Estudos mostram que dentre os principais fatores envolvidos na resposta à amilase exógena a idade das aves é importante apresentando dois momentos de maior sensibilidade à ação da enzima: na fase pré-inicial e na fase final (GRACIA et al., 2003).

Em animais jovens, a suplementação visa suprir a baixa produção da enzima, pois estes apresentam o TGI imaturo e a produção de α -amilase pancreática é insuficiente durante os primeiros dias de vida (LIU et al., 2020). Yuan et al. (2017), ao suplementarem amilase na dieta de pintinhos verificaram melhora no desempenho dos animais e da digestibilidade da dieta. Além disso, segundo Svihus (2014), é possível que, para frangos de corte, em algumas circunstâncias como devido ao consumo excessivo de ração, o tempo de trânsito da digesta seja aumentado reduzindo o tempo disponível para os processos digestivos, e prejudicando a digestibilidade do amido. O aumento de ingestão é influenciado por alguns fatores, dentre eles

a forma física da ração, que pode aumentar quando fornecida na forma peletizada em comparação à forma farelada (MASSUQUETTO et al., 2019). Desse modo, sugere-se que a suplementação de amilase em animais que tenham um alto consumo, principalmente em aves adultas, seja necessária, pois a digestibilidade do amido é limitada pela produção de α -amilase pancreática insuficiente para degradar a alta quantidade de amido ingerida.

A suplementação também pode melhorar o desempenho dos animais considerando a redução na demanda energética e de aminoácidos para a produção da α -amilase pancreática, sendo demandado em torno de 17% de glicina + serina (CROOM et al., 1999). Zhou et al. (2021), verificaram que a atividade da amilase endógena no jejuno de frangos de corte aos 14 dias de idade foi deprimida pelo aumento dos níveis exógenos de α -1,4-amilase. Além disso, a suplementação da enzima sugere efeito sinérgico com a enzima endógena, hidrolisando mais facilmente os grânulos de amido (COWIESON; KLUENTER, 2019).

O baixo aproveitamento do amido, além da influência dos fatores citados, pode ocorrer quando uma porção do amido é resistente à digestão, chamado de amido resistente. Esta resistência pode estar associada às restrições quanto ao acesso físico, a solubilidade, ou quando é submetida a um processamento térmico, que pode ocorrer em casos de secagem da matéria-prima, pela peletização ou extrusão das rações (ABDOLLAHI et al., 2010; 2011). Altas temperaturas e ausência de umidade podem ocasionar modificações irreversíveis na estrutura do amido e causarem o chamado “amido retrogradado”, onde as cadeias de amilose se reorganizam e tornam-se indisponíveis à digestão (MASSUQUETTO et al., 2020). Além dessas definições, o amido resistente também pode ser classificado quanto ao seu tempo de digestão, sendo de rápida ou lenta digestão, dependendo de quanto tempo leva para ocorrer a digestão do amido no intestino delgado (HERWIG et al., 2019).

Dessa maneira, o amido resistente presente na ração dificilmente é degradado apenas com a amilase endógena, podendo exigir a suplementação de amilase na dieta (COWIESON; KLUENTER, 2019). Estudos verificaram que a suplementação de amilase aumentou a digestibilidade do amido resistente em frangos de corte e, por consequência, essa maior taxa de digestão reduziu a disponibilidade do amido para a fermentação pela microbiota no trato intestinal posterior. O amido não digerido é fermentado no intestino grosso, limitando o valor energético disponibilizado à ave, já que a fermentação gera apenas 11% do requerimento de energia metabolizável das aves, sendo, portanto, menos eficiente que o processo de digestão pelo próprio hospedeiro (SCHRAMM et al., 2021).

Da mesma forma, Stefanello et al. (2019), verificaram que a utilização de amilase melhorou algumas variáveis, como a utilização de energia, digestibilidade de nutrientes

(proteína bruta e lipídeos), e matéria seca, bem como melhorou o desempenho dos frangos de corte alimentados com dietas à base de milho e farelo de soja.

A ação da amilase, além de melhorar o desempenho dos animais, influencia positivamente na saúde intestinal das aves. Aderibigbe et al. (2020), verificaram que a suplementação de amilase na dieta à base de milho e farelo de soja de frangos de corte apresentou redução da viscosidade da digesta e aumento da altura das vilosidades do jejuno.

A suplementação de amilase na dieta de frangos de corte, portanto, contribui com a digestibilidade de amido dos ingredientes, reduzindo a necessidade energética para produção endógena pelo animal, além de melhorar a saúde intestinal, reduzindo a disponibilidade de nutrientes para fermentação bacteriana, podendo refletir no desempenho zootécnico dos animais.

2.3 Polissacarídeos não-amiláceos e a ação da enzima xilanase

Os PNAs, comumente conhecidos como fibra, são um grupo heterogêneo de carboidratos que incluem celulose, pectinas, β -glucanos, pentosanos, heteroxilanos, xiloglucanos, entre outros, e são classificados dependendo da solubilidade desses constituintes (HASHEMI et al., 2017). A fibra solúvel é composta por hemiceluloses solúveis, como xilanos, beta-glucanos e pectinas, sendo capazes de aumentar a viscosidade da digesta por absorver água. Por outro lado, a parte insolúvel é formada por lignina, celulose e hemicelulose insolúvel, que não se solubilizam em meio aquoso (RUFINO et al., 2017; MACAMBIRA et al., 2021).

Esses carboidratos, juntamente com a lignina, constituem as principais frações fibrosas indigestíveis pelas enzimas endógenas de animais não-ruminantes (FORTES et al., 2012; RAZA; BASHIR, TABASSUM, 2019). A baixa digestibilidade destes componentes é devido às suas ligações beta-glicosídicas, visto a ausência de aparato enzimático específico capaz de romper tais ligações (DE BRITO et al., 2008; JHA; MISHRA, 2021), sendo hidrolisados parcialmente por meio da fermentação microbiana no intestino grosso das aves (KIM et al., 2022b).

As fibras exercem influências diferenciadas sobre o TGI e podem ocasionar efeitos negativos sobre os animais não-ruminantes dependendo da quantidade presente nas dietas, e levando em consideração seu grau de fermentação, variando de baixa, moderada e alta. A viscosidade formada pelas fibras solúveis pode comprometer a digestibilidade dos alimentos,

visto que interfere na área de contato das enzimas endógenas com a digesta, além de servir de substrato não digerido para a fermentação microbiana no intestino grosso (LEE et al., 2017). Em contrapartida, os PNAs insolúveis são pouco fermentáveis e parecem exercer predominantemente ação física. Neste contexto, essa fração pode aumentar o trânsito e a motilidade intestinal, atuando como uma barreira física ao acesso das enzimas endógenas aos seus respectivos substratos, prejudicando a utilização dos nutrientes e a produtividade das aves (BEDFORD, SCHULZE, 1998; KIARIE; ROMERO; RAVINDRAN, 2014).

A quantidade e a proporção de frações solúveis e insolúveis de PNAs variam entre os ingredientes, visto que dependem das características do grão e de fatores agrônômicos e ambientais (WARD, 2021). O milho possui em torno de 6 a 9% de PNAs totais, o farelo de soja possui de 16 a 21%, e o trigo, considerado um ingrediente de baixa digestibilidade, possui de 9 a 11% (KNUDSEN, 2014; ROSTAGNO et al., 2017).

Embora o milho e o farelo de soja sejam ingredientes de alta digestibilidade, Cowieson, Bedford e Ravindran (2010), estimam que em torno de 400 a 450 kcal/kg de energia podem não ser aproveitadas pelas aves devido aos nutrientes indisponíveis na composição. Neste contexto, considerando que grande parte dos cereais possuem PNAs em sua estrutura, a utilização de xilanases pela indústria é uma estratégia nutricional comumente utilizada. Segundo González-Ortiz et al. (2016), os arabinoxilanos são os principais PNAs encontrados nos cereais, representando em torno de 60 a 70% da parede celular. Sendo assim, a utilização de xilanase nas dietas ricas em grãos pode mitigar os efeitos negativos dos arabinoxilanos em não-ruminantes.

As xilanases, como a endo-1,4- β -xilanase, atuam sobre a estrutura dos xilanos clivando as ligações β -1,4-xilosídica entre os resíduos de xilose (MENDIS et al., 2016; MORGAN et al., 2017). Em decorrência disto, conseguem neutralizar os efeitos dos fatores antinutricionais liberando nutrientes encapsulados na parede celular, tornando-os disponíveis para absorção e aproveitamento no metabolismo energético das aves, melhorando o desempenho desses animais (AMERAH et al., 2017; BROCH et al., 2018; RAZA et al., 2019).

Com a hidrólise dos xilanos em unidades menores, há diminuição da viscosidade da dieta devido às moléculas perderem a capacidade em ligarem-se à água, desfazendo a barreira físico-química que impede que as enzimas atuem. Como consequência, as unidades de xiloses disponibilizadas são utilizadas para fermentação por bactérias benéficas, incluindo espécies de *Lactobacillus* e Bifidobactérias, controlando a proliferação das patogênicas, como *Clostridium perfringens*, reduzindo o desafio sanitário para o hospedeiro. Dessa maneira,

Masey O'Neil et al. (2014), sugerem que os mecanismos de ação da xilanase são parcialmente de forma indireta, visto que a ação conjunta da quebra do encapsulamento dos nutrientes na parede celular e a liberação de xilooligossacarídeos (XOs) para a fermentação pelos microrganismos trazem benefícios ao organismo do animal.

Lathan et al. (2016), ao suplementarem xilanase na dieta à base de milho e farelo de soja de frango de corte observaram melhora do peso corporal e conversão alimentar. Resultados semelhantes foram encontrados por Kiarie; Romero; Ravindran (2014), ao avaliarem dietas à base de milho ou trigo, com ou sem xilanase, para frangos de corte. De acordo com os autores, as aves alimentadas com dietas contendo xilanase apresentaram melhor desempenho e digestibilidade ileal de nutrientes.

Dessa maneira, a adição de xilanase nas dietas de frangos de corte auxiliam na digestibilidade de componentes indisponíveis da parede celular dos cereais, liberando nutrientes para absorção. Assim, a suplementação enzimática reflete na saúde intestinal dos animais, a qual pode proporcionar melhor desempenho zootécnico.

2.4 Saúde intestinal de frangos de corte

O termo “saúde intestinal” é bastante amplo e requer uma abordagem multidisciplinar, envolvendo a fisiologia intestinal, endocrinologia, microbiologia, imunologia e nutrição (CHOCT, 2009; WANG et al., 2020).

O intestino possui uma grande área de superfície que além de proporcionar uma barreira física eficaz, reduzindo a exposição à toxinas ambientais e microrganismos patogênicos, também propicia a absorção de nutrientes e a secreção de substâncias endógenas (KOGUT, 2019). Além disso, deve possibilitar condições para o crescimento de uma microbiota diversificada, que fornece não apenas uma segunda barreira contra a colonização por patógenos, como também regula o desenvolvimento epitelial, a modulação do sistema imune e viabiliza metabólitos para a nutrição do hospedeiro (SERGEANT et al., 2014; SMITH, POWERS, BEAL, 2014; ROBERTS et al., 2015; POLANSKY et al., 2016).

Com base na sua importância, a manutenção da saúde intestinal é essencial para se obter uma produção sustentável e lucrativa, pois está diretamente relacionada com o desempenho de frangos de corte (SOUZA et al., 2020; MACAMBIRA et al., 2021). Um intestino saudável está associado àquele em que o ambiente consegue manter-se em equilíbrio, possibilitando-o de exercer funções importantes e regular a homeostase intestinal,

seja por meio de funções físicas, fisiológicas e/ou microbiológicas, tais como combate à patógenos oportunistas, renovação epitelial e melhor aproveitamento dos nutrientes (APAJALAHTI; VIENOLA, 2016; KOGUT, 2019).

As desordens na homeostase intestinal causam impactos em questões fundamentais como a eficiência de produção, bem-estar, segurança alimentar, e proteção do meio ambiente (YAN et al., 2017). Tais desordens podem ser causadas não só por estressores infecciosos, mas também por fatores dietéticos, que afetam o ecossistema e a funcionalidade intestinal. A alimentação é, possivelmente, o fator mais importante responsável pela exposição do ambiente interno ao ambiente externo, assim, os ingredientes da dieta devem ser selecionados a favor das condições do intestino para manter o balanço entre o ambiente, o hospedeiro e a microbiota intestinal (YADAV; JHA, 2019).

Os fatores antinutricionais contidos nas dietas, além de alterar variáveis morfométricas no epitélio intestinal, também influenciam negativamente o desenvolvimento de órgãos imunológicos e respostas imunes normais. O intestino, além de atuar na digestão e absorção de nutrientes, é também o maior órgão imunológico do corpo (ZHENG et al., 2020). Além do intestino, nas aves, os órgãos linfoides primários incluem o timo e a bursa de Fabricius, locais onde ocorre a maturação e diferenciação das principais células de defesa do organismo (GAO et al., 2007).

O sistema imune inato é composto pelas barreiras epiteliais e secretórias, e por uma rede de células, incluindo neutrófilos, células *natural killers* (NK), monócitos/macrófagos, células dendríticas, dentre outros, e é a primeira linha de defesa do organismo que medeia os primeiros patógenos (WANG et al., 2020). A interação de patógenos com as aves podem desencadear a produção de citocinas, como as interleucinas (IL), que são mediadoras químicas pró-inflamatórias importantes no sistema imunológico inato, pois fazem a comunicação celular em meio ao desenvolvimento imunológico e à resposta imune (HUMAN et al., 2021; WANG et al., 2021b). Dentre as interleucinas que atuam no sistema imunológico das aves, as citocinas IL-1, IL-6, IL-8, IL-16, IL-17 e IL-18, possuem funções pró-inflamatórias, enquanto a IL-10 caracteriza-se como uma citocina anti-inflamatória (SALEH; AL-ZGHOUL, 2019).

Uma das maneiras de se avaliar a saúde intestinal é por meio das alterações histológicas macroscópicas e microscópicas. Neste contexto, a utilização da metodologia *I See Inside* (ISI[®]) avalia as alterações histológicas nos tecidos e as transforma em números, que permite sua correlação com o desempenho do animal. A metodologia avalia alguns parâmetros e determina *scores* (S), variando de 1 a 3 cada qual com seu fator de impacto (FI)

para calcular o valor total de *score* ISI, indicando que quanto maior seu valor, menor é a saúde intestinal do tecido avaliado (BELOTE et al., 2017).

Segundo Sanches et al. (2019), essa metodologia descreve a enterite microscópica (EM) em frangos de corte de forma mais dinâmica do que as tradicionais medidas lineares de vilosidades e criptas comumente utilizadas. As avaliações abrangem eventos inflamatórios que comprometem o intestino, como a infiltração da mucosa intestinal por células imunes e a resposta proliferativa da mucosa expressa como proliferação de enterócitos e células caliciformes, e o aumento das camadas de vilosidades. Além disso, avaliam a presença de parasitas como as Eimerioses, sendo uma parasitose frequente em frangos de corte que depreciam o desempenho desses animais.

A espessura da lâmina própria, infiltração de células inflamatórias, e avaliação dos enterócitos e das células caliciformes são boas variáveis para comparar a saúde intestinal entre diferentes tratamentos (BELOTE et al., 2018; SANCHES et al., 2019). A lâmina própria é hiperêmica e infiltrada com numerosas células inflamatórias, e a maioria das alterações precoces que ocorrem podem ser observadas na base dos enterócitos e da lâmina própria (OLKOWSKI et al., 2006).

Kraieski et al. (2017), avaliaram o desenvolvimento de EM utilizando o método ISI em frangos de corte que foram desafiados com *Eimeria* spp., e verificaram que as aves desafiadas possuíam maiores valores de *score* total ISI, indicando piora na saúde intestinal desses animais.

Embora alguns trabalhos utilizem a metodologia para verificar um processo patológico infeccioso, como a contaminação por eimerioses e clostridioses, a metodologia demonstra que os parâmetros da EM evoluem mesmo na ausência de um patógeno específico, e isso pode estar relacionado à dieta e componentes do ambiente como a cama (SANCHES et al., 2019). Dessa maneira, Dal Pont et al. (2021), incluíram farelo de arroz como fonte de PNAs na dieta de frangos de corte objetivando induzir uma inflamação intestinal crônica de baixo grau, e verificaram maiores valores de *scores* totais de ISI das aves desafiadas em relação ao grupo controle, indicando piora na saúde intestinal.

2.5 Efeito das enzimas sobre a saúde intestinal

A inclusão de alimentos ricos em PNAs indigestíveis pelos frangos de corte aumenta o substrato disponível para a fermentação microbiana patogênica e afeta negativamente o

epitélio intestinal desses animais. Os patógenos entéricos prejudicam a barreira intestinal por alterar sua integridade (danos das vilosidades intestinais), reduzir a eficiência dos transportadores de nutrientes, e aumentar a necessidade de nutrientes tanto para a proliferação e amplificação da infecção quanto para a manutenção epitelial (AWAD; HESS; HESS, 2017).

Fatores antinutricionais nos alimentos, além de alterar variáveis morfológicas no epitélio intestinal, também influenciam negativamente o desenvolvimento de órgãos imunológicos e respostas imunes (AMATI et al., 2003; WANG et al., 2021b). Os enterócitos, além de realizar a digestão e absorção de nutrientes, fazem parte do sistema imunológico inato do intestino, e a inflamação local induz a diferenciação e proliferação destes na cripta para substituir os enterócitos danificados na extremidade da vilosidade (WICKRAMASURIYA et al., 2022). De acordo com Nguyen et al. (2021), maior profundidade de cripta indica maior renovação tecidual (*turnover*), processo que demanda mais energia pelo organismo do hospedeiro.

A inclusão de enzimas como a amilase e xilanase podem mitigar os efeitos negativos causados pelos fatores dietéticos. Liu e Kim (2017), verificaram que quanto maior o nível de xilanase na dieta, maior a relação entre altura de vilosidade e profundidade de cripta (AV:PC) do duodeno, jejuno e íleo. A digestão e absorção de nutrientes pela mucosa intestinal pode sofrer interferência da altura das vilosidades intestinais, visto que apresenta correlação positiva com a capacidade de absorção de nutrientes pelos enterócitos, e quanto mais alta, maior será a capacidade de absorção. Segundo Schramm et al. (2021), a adição de amilase proporcionou melhora na digestibilidade dos nutrientes no jejuno, o que segundo os autores pode ter ocorrido devido ao aumento da área de superfície de absorção intestinal ocasionada pela melhora na digestibilidade do amido da dieta.

Além disso, estudos avaliando o desempenho e saúde intestinal de frangos de corte alimentados com dietas de baixa proteína, contendo ou não protease, mostraram que dietas contendo a enzima, tanto *on top* quanto com valorização enzimática, melhoraram a saúde intestinal visto a melhora nos índices de lâmina própria, espessura epitelial e proliferação de enterócitos, refletindo também na melhora da conversão alimentar dos animais (CARDINAL et al., 2019).

O sistema imunológico do hospedeiro e a microbiota intestinal possuem extensas interações. Segundo Yadav et al (2019), há evidências que sugerem que o sistema imunológico intestinal se desenvolve paralelamente ao desenvolvimento da microbiota intestinal, e por isso a microbiota desempenha um significativo papel na manutenção da homeostase imunológica, prevenindo a inflamação. Dessa forma, a degradação dos xilanos

pelas xilanases exógenas liberam XOs, que exercem um efeito prebiótico sobre a microbiota de frangos de corte (ZHANG et al., 2018). Os prebióticos são definidos como componentes alimentares indigestíveis e sua ação está associada à melhora da saúde intestinal, pois estimulam a fermentação e o crescimento de bactérias benéficas, como *Lactobacillus* e/ou *Bifidobacterium* spp. Estas bactérias ligam-se à mucosa intestinal e, por competição ao sítio de ligação, impedem que bactérias patogênicas se proliferem (COURTIN et al., 2008; ADHIKARI; KIM, 2017; CRAIG et al., 2020; JHA; MISHRA, 2021).

Dentre os benefícios proporcionados pela fermentação de prebióticos pela microbiota benéfica, está a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs). Estes metabólitos possuem influência sobre a modulação microbiana intestinal, beneficiando a população microbiana benéfica e reduzindo as bactérias patogênicas (LIN; OLUKOSI, 2021). Dentre suas ações, os AGCCs acidificam o meio e controlam a proliferação de espécies de bactérias patogênicas sensíveis ao meio ácido, como a *Salmonella*, *Escherichia coli* e *Clostridium*, o que diminui a inflamação pós-prandial, reduz infecções, e modula o sistema imunológico (SINGH et al., 2012; MASEY O'NEIL et al., 2014).

Além disso, esses oligômeros também podem agir como locais de ligação para microrganismos, e, portanto, podem excluir competitivamente bactérias patogênicas evitando a colonização da parede intestinal. Em adição, melhoram a absorção de nutrientes, como os minerais, e aumentam o conteúdo de energia metabolizável da ração (COURTIN et al., 2008; SURESH et al., 2020).

Os XOs são fermentados a AGCCs no ceco, predominantemente a acetato, butirato e propionato, respectivamente, além de água e outros gases, sendo que cada ácido graxo é utilizado pelo organismo de forma diferente (RUFINO et al., 2017; LIN; OLUKOSI, 2021). Os produtos gerados pela fermentação são influenciados pelos substratos disponíveis, sendo diferentes em dietas à base de milho ou trigo, por exemplo (KIARIE et al., 2013).

Deste modo, Kiare et al. (2014), ao trabalharem com diferentes dietas, à base de milho ou trigo, com ou sem suplementação de xilanase, verificaram que o tipo de dieta influencia na concentração de AGCCs no conteúdo cecal, sendo que dietas à base de trigo aumentaram a produção de ácido acético e butírico. Em contrapartida, verificaram que as dietas à base de milho proporcionam maiores concentrações de ácido propiônico, valérico e isovalérico no conteúdo cecal de frangos de corte. Além disso, esses autores verificaram que, independentemente do tipo da dieta, a inclusão de xilanase proporcionou maior concentração de ácido acético, melhor desempenho dos animais, e maior utilização dos nutrientes, sugerindo a hidrólise de PNAs solúveis e insolúveis.

Da mesma forma, Williams et al. (2018), ao suplementar xilanase em dietas contendo diferentes tipos de milho, verificaram maiores concentrações de butirato e isovalerato no ceco de frangos de corte, indicando alteração da microbiota do TGI devido à disponibilidade de oligossacarídeos, refletindo em melhor desempenho dos animais.

Dentre as diferentes funções, o acetato se difunde pela parede intestinal, é transportado para o fígado e pode ser utilizado para a síntese do colesterol, e atuar como um substrato energético para o tecido muscular. O propionato é absorvido pela corrente sanguínea, convertido em glicose no fígado via gliconeogênese e utilizado no metabolismo energético (MONTAGNE; LECLERC; SIMSEK, 2003; AHSAN et al., 2016). O butirato é a principal fonte de energia para a atividade metabólica dos enterócitos, portanto, sua ação está relacionada à proliferação e diferenciação de células epiteliais do TGI, ampliando assim a área de superfície disponível para absorção de nutrientes. Em adição, a acidificação do meio pelo ácido butírico modula o crescimento da microbiota intestinal e diminui a colonização de bactérias indesejáveis, mantendo a integridade da mucosa, reduzindo a apoptose celular e refletindo na modulação do sistema imune (ZHOU et al., 2014; YADAV et al., 2019).

Além disso, sugere-se que a absorção de AGCCs, como o butirato, estimule a liberação de hormônios intestinais que podem melhorar a digestibilidade dos nutrientes (SINGH et al., 2012), pois conseguem mediar o esvaziamento gástrico por um mecanismo chamado efeito *ileal-brake* (COWIESON; O'NEIL, 2013). Esse mecanismo é um sistema de controle que detecta o aumento da fermentação no intestino grosso pela produção de AGCCs pela microbiota e retarda o trânsito intestinal e o esvaziamento gástrico, aumentando o tempo de retenção da dieta no trato gástrico, favorecendo a digestão e a absorção de nutrientes (CROOM et al., 1999; SINGH et al., 2012; COWIESON; KLUENTER, 2019).

Inflamação metabólica é o termo utilizado quando os animais apresentam quadros inflamatórios crônicos de baixo grau ocasionados por componentes da dieta, como fatores antinutricionais presentes nos alimentos (KOGUT et al., 2018). Segundo Dal Pont et al. (2020), mesmo que em pequenas quantidades, esses componentes da dieta podem ser prejudiciais à saúde intestinal e podem atuar como um gatilho à inflamação crônica como resultado das lesões que causam e da constante exposição diária ao epitélio intestinal. Dessa forma, a suplementação enzimática pode ser uma alternativa à adversidade, prevenindo inflamações crônicas dietéticas, e contribuindo para manter a saúde intestinal adequada, melhorando a função imunológica.

Segundo GAO et al. (2007), a adição da enzima pode melhorar a digestão da ração e a absorção de nutrientes, o que, por sua vez, pode influenciar na imunidade do organismo.

Esses autores, ao suplementarem a dieta de frangos de corte com xilanase na ração à base de trigo encontraram efeitos positivos sobre as respostas imunológicas, onde verificaram aumento do peso relativo do baço, porém sem alteração no peso relativo do timo e da bursa de Fabricius, e ainda um aumento sérico de anticorpos e proliferação de linfócitos e células NK, sugerindo que a suplementação enzimática acelerou o desenvolvimento de órgãos do sistema imune e melhorou a resposta humoral.

Zhang et al. (2018), ao trabalharem com suplementação de xilanase e produtos da fermentação de polissacarídeos (FPHC), verificaram que as concentrações de interleucinas IL-1Ra e IL-10 foram aumentadas nos grupos que continham xilanase e FPHC, e o grupo que continha os dois aditivos, enquanto as concentrações de IL-1 β e TNF- α foram reduzidas nos três grupos após inclusão de xilanase e FPHC. Tais resultados sugerem que a suplementação de xilanase e polissacarídeos fermentados reduzem infecções patogênicas e aumentam as atividades antioxidantes e anti-inflamatórias dos frangos de corte.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Comitê de ética

O experimento foi realizado conforme os princípios éticos na experimentação animal, com aprovação pelo Comitê de Ética para Uso de Animais em Pesquisa da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (protocolo nº 23/2022).

3.2 Local de execução

O experimento foi realizado no Centro de Pesquisa em Avicultura, localizado no Núcleo de Estação Experimental Professor Antônio Carlos dos Santos Pessoa, pertencente à Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Unioeste, Campus de Marechal Cândido Rondon – PR.

3.3 Instalações, animais e delineamento experimental

O experimento foi conduzido em aviário experimental, construído em alvenaria com 35 metros de comprimento e 13 metros de largura, coberto com telhas de aluzinco, forro de polipropileno, laterais em muretas de concreto de 0,30m, telas e cortinas de polipropileno. As aves foram alojadas em 49 boxes de 1,96m² cada, contendo um comedouro tubular, bebedouro tipo *nipple*, e piso de concreto revestido com maravalha de pinus de sexto uso.

A altura do comedouro e bebedouro foi regulada conforme a necessidade da ave e a vazão da água ajustada de acordo com a idade, sendo 40 mL min⁻¹ até o terceiro dia, 60 mL min⁻¹ dos quatro aos sete dias, e aumentando para 90 mL min⁻¹ até 28 dias de idade.

O período experimental foi dividido em duas fases, de acordo com o programa alimentar adotado, sendo fase inicial (1 a 14 dias) e de crescimento (15 a 28 dias). Na fase inicial, o aquecimento do ambiente foi realizado por forno a pellet, mantendo a temperatura próxima à faixa de 33°C nos primeiros três dias e diminuindo gradativamente até 28°C ao final do experimento. A partir dos 15 dias de idade, quando necessário, o resfriamento e a renovação do ar foram realizados por quatro exaustores e duas placas evaporativas, reduzindo

a temperatura gradativamente até alcançar os 23°C. O programa de luz utilizado foi de 24 horas (natural mais artificial) até o terceiro dia de idade, uma hora de escuro dos quatro aos sete dias de idade e seis horas de escuro dos oito aos 28 dias de idade, controlado por painel automático modelo SMAAI 4.

Ao todo, foram alojados 980 pintos de corte, machos, da linhagem Cobb 500[®] provenientes de incubatório comercial, com um dia de idade e peso vivo médio inicial de $46 \pm 0,40$ gramas. As aves foram distribuídas em um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial $2 \times 3 + 1$, sendo dois níveis de amilase (100 e 200 U kg⁻¹) x três níveis de xilanase (0, 1000 e 2000 U kg⁻¹) + um controle positivo, atendendo às necessidades nutricionais conforme manual da linhagem, totalizando sete tratamentos, sete repetições e 20 aves por unidade experimental (UE).

3.4 Dietas experimentais

As aves receberam água e ração *ad libitum* durante o período de 28 dias. As dietas experimentais (Tabela 1) foram formuladas considerando as necessidades nutricionais da fase inicial, de 1 a 14 dias, e crescimento de 15 a 28 dias, sendo fornecidas na forma peletizada. O processo de peletização foi realizado em peletizadora Chavantes[®] (Modelo de 7,5 - 15 CV) com capacidade de 300 kg/hora, matriz circular com furos de 5,0 mm de diâmetro, velocidade de 15,0 m/s, e condicionador Chavantes[®] com capacidade de 100 kg/hora. No processo de condicionamento, se utilizou máxima injeção de vapor, com 1,0 kg/cm³ de pressão, adição de vapor no condicionador e temperatura de 80 a 90°C. Após o processo de peletização, a ração passou por processo de secagem/resfriador atingindo temperatura média de 37°C. A composição nutricional das rações experimentais foi analisada em laboratório externo (Tabela 2).

As dietas experimentais consistiram em dois níveis de amilase (100 e 200 U kg⁻¹), três níveis de xilanase (0, 1000 e 2000 U kg⁻¹) e um controle positivo, atendendo às necessidades nutricionais das aves. Os tratamentos contendo amilase e xilanase apresentaram redução nutricional de 100 kcal de energia metabolizável aparente e 6% de proteína bruta e aminoácidos digestíveis (lisina, metionina, metionina + cistina, treonina e triptofano). Os tratamentos contendo amilase e xilanase continham 2.500 U kg⁻¹ de protease. A valorização proteica de 6% foi considerada da protease e xilanase. Todas as dietas continham 500 U kg⁻¹ de fitase, e a valorização nutricional para essa enzima foi de 0,12% de cálcio e de fósforo

disponível. A recuperação das enzimas protease e xilanase das dietas na fase inicial foram realizadas em laboratório comercial (Paraná, Brasil) (Tabela 3). A metodologia de análise de recuperação da enzima amilase estava em processo de desenvolvimento, não sendo possível realizar a quantificação desta enzima nas rações fareladas e peletizadas.

A xilanase utilizada era composta por uma endo-1,4- β -xilanase, produzida a partir da fermentação do microrganismo *Trichoderma longibrachiatum* (GIM 3.534), com atividade de 10.000 unidades de xilanase por grama ($U\ g^{-1}$). A unidade de xilanase corresponde à quantidade de enzima que libera 1 micromol de açúcar redutor a partir de solução de xilano (5mg/mL), em pH 5,5 a 37°C.

A amilase utilizada era composta por uma α -amilase, produzida a partir da fermentação do microrganismo *Bacillus subtilis* (ACCC 11088), com atividade de 1.000 unidades de amilase por grama ($U\ g^{-1}$). A unidade de atividade de α -amilase equivale à quantidade de enzima necessária para degradação de 1g de amido solúvel em uma hora em pH 6,0 a 60°C.

A fitase utilizada era composta por uma 6-fitase, produzida a partir da fermentação do microrganismo *Aspergillus niger* (ACCC 30557), com atividade de 5.000 unidades de fitase por grama ($U\ g^{-1}$). A unidade de fitase corresponde à quantidade de enzima que libera 1 micromol de fósforo inorgânico por minuto a partir de solução de fitato de sódio (milimol/L), a pH 5,0 e 37°C.

A protease utilizada foi produzida a partir da fermentação do microrganismo *Aspergillus niger* (ACCC 33326) e uma protease produzida a partir da fermentação do *Bacillus subtilis* (GIM 1286), com atividade de 20.000 unidades de protease por grama ($U\ g^{-1}$). Uma unidade de atividade de protease equivale à quantidade de enzima que libera 1 micrograma de tirosina por minuto, a partir de caseína, a 40°C e pH 3,0 e 7,2.

Tabela 1. Composição percentual e níveis calculados das dietas experimentais nas fases inicial (1 a 14 dias de idade) e crescimento (15 a 28 dias de idade).

Ingredientes (kg ⁻¹)	Inicial		Crescimento	
	CP	ENZ	CP	ENZ
Milho	368,55	437,93	370,46	435,95
Farelo de soja (46%)	288,00	245,52	209,52	170,25
Trigo grão	150,00	150,00	175,00	175,00
Soja integral desativada	80,00	80,00	100,00	100,00
Farelo de trigo	50,00	50,00	75,00	75,00
Óleo de soja refinado	28,93	2,18	39,49	13,43
Fosfato bicálcico	10,32	10,32	7,71	7,71
Calcário calcítico (36%)	9,24	9,24	8,87	8,87
NaCl	4,287	4,292	3,835	3,839
L-Lisina HCl (78%)	2,746	2,949	3,141	3,325
DL-Metionina (98%)	3,294	2,975	2,977	2,680
L-Treonina (98%)	1,259	1,216	1,319	1,276
Cloreto de colina (60%)	0,500	0,500	0,350	0,350
Premix vitamínico ¹	0,250	0,250	0,200	0,200
Premix mineral ²	0,500	0,500	0,500	0,500
Adsorvente de micotoxinas ³	1,000	1,000	1,000	1,000
Anticoccidiano ⁴	0,500	0,500	-	-
Inerte (caulim) ⁵	0,625	0,625	0,625	0,625
Composição calculada				
Energia metabolizável (kcal kg ⁻¹)	3.000	2.900	3.100	3.000
Proteína disponível (%)	22,00	20,66	20,00	18,80
Cálcio (%)	0,743	0,734	0,645	0,672
Fósforo disponível (%)	0,450	0,443	0,400	0,389
Sódio (%)	0,200	0,200	0,180	0,180
Cloro (%)	0,361	0,361	0,338	0,338
Lisina dig. (%)	1,200	1,127	1,100	1,034
Metionina dig. (%)	0,596	0,560	0,540	0,510
Cistina dig. (%)	0,292	0,274	0,274	0,255
Met+Cist dig. (%)	0,888	0,834	0,814	0,765
Treonina dig. (%)	0,792	0,742	0,726	0,682
Triptofano dig. (%)	0,249	0,230	0,224	0,205

CP – Controle Positivo - ração atendendo as exigências nutricionais; ENZ - CP com redução de 100 kcal, 6% de proteína bruta e aminoácidos (lisina, met+cist, treonina e triptofano) e adição de enzimas. ¹Composição do premix vitamínico inicial (1 – 14 dias), níveis por quilograma de ração: vitamina A 10.000 UI kg⁻¹, vitamina D3 2.500 UI kg⁻¹, vitamina E 20 UI kg⁻¹, vitamina K3 2 mg kg⁻¹, vitamina B1 2 mg kg⁻¹, vitamina B2 5 mg kg⁻¹, vitamina B6 3 mg kg⁻¹, vitamina B12 12 mg kg⁻¹, niacina 35 mg kg⁻¹, ácido pantotênico 12 mg kg⁻¹, ácido fólico 1 mg kg⁻¹, biotina 50 mcg kg⁻¹. Composição do premix vitamínico crescimento (15 – 28 dias), níveis por quilograma de ração: vitamina A 8.000 UI kg⁻¹, vitamina D3 2.000 UI kg⁻¹, vitamina E 16 UI kg⁻¹, vitamina K3 1,60 mg kg⁻¹, vitamina B1 1,60 mg kg⁻¹, vitamina B2 4 mg kg⁻¹, vitamina B6 2,40 mg kg⁻¹, vitamina B12 9,60 mg kg⁻¹, niacina 28 mg kg⁻¹, ácido pantotênico 9,60 mg kg⁻¹, ácido fólico 0,80 mg kg⁻¹, biotina 40 mcg kg⁻¹. ²Composição do premix mineral (1 – 28 dias), níveis por quilograma de ração: manganês 70 mg kg⁻¹, zinco 60 mg kg⁻¹, ferro 50 mg kg⁻¹, cobre 8 mg kg⁻¹, iodo 0,80 mg kg⁻¹, selênio 0,30 mg kg⁻¹. ³Bentonita. ⁴Aditivo anticoccidiano: Nicarbazina+Narasina (80%/80%), níveis por quilograma de ração: 80 mg kg⁻¹. ⁵A inclusão das

associações e doses enzimáticas na dieta foi realizada em substituição ao inerte (caulim), fornecendo os níveis de amilase (100 e 200 U kg⁻¹) e xilanase (1000 e 2000 U kg⁻¹). Todas as dietas continham 500 U kg⁻¹ de fitase. A valorização nutricional da fitase foi de 0,12% de cálcio e de fósforo. Os tratamentos contendo amilase e xilanase continham 2.500 U kg⁻¹ de protease.

Tabela 2: Composição analisada pelo espectrofotômetro NIR das dietas experimentais na fase inicial (1 a 14 dias de idade) e fase de crescimento (15 a 28 dias).

Tratamento (U kg ⁻¹)	Fase Inicial				
	Umidade (%)	Proteína bruta (%)	Cinzas (%)	Extrato etéreo (%)	Fibra bruta (%)
T1 - CP	13,50	21,93	4,44	6,58	3,22
T2 – 100 U amilase + 0 U xilanase	13,14	20,74	4,46	4,28	3,16
T3 – 100 U amilase + 1000 U xilanase	12,95	20,23	4,45	4,78	3,17
T4 – 100 U amilase + 2000 U xilanase	12,94	21,24	4,48	4,62	3,15
T5 – 200 U amilase + 0 U xilanase	12,52	20,79	4,06	4,63	2,84
T6 – 200 U amilase + 1000 U xilanase	12,50	20,66	4,39	4,83	3,01
T7 – 200 U amilase + 2000 U xilanase	12,13	20,67	4,47	4,68	3,02
Fase de Crescimento					
T1 – CP	13,89	19,70	4,14	7,75	2,97
T2 – 100 U amilase + 0 U xilanase	13,24	18,84	3,89	5,68	2,94
T3 – 100 U amilase + 1000 U xilanase	13,00	19,37	3,78	5,67	2,72
T4 – 100 U amilase + 2000 U xilanase	13,15	18,81	3,75	6,10	3,24
T5 – 200 U amilase + 0 U xilanase	12,67	18,61	3,85	5,92	3,29
T6 – 200 U amilase + 1000 U xilanase	12,08	18,92	4,02	6,05	3,19
T7 – 200 U amilase + 2000 U xilanase	12,25	18,80	4,17	5,85	3,28

Controle Positivo (CP), ração atendendo as exigências nutricionais. Demais tratamentos com redução de 100 kcal e 6% de proteína bruta e aminoácidos (lisina, metionina, met + cist, treonina e triptofano) com inclusão de enzimas.

Tabela 3: Atividade declarada e analisada (U kg^{-1}) de protease e xilanase das dietas experimentais (fase inicial).

Tratamento	Ração*	Protease	Xilanase
T2 – 100 U amilase + 0 U xilanase	Farelada	3180	N/A
T2 – 100 U amilase + 0 U xilanase	Peletizada	3460	N/A
T3 – 100 U amilase + 1000 U xilanase	Farelada	3780	1321
T3 – 100 U amilase + 1000 U xilanase	Peletizada	3640	402
T4 – 100 U amilase + 2000 U xilanase	Farelada	3540	2951
T4 – 100 U amilase + 2000 U xilanase	Peletizada	3770	1614
T5 – 200 U amilase + 0 U xilanase	Farelada	3440	N/A
T5 – 200 U amilase + 0 U xilanase	Peletizada	3580	N/A
T6 – 200 U amilase + 1000 U xilanase	Farelada	3580	1603
T6 – 200 U amilase + 1000 U xilanase	Peletizada	3060	292
T7 – 200 U amilase + 2000 U xilanase	Farelada	3440	2391
T7 – 200 U amilase + 2000 U xilanase	Peletizada	3710	623

N/A, não analisada. *As recuperações enzimáticas foram realizadas antes (ração farelada) e após o processamento de peletização (ração peletizada).

3.5 Coleta de amostras e análises realizadas

Aos 28 dias de idade uma ave/UE foi selecionada de forma aleatória, pesada individualmente e eutanasiada por deslocamento cervical. Fragmentos do jejuno foram coletados para a análise da morfometria intestinal por microscopia de luz e índice de *score ISI (I See Inside®)*.

O conteúdo cecal foi acondicionado em tubo estéril (50 mL) e imediatamente congelado a -20°C para posterior análise do perfil de ácidos graxos de cadeia curta.

Amostras de sangue foram colhidas, via punção braquial, em tubos estéreis a vácuo e imediatamente centrifugadas, sendo o soro separado e congelado para a determinação da concentração sérica de citocinas.

3.6 Desempenho zootécnico

Para avaliação do desempenho zootécnico, as aves e as rações foram pesadas no início do período experimental e aos 14 e 28 dias de idade para determinação do consumo médio de ração (CMR), ganho de peso (GP), e conversão alimentar (CA). A mortalidade foi anotada diariamente

para posterior correção do desempenho, conforme recomendado por Sakomura e Rostagno (2016).

3.7 Morfometria intestinal

Para a análise da morfometria da mucosa intestinal avaliou-se a altura de vilos, profundidade de cripta, relação altura de vilos:profundidade de cripta, e área de absorção.

Os fragmentos histológicos transversais de dois centímetros do segmento intestinal foram coletados logo após o divertículo de Meckel, lavados com solução salina, fixados em solução de formalina tamponada (10%) por 24 horas e, em seguida, desidratados em uma série de concentrações crescentes de álcoois, diafanizados em xilol e incluídos em parafina (LUNA, 1968). Após a microtomia semisseriada (cortes de sete μm), os cortes foram corados pela técnica de hematoxilina e eosina.

Imagens digitais foram obtidas em microscópio de luz (objetiva 4x) e as análises morfométricas foram realizadas utilizando o sistema de imagens *PROPLUS IMAGE 4.1*, da Midia Cibertecnicos. Para cada lâmina, foram mensurados o comprimento e a largura de 20 vilos e profundidade e largura de 20 criptas. Estas medidas morfométricas foram utilizadas para o cálculo da área da superfície de absorção da mucosa intestinal, por meio da fórmula proposta por Kisielinski et al. (2002): $((LV \times AV) + ((LV/2) + (LC/2))^2 / (LV/2 + LC/2)^2)$, em que:

LV: largura do vilos;

AV: altura do vilos;

LC: largura da cripta.

Em adição, foi calculado a relação altura de vilos:profundidade de cripta, dividindo-se o valor da altura do vilos pelo valor de profundidade de cripta.

3.8 Score *I See Inside*®

A metodologia *I See Inside* (ISI) é um índice baseado em uma pontuação numérica de alteração aplicada à análise histológica intestinal segundo Kraieski et al. (2017).

As variáveis avaliadas no intestino foram: espessura da lâmina própria, espessura epitelial, proliferação de enterócitos, infiltração de células inflamatórias no epitélio, infiltração de células inflamatórias na lâmina própria, aumento das células caliciformes, congestão e presença de oocistos de *Eimeria*.

Nesta metodologia é definido um fator de impacto (FI) para cada alteração nas análises, de acordo com a redução da capacidade funcional dos órgãos. O FI varia de 1 a 3, sendo 3 o mais impactante para a função do órgão.

Além disso, avaliou-se a extensão de cada lesão (intensidade) ou frequência observada em relação aos órgãos não afetados em cada órgão/tecido por animal, e a pontuação variou de 0 a 3: score 0 (ausência de lesão ou frequência), score 1 (alteração de até 25% da área ou frequência observada), score 2 (variação da alteração de 25 a 50% da área ou frequência observada) e score 3 (extensão da alteração maior que 50% da área ou frequência observada).

Para chegar ao valor final do índice ISI, multiplicou-se o valor do FI de cada alteração pelo respectivo número de escore e os resultados de todas as alterações foram somados de acordo com a fórmula $ISI = \Sigma (FI * S)$, em que:

FI = fator de impacto

S = score

A soma de todas as variáveis já mencionadas resultou no valor total do ISI para cada ave (cada ave foi considerada uma repetição para análise estatística).

3.9 Ácidos graxos de cadeia curta

A determinação dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs) foi realizada segundo Del Valle et al. (2018). As concentrações dos ácidos acético, butírico, isobutírico, propanoico, valérico e isovalérico nas amostras cecais foram determinadas por cromatografia gasosa utilizando cromatógrafo Shimadzu[®] GC-2010 Plus equipado com injetor automático AOC-20i, coluna capilar Stabilwax-DA[™] (30m, 0,25mm ID, 0,25µm df, Restek[®]) e detector de ionização de chama (FID). Dois gramas do conteúdo cecal foi diluído em NaOH e posteriormente centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos. Posteriormente, 1 mL do sobrenadante foi transferido para um microtubo e adicionado 1 M de ácido o-fosfórico p.a. (Merck[®]) e fortificação com mistura de ácidos voláteis livres (Supelco[®]).

Uma alíquota de 1µL de cada amostra foi injetada com taxa de split de 40:1, utilizando hélio como gás de arraste com velocidade linear de 42 cm.s⁻¹, obtendo-se a separação dos

analitos em uma corrida cromatográfica de 11,5 minutos. As temperaturas do injetor e do detector foram, respectivamente, de 250°C e 300°C com temperatura inicial da coluna de 40°C. A rampa de temperatura da coluna iniciou com um gradiente de 40 até 120°C à taxa de 40°C.min⁻¹, seguido de um gradiente de 120 até 180°C à taxa de 10°C.min⁻¹ e de 180 a 240°C à taxa de 120°C.min⁻¹, mantendo-se a temperatura a 240°C por mais 3 minutos ao final.

Para a quantificação dos analitos, uma calibração do método foi realizada com diluições do padrão WSFA-2 (Supelco[®]) e de ácido acético glacial (Sigma-Aldrich[®]), analisadas sob as condições descritas acima. A determinação e a integração dos picos foram feitas utilizando-se o *software* GCsolution v. 2.42.00 (Shimadzu[®]). Os resultados foram expressos em mmol kg⁻¹.

3.10 Concentrações séricas de citocinas

A concentração sérica de citocinas (IL-6, IL-10 e IL-16) foi mensurada utilizando o kit comercial Milliplex de citocinas específicas para frangos (Catalog GCYT1-16K; MilliporeSigma Co., Burlington, MA), seguindo as instruções do fabricante.

As amostras do soro após descongeladas foram diluídas (1:4) com 25 µL de soluções de matriz apropriadas, soluções padrões e de controle provenientes do kit comercial. As amostras foram então incubadas e agitadas por 16-18 horas a 2-8°C. Após a amostra atingir temperatura ambiente, foi adicionado 25 µL do preparo de anticorpos de detecção. As amostras foram incubadas e agitadas em um agitador de placas por uma hora em temperatura ambiente sendo, em seguida, adicionado 150 µL da solução *Sheath Fluid* PLUS e agitadas por 5 minutos. Para a quantificação das citocinas as placas foram lidas e analisadas utilizando a tecnologia Luminex xMAP[®] (Luminex Corp., Austin, TX), que utiliza nanoesferas magnéticas conjugadas a anticorpos específicos para cada alvo detectável.

3.11 Análise econômica

A análise econômica foi avaliada considerando o custo da tonelada da ração (R\$/t) de cada programa alimentar por fase do animal, peso médio e o consumo médio de ração por fase, utilizando a equação proposta por Bellaver et al. (1985): $Y_i = (Q_i \times P_i) / G_i$, em que:

Y_i = custo médio de alimentação por quilograma de peso vivo, produzido no i -ésimo tratamento;

Q_i = quantidade de ração consumida no i -ésimo tratamento;

P_i = preço da ração consumida no i -ésimo tratamento;

G_i = ganho de peso no i -ésimo tratamento verificado no período.

O custo alimentar por tonelada de frango foi calculado pelo custo da ração baseado nos preços dos ingredientes referentes ao mês de março de 2022.

3.12 Análises estatísticas

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SAS[®] Versão OnDemand (2021) (SAS Inst. Inc., Cary, NC, EUA), considerando 5% de probabilidade. Os dados foram inicialmente testados quanto a normalidade (Shapiro-Wilk), homogeneidade (Levene) e a retirada de outliers realizada por meio do PROC UNIVARIATE. Havendo distribuição normal, realizou-se a análise de variância, em que se verificou o efeito isolado e a interação entre os efeitos nos níveis de amilase e xilanase. Para a comparação entre os níveis de amilase foi utilizado o teste F, enquanto para os níveis de xilanase foi utilizado o teste de Tukey. Em adição, os níveis de cada enzima foram comparados ao controle positivo pelo teste de Dunnett. Para todos estes procedimentos foi utilizado o PROC GLM.

Para as variáveis de ISI, as quais não apresentaram distribuição normal, foram adotados testes não paramétricos através do PROC NPAR1WAY. As avaliações dos tipos de enzimas de forma isolada e a comparação com o controle positivo foram realizadas através do teste de Kruskal-Wallis, e havendo efeito, os níveis de xilanase foram comparados pelo teste de Dunn. Para verificar a interação entre os tratamentos foi adotado o teste de Friedman.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Desempenho zootécnico

Não foi observado interação ($P>0,05$) entre a suplementação de amilase e xilanase em ambas as fases avaliadas para os parâmetros de desempenho. Considerando os efeitos isolados, foi encontrado diferença entre as dosagens de xilanase durante a fase inicial (1 a 14 dias), em que as aves que receberam dietas contendo 1000 U kg^{-1} da enzima apresentaram melhor CA ($P=0,014$) quando comparado ao grupo que não recebeu a suplementação (Tabela 4).

Comparando os tratamentos de inclusão das enzimas com o controle positivo, independentemente do nível de inclusão das enzimas, amilase ($P=0,0005$ e $P=0,0001$) ou xilanase ($P=0,0004$ e $P=0,001$), houve piora na CA, respectivamente, para as fases inicial e crescimento (Tabela 4).

Tabela 4: Desempenho de frangos de corte na fase inicial (1 a 14 dias) e de crescimento (15 a 28 dias) alimentados com dietas contendo diferentes doses de amilase e xilanase.

Tratamentos	1 a 14 dias			1 a 28 dias		
	GP (g)	CMR (g)	CA	GP (g)	CMR (g)	CA
CP	451	551	1,216	1863	2547	1,376
Amilase (U kg ⁻¹)						
100	449	559	1,246*	1823	2577	1,414*
200	454	566	1,246*	1822	2576	1,416*
Xilanase (U kg ⁻¹)						
0	447	562	1,255a*	1814	2570	1,419*
1000	458	568	1,241b*	1835	2588	1,411*
2000	450	559	1,244ab*	1818	2571	1,415*
EPM	15,60	19,87	0,01	54,55	63,47	0,02
CV (%)	3,46	3,54	1,07	2,98	2,47	1,22
Amilase	0,357	0,250	0,395	0,879	0,915	0,710
Xilanase	0,157	0,535	0,014	0,558	0,704	0,448
Amilase vs Xilanase	0,250	0,649	0,119	0,386	0,481	0,410
Dunnett Amilase	0,613	0,188	0,0005	0,198	0,555	0,0004
Dunnett Xilanase	0,331	0,362	0,0001	0,222	0,593	0,0001

CP – Controle Positivo – ração atendendo as exigências nutricionais, sem adição de enzimas exógenas. As dietas contendo enzimas tiveram valorização nutricional de 100 kcal e 6% de proteína e aminoácidos (lisina, met + cist, treonina e triptofano). Todas as dietas continham 500 U kg⁻¹ de fitase. A valorização nutricional da fitase foi de 0,12% de cálcio e de fósforo. Os tratamentos contendo amilase e xilanase continham 2500 U kg⁻¹ de protease. GP – ganho de peso. CMR – consumo médio de ração. CA – conversão alimentar. CV (%): coeficiente de variação, EPM: erro padrão da média. Médias com letras distintas na mesma coluna indicam diferenças (P<0,05) pelo teste de Tukey.

*Média diferente do controle positivo pelo teste de Dunnett.

De acordo com Dessimoni et al. (2019), as aves tendem a aumentar o consumo de ração para compensar o déficit de energia e nutrientes depreciados nas valorizações enzimáticas, o que pode reduzir a eficiência da CA dos frangos de corte. Em concordância com o presente estudo, esses autores utilizaram xilanase, betaglucanase e fitase, verificando que o CP apresentou a melhor CA quando comparada às suplementações enzimáticas e suas respectivas depreciações energéticas, redução entre 120 e 170 kcal kg⁻¹. Da mesma forma, as aves do presente estudo que tiveram a dieta com depreciação energética e de aminoácidos aumentaram o consumo, refletindo em pior CA.

A resposta à suplementação enzimática depende de fatores como a redução energética e nutricional da dieta, a idade das aves, a qualidade da dieta, os fatores antinutricionais contidos nos ingredientes e o processamento das matérias-primas das rações, bem como a própria ração (OLUKOSI; BEDFORD, 2019). Segundo Yegani e Kover (2013), a combinação de fatores pode explicar resultados considerados inesperados.

Uma das formas de melhorar a eficiência alimentar das aves é realizar o processamento das rações, como a peletização, o qual permite a modificação das estruturas dos carboidratos e melhora na digestibilidade. O tamanho da partícula e a forma física da ração influencia no consumo de ração pelos frangos de corte, sendo que a ração na forma peletizada aumenta o consumo, pois possibilita uma melhor apreensão do alimento (ABU; ALABI; JIYA, 2023). Dessa forma, Massuquetto et al. (2019), verificaram que o consumo dos frangos de corte alimentados com ração peletizada foi maior em comparação ao grupo alimentado com a ração farelada.

Embora o processamento térmico seja uma maneira de melhorar a utilização da ração, este procedimento pode afetar a termo estabilidade de aditivos, como as enzimas, devido às altas temperaturas utilizadas no processo, diminuindo a eficiência do produto (PUCCI et al., 2010). De acordo com a análise de recuperação enzimática realizada nas rações, é possível verificar que o processamento térmico afetou a atividade enzimática da xilanase. Esses resultados podem supor que o desempenho inferior das aves alimentadas com a xilanase, quando comparada ao CP, foi afetado pela baixa atividade da enzima na ração após a peletização.

Em trabalho de Lamp et al (2015), foi encontrado diferença no desempenho dos frangos de corte que foram alimentados com rações fareladas ou peletizadas contendo dois tipos diferentes de beta-glucanase (A e B), sendo que a ração peletizada ocasionou menor desempenho nos animais quando comparada ao CP. Os autores verificaram a redução de aproximadamente 50% da atividade enzimática da beta-glucanase B na ração peletizada, onde

possivelmente o processamento térmico da ração proporcionou menor atividade da enzima, o qual reduziu a digestibilidade da ração e, conseqüentemente, o desempenho dos animais.

Embora o desempenho dos animais nas fases inicial e crescimento não tenha sido equiparado ao CP, a digestibilidade ileal dos nutrientes foi analisada aos 42 dias de idade (dados não publicados). De uma maneira geral, verificou-se que as maiores dosagens das enzimas aumentaram os coeficientes de digestibilidade, bem como a digestibilidade dos nutrientes. Com esses dados é possível inferir que a suplementação enzimática também melhorou a digestibilidade dos nutrientes na fase inicial dos animais, onde a CA das aves foi melhor com a suplementação de 1000 U kg⁻¹ de xilanase em relação ao tratamento sem a enzima.

4.2 Morfometria intestinal

Não houve interação entre os níveis de amilase e xilanase, bem como efeito isolado para os parâmetros analisados ($P > 0,05$), demonstrando que a altura de vilosidades, profundidade de cripta, relação altura de vilosidade:profundidade de cripta, e área de absorção foram semelhantes entre os tratamentos (Tabela 5).

Tabela 5: Morfometria do segmento jejuno de frangos de corte, aos 28 dias de idade, alimentados com dietas contendo diferentes doses de amilase e xilanase.

Tratamentos	AV (μm)	PC (μm)	RVC	AA (μm)
CP	729,59	83,44	9,35	15,39
Amilase (U kg^{-1})				
100	722,27	75,01	10,33	13,95
200	694,38	74,09	10,24	13,53
Xilanase (U kg^{-1})				
0	725,84	73,12	10,63	14,39
1000	707,88	76,67	10,01	14,15
2000	691,26	73,87	10,21	12,68
EPM	83,79	13,52	1,80	2,33
CV (%)	11,78	17,84	17,75	16,69
Amilase	0,288	0,825	0,880	0,557
Xilanase	0,557	0,762	0,631	0,110
Amilase vs Xilanase	0,422	0,350	0,089	0,470
Dunnett Amilase	0,466	0,277	0,531	0,200
Dunnett Xilanase	0,674	0,388	0,483	0,059

CP – Controle Positivo - ração atendendo as exigências nutricionais, sem adição de enzimas exógenas. As dietas contendo enzimas tiveram valorização nutricional de 100 kcal e 6% de proteína e aminoácidos (lisina, met + cist, treonina e triptofano). Todas as dietas continham 500 U kg^{-1} de fitase. A valorização nutricional da fitase foi de 0,12% de cálcio e de fósforo. Os tratamentos contendo amilase e xilanase continham 2500 U kg^{-1} de protease. AV - altura de vilosidade. PC – profundidade de cripta. RVC – relação altura de vilosidades:profundidade de cripta. AA – área de absorção. CV (%): coeficiente de variação, EPM: erro padrão da média.

A mensuração de altura de vilosidade, profundidade de cripta e área de absorção são parâmetros que indicam a capacidade de absorção de nutrientes e a saúde intestinal dos frangos de corte, sendo quanto maior a relação AV:PC e a AA melhor a absorção e aproveitamento de nutrientes (ALQHTANI et al., 2022). De acordo com os resultados obtidos, a suplementação enzimática equiparou os parâmetros morfométricos em relação ao CP, indicando que a depreciação energética e proteica não afetou a morfometria do segmento jejuno dos frangos de corte aos 28 dias de idade.

Busclaw (2016), afirma que a necessidade de maior AV para aumentar a AA exige um crescimento epitelial mais rápido, exigindo mais energia e nutrientes para a proliferação celular. A maior necessidade de manutenção e renovação celular pode ocorrer quando há estressores, como aqueles advindos da dieta, tais como a maior demanda de nutrientes para digestão, toxinas, fatores antinutricionais e patógenos que causam lesões e descamação no epitélio intestinal (KOGUT et al., 2018). Altos níveis de proteína bruta e fatores antinutricionais, como PNAs, estão associados às lesões encontradas no epitélio intestinal de frangos de corte devido à baixa digestibilidade e fermentação excessiva no intestino desses animais.

Desse modo, Cardinal et al. (2019), afirmam que dietas com redução de PB sem a suplementação de protease ocasionam redução de desempenho dos frangos de corte devido ao desbalanço de aminoácidos, principalmente a treonina. Com a suplementação de protease é possível corrigir a relação dos aminoácidos devido à digestibilidade da proteína da dieta. Sendo assim, esses autores verificaram melhora na saúde intestinal e, conseqüentemente, o desempenho dos frangos de corte que foram alimentados com dietas com menor teor de PB e com inclusão de protease em comparação à dieta com redução de PB sem protease. Neste estudo, as dietas contendo enzimas tiveram redução de 6% de PB e aminoácidos e equipararam os resultados de morfometria ao CP. A suplementação de protease reduz a inclusão de ingredientes proteicos da formulação, como o farelo de soja, que pode conter fatores antinutricionais. Portanto, com essa redução, a quantidade de agressores na digesta é diminuída, ajudando na integridade do epitélio intestinal.

Além disso, é possível verificar que o tratamento utilizando 1000 U kg^{-1} de xilanase em relação ao grupo sem suplementação da enzima indica que na fase inicial a digestibilidade provavelmente foi melhorada. Dessa forma, possivelmente a ação da amilase e protease tenham atuado na digestibilidade dos ingredientes, reduzindo o substrato à fermentação por patógenos, mantendo a integridade intestinal semelhante ao CP, que possuía níveis adequados.

4.3 Avaliação *I See Inside* - ISI®

Observou-se interação entre os níveis de amilase e xilanase (Tabela 6) para os parâmetros de espessura de lâmina própria (ELP) ($P=0,009$), espessura epitelial (EE) ($P=0,020$), proliferação de enterócitos (PE) ($P=0,021$), infiltração inflamatória no epitélio (IIE) ($P=0,0001$), infiltração inflamatória na lâmina própria (IILP) ($P=0,022$) e no valor total de ISI ($P=0,014$).

Desdobrando os valores da interação (Tabela 7), observou-se que, de maneira geral, a ausência de xilanase com 100 U kg^{-1} de amilase proporcionou menor valor de ELP ($P=0,019$), IIE ($P=<0,0001$) e IILP ($P=<0,0001$) quando comparado ao grupo que recebeu 2000 U kg^{-1} de xilanase, com mesmo nível de amilase. Para o parâmetro de EE o nível de 1000 U kg^{-1} de xilanase na presença de 100 U kg^{-1} de amilase proporcionou menor valor ($P=0,021$) comparado ao grupo que não recebeu xilanase, no entanto, esse feito foi equiparado quando suplementado 200 U kg^{-1} de amilase ($P=0,002$). Ausência de xilanase e suplementação de 200 U kg^{-1} de amilase proporcionaram menor valor para PE ($P=0,034$). Avaliando os níveis de amilase dentro de cada nível de xilanase, a menor dose de amilase com 2000 U kg^{-1} de xilanase proporcionou menor ($P=0,002$) e maior valor ($P=0,001$) de EE e IILP, respectivamente. Em adição, as menores doses de suplementação de xilanase e amilase proporcionaram menor valor ($P=0,026$) de IIE.

Ao observar o parâmetro total de ISI (Figura 1), verificou-se que os menores valores ($P=0,009$) foram encontrados com as dosagens de 0 e 1000 U kg^{-1} de xilanase utilizando 100 U kg^{-1} de amilase. Comparando os níveis de inclusão de amilase dentro de cada nível de suplementação de xilanase, observou-se que o menor valor ($P=0,021$) para esse parâmetro foi encontrado com os maiores níveis de cada enzima (2000 U kg^{-1} de xilanase com 200 U kg^{-1} de amilase).

Considerando os efeitos isolados, a maior dose de amilase diminuiu o valor ($P=0,0001$) de PO (proliferação de oocistos). Com relação ao CP, a inclusão de 100 U kg^{-1} de amilase proporcionou maior valor de PO ($P=0,0001$). Independentemente dos níveis de amilase, foram encontrados maiores valores de ELP ($P=0,002$), EE ($P=0,0001$), CC ($P=0,001$) e valor total de ISI ($P=0,0002$). Os níveis de 1000 e 2000 U kg^{-1} de xilanase aumentaram os valores de ELP ($P=0,0001$) e IILP ($P=0,032$). A dose mais alta de xilanase aumentou o valor de PE ($P=0,010$) e de IIE ($P=0,0004$). Independentemente dos níveis de xilanase, foram encontrados maiores valores de EE ($P=0,0001$), CC ($P=0,001$), PO ($P=0,001$) e valor total de

ISI ($P=0,0001$). Menores valores de CONG (congestão) foram observados independentemente das dosagens de amilase ($P=0,001$) e xilanase ($P=0,004$) (Tabela 6).

Tabela 6: Avaliações histológicas pelo método *I See Inside* (ISI®) do segmento jejuno de frangos de corte, aos 28 dias de idade, alimentados com dietas contendo diferentes doses de amilase e xilanase.

Tratamentos	ELP	EE	PE	IIE	IILP	CC	CONG	PO	Total
CP	1,99	1,20	1,01	1,63	2,70	2,09	0,13	0,00	10,74
Amilase (U kg ⁻¹)									
100	2,24*	1,36*	1,05	1,62	2,90	2,33*	0,05*	0,71*	12,26*
200	2,24*	1,41*	1,05	1,67	2,81	2,34*	0,02*	0,06	11,59*
Xilanase (U kg ⁻¹)									
0	2,13	1,39*	1,02	1,60	2,70	2,35*	0,03*	0,31*	11,53*
1000	2,29*	1,32*	1,05	1,58	2,95*	2,29*	0,05*	0,25*	11,77*
2000	2,31*	1,44*	1,08**	1,74*	2,91*	2,38*	0,02*	0,60*	12,48*
EPM	0,02	0,01	0,01	0,01	0,03	0,02	0,01	0,04	0,09
Amilase	0,973	0,136	0,880	0,154	0,182	0,932	0,107	<0,0001	0,062
Xilanase	0,009	0,020	0,021	0,0001	0,018	0,341	0,389	0,302	0,014
Amilase vs Xilanase	0,009	0,020	0,021	0,0001	0,022	0,337	0,339	0,265	0,014
Dunn Amilase	0,002	0,0001	0,243	0,334	0,262	0,001	0,001	0,0001	0,0002
Dunn Xilanase	0,0001	0,0001	0,010	0,0004	0,032	0,001	0,004	0,001	0,0001

CP – Controle Positivo – ração atendendo as exigências nutricionais, sem adição de enzimas exógenas. As dietas contendo enzimas tiveram valorização nutricional de 100 kcal e 6% de proteína e aminoácidos (lisina, met + cist, treonina e triptofano). Todas as dietas continham 500 U kg⁻¹ de fitase. A valorização nutricional da fitase foi de 0,12% de cálcio e de fósforo. Os tratamentos contendo amilase e xilanase continham 2500 U kg⁻¹ de protease. ELP – espessura de lâmina própria. EE – espessura epitelial. PE – proliferação de enterócitos. IIE – infiltração inflamatória no epitélio. IILP – infiltração inflamatória na lâmina própria. CC – células caliciformes. CONG – congestão. PO – presença de oocistos. EPM: erro padrão da média. *Média diferente do controle positivo pelo teste de Dunn.

Tabela 7: Desdobramento da interação entre nível de amilase e de xilanase sobre os scores *I See Inside* no jejuno de frangos de corte, aos 28 dias de idade, alimentados com dietas contendo diferentes doses de amilase e xilanase.

Xilanase/ Amilase (U kg ⁻¹)	ELP			EE			PE			IIE			IILP			Total		
	100	200	P	100	200	P	100	200	P	100	200	P	100	200	P	100	200	P
0	2,10b	2,16	0,523	1,44a	1,34b	0,067	1,04	1,01b	0,281	1,56b	1,64	0,180	2,54bB	2,86A	0,031	11,59b	11,47	0,991
1000	2,26ab	2,31	0,556	1,29b	1,36b	0,202	1,04	1,06a	0,436	1,51bB	1,65A	0,026	3,01a	2,89	0,229	11,98b	11,56	0,380
2000	2,37a	2,26	0,266	1,34abB	1,53aA	0,002	1,08	1,08a	1,000	1,78a	1,71	0,189	3,13aA	2,69B	0,001	13,21aA	11,75B	0,021
P	0,019	0,186		0,021	0,002		0,255	0,034		<0,0001	0,4511		<0,0001	0,2839		0,009	0,587	

ELP – espessura de lâmina própria. EE – espessura epitelial. PE – proliferação de enterócitos. IIE – infiltração inflamatória no epitélio. IILP – infiltração inflamatória na lâmina própria. CC – células caliciformes. CONG – congestão. PO – presença de oocistos. Médias com letras distintas minúsculas na mesma coluna ou maiúscula na mesma linha indicam diferenças (P<0,05) pelo teste de Friedman.

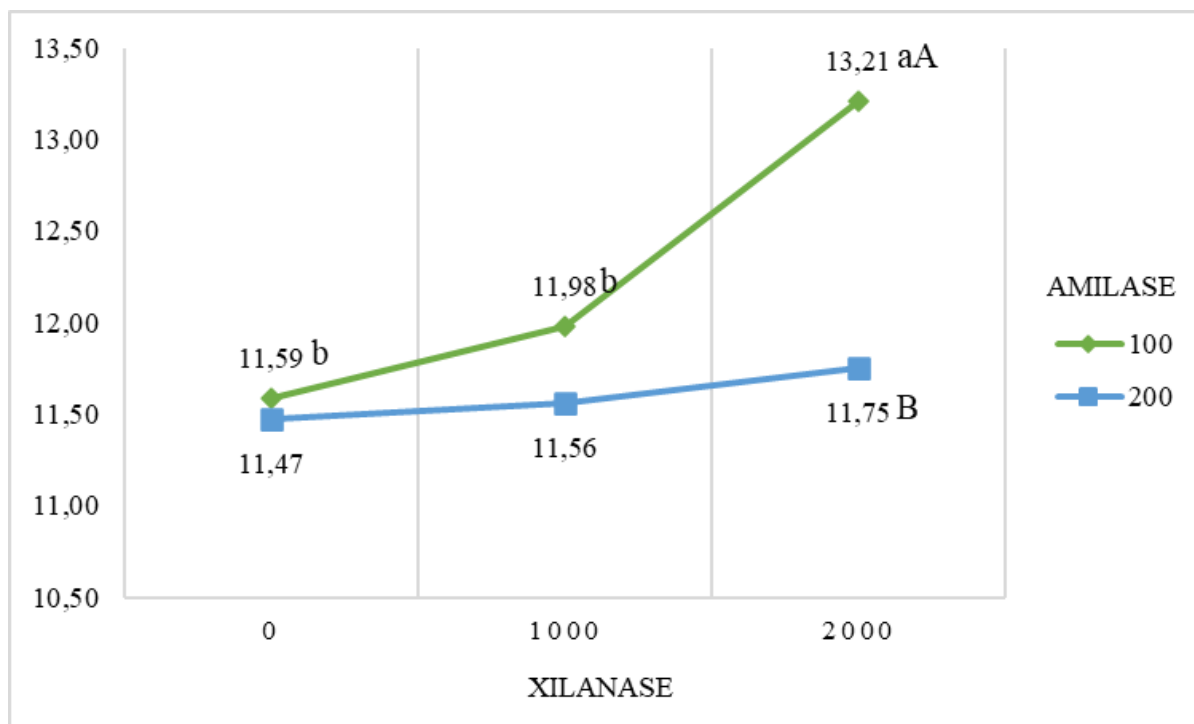


Figura 1: Desdobramento da interação entre nível de amilase e de xilanase sobre o score total *I See Inside*® no jejuno de frangos de corte, aos 28 dias de idade.

Menores índices dos parâmetros avaliados pela metodologia de *score* ISI são indicadores de melhor saúde intestinal. Agentes estressores provenientes da dieta podem alterar a mucosa intestinal e qualquer renovação tecidual, devido às agressões e descamação de epitélio podem aumentar as necessidades de nutrientes (PARSAIE et al., 2007), visto que a demanda por energia e nutrientes para a manutenção do intestino é maior do que para outros órgãos.

Abaixo da mucosa existe uma vasta superfície de células epiteliais do tipo absorptivas (CHOCT, 2009), e há indícios de que a maior espessura da lâmina própria e da mucosa está ligada à ação de estressores, sendo que ao reduzir essa espessura, os nutrientes podem ser transportados com mais facilidade, ajudando a manter a saúde intestinal (MILES et al., 2006; CARDINAL et al., 2019). Neste estudo, as variáveis ELP e EE foram maiores nos tratamentos contendo enzimas, indicando maior dificuldade no transporte e aproveitamento de nutrientes, refletindo em pior desempenho em relação ao CP.

De maneira geral, a atividade da amilase proporcionou melhores parâmetros, utilizando 100 U kg⁻¹, quando comparado a atividade de xilanase. No entanto, esse benefício não refletiu em melhor valor total de ISI bem como no desempenho dos animais quando comparado ao CP.

Embora tenham sido encontradas melhoras sobre alguns parâmetros de *score* ISI considerando a interação entre amilase e xilanase, avaliando os parâmetros de maneira isolada observou-se que, de uma forma geral, os menores *scores* foram encontrados nos animais que receberam o CP, indicando que a suplementação enzimática não equiparou aos valores desse tratamento.

4.4 Ácidos graxos de cadeia curta

Não houve interação, bem como efeito isolado para os parâmetros analisados ($P > 0,05$), demonstrando que a concentração dos ácidos acético, butírico e isovalérico (Tabela 8) foram semelhantes entre os tratamentos.

Tabela 8: Concentração de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) no conteúdo cecal de frangos de corte, aos 28 dias de idade, alimentados com dietas contendo diferentes doses de amilase e xilanase.

Tratamentos	Acético	Butírico	Isovalérico
	mmol kg ⁻¹		
CP	29,85	5,13	2,31
Amilase (U kg ⁻¹)			
100	32,38	5,52	2,54
200	29,82	4,43	2,50
Xilanase (U kg ⁻¹)			
0	29,57	4,86	2,59
1000	30,30	5,21	2,59
2000	33,43	4,83	2,43
EPM	8,03	1,80	0,57
CV (%)	25,97	35,63	22,92
Amilase	0,288	0,102	0,817
Xilanase	0,382	0,863	0,801
Amilase vs Xilanase	0,230	0,219	0,358
Dunnett Amilase	0,548	0,183	0,589
Dunnett Xilanase	0,586	0,875	0,663

CP – Controle Positivo - ração atendendo as exigências nutricionais, sem adição de enzimas exógenas. As dietas contendo enzimas tiveram valorização nutricional de 100 kcal e 6% de proteína e aminoácidos (lisina, met + cist, treonina e triptofano). Todas as dietas continham 500 U kg⁻¹ de fitase. A valorização nutricional da fitase foi de 0,12% de cálcio e de fósforo. Os tratamentos contendo amilase e xilanase continham 2500 U kg⁻¹ de protease. CV (%): coeficiente de variação, EPM: erro padrão da média. Os ácidos isobutírico, propanoico e valérico não foram considerados por estarem abaixo do limite de quantificação.

Os dados obtidos neste estudo mostram que não houve diferença entre as concentrações de AGCCs entre os tratamentos contendo enzimas e o CP. A suplementação de xilanase contribui com a liberação de nutrientes por meio da hidrólise da parede celular dos cereais, degradando as unidades de xilose e liberando xilooligossacarídeos (XOs). A formação de AGCCs depende da quantidade de substrato contido nos ingredientes, sendo que a quantidade de PNAs varia entre os diferentes cereais e podem variar entre eles (WARDI, 2021). De acordo com o estudo de Simic et al. (2023), ao avaliarem rações com e sem farelo de trigo, verificaram que as concentrações de AGCCs (ácido valérico e propiônico) no conteúdo cecal dos frangos de corte aos 35 dias de idade alimentados com a ração contendo trigo aumentaram em relação aos animais alimentados com a ração sem inclusão do ingrediente.

As rações experimentais deste estudo continham alta proporção de ingredientes compostos por altos teores de PNAs solúveis. Sendo assim, os resultados possibilitam inferir

que a quantidade de substrato (arabinosilanos) presente nas rações foram similares, e que não foram influenciadas pela ação da enzima xilanase.

Os resultados encontrados de AGCCs corroboram com os obtidos na morfometria, o qual não houve diferença entre os parâmetros avaliados. Os XOs possuem efeitos positivos no hospedeiro, pois agem como substrato prebiótico ou como moléculas sinalizadoras para grupos específicos de bactérias que produzem AGCCs, como o ácido butírico, que atua como principal fonte de energia para os colonócitos e ajuda a manter a integridade das células epiteliais intestinais, podendo melhorar a relação AV:PC (LOPETUSO et al., 2013). Neste estudo, não foi observado maior produção de ácido butírico ou de outros ácidos graxos voláteis, portanto, não houve maiores estímulos para aumentar a relação AV:PC e AA proporcionada pelos AGCCs.

Os ácidos isobutírico, propanoico e valérico ficaram abaixo do limite de quantificação na análise, indicando que essas substâncias são rapidamente absorvidas e aproveitadas pelo organismo. Além disso, o fluxo da digesta pelo trato intestinal é dinâmico e o peristaltismo reverso existente em frangos pode resultar em variabilidade nas concentrações locais dos diferentes AGCCs, dificultando sua quantificação (GONZÁLEZ-ORTIZ et al., 2020). Portanto, uma possível explicação para a variabilidade nas medições de AGCCs poderia estar atribuída às suas concentrações voláteis, que dependem das taxas de produção e absorção no momento exato da medição (SIMIC et al., 2023).

4.5 Concentração de citocinas

Não houve interação, bem como efeito isolado ($P > 0,05$) para a concentração de citocinas (Tabela 9) analisadas.

Tabela 9: Concentração de interleucinas de frangos de corte, aos 28 dias de idade, alimentados com dietas contendo diferentes doses de amilase e xilanase.

Tratamentos	IL-6	IL-10	IL-16
	pg mL ⁻¹		
CP	54,32	21,14	150,55
Amilase (U kg ⁻¹)			
100	41,81	20,62	146,93
200	41,95	19,95	148,65
Xilanase (U kg ⁻¹)			
0	40,16	23,27	150,85
1000	45,85	17,44	147,77
2000	39,69	19,71	144,18
EPM	8,19	8,57	8,76
CV (%)	5,53	42,03	5,92
Amilase	0,967	0,851	0,601
Xilanase	0,468	0,220	0,111
Amilase vs Xilanase	0,350	0,596	0,084
Dunnnett Amilase	0,617	0,943	0,641
Dunnnett Xilanase	0,288	0,345	0,227

CP – Controle Positivo - ração atendendo as exigências nutricionais, sem adição de enzimas exógenas. As dietas contendo enzimas tiveram valorização nutricional de 100 kcal e 6% de proteína e aminoácidos (lisina, met + cist, treonina e triptofano). Todas as dietas continham 500 U kg⁻¹ de fitase. A valorização nutricional da fitase foi de 0,12% de cálcio e de fósforo. Os tratamentos contendo amilase e xilanase continham 2500 U kg⁻¹ de protease. IL-6 – interleucina 6. IL-10 – interleucina 10. IL-16 – interleucina 16. CV (%): coeficiente de variação, EPM: erro padrão da média.

As interleucinas IL-6 e IL-16 são citocinas que possuem características pró-inflamatórias (SALEH; AL-ZGHOUL, 2019) e, por outro lado, a IL-10 é uma citocina reguladora que suprime tais citocinas (HE; GENOVESE; KOGUT, 2011). Dessa forma, menor estado inflamatório leva a menores concentrações séricas de IL-6 e IL-16 e, por consequência, menor concentração sérica de IL-10, o qual o organismo não necessita desviar nutrientes para a produção de uma interleucina supressiva e utilizá-los de forma mais produtiva (LU et al., 2014).

Segundo Cardinal et al. (2019), o excesso de nutrientes no lúmen intestinal pode ocasionar uma fermentação excessiva e aumentar a incidência de patogenias, como a enterite necrótica, ocasionando modificações no epitélio e desencadeando reações inflamatórias. A demanda de energia e proteína para realizar a manutenção do epitélio intestinal é maior do que a

de outros órgãos, o que pode aumentar o requerimento de nutrientes de manutenção e assim diminuir a eficiência do animal (PARSEI et al., 2007).

Neste estudo, não foi encontrado diferença entre as interleucinas IL-6, IL-10 e IL-16, demonstrando que a concentração foi semelhante entre os tratamentos contendo enzimas e o CP, supondo que o quadro inflamatório foi semelhante entre os diferentes grupos de animais. Dessa forma, é possível verificar que mesmo que os resultados de desempenho e ISI dos tratamentos contendo enzimas tenham sido inferiores comparado ao CP, não desencadearam um quadro inflamatório.

Esses resultados inferem que a interferência de PNAs contidos na ração não foi suficiente para desencadear um quadro inflamatório. Segundo Nguyen et al (2021), a quantidade de fatores antinutricionais nos grãos é variável e depende de fatores como o cultivar, variações climáticas e processos pós-colheita, e essas variações proporcionam resultados diferentes entre os estudos. Ainda, os resultados obtidos na morfometria do jejuno indicam que possivelmente a quantidade de PNAs na dieta não foi o suficiente para causar lesões no epitélio, mantendo os parâmetros morfométricos e inflamatórios semelhantes entre os tratamentos.

4.6 Análise econômica

Para análise econômica (Tabela 10), não foi observado interação ($P > 0,05$) entre a suplementação de amilase e xilanase. Considerando os efeitos isolados, houve diferença nos valores de amilase ($P = 0,025$) e de xilanase ($P = 0,030$) comparando com o CP, independentemente das dosagens das enzimas.

Tabela 10: Custo alimentar por tonelada de frangos produzidos alimentados com dietas contendo diferentes doses de amilase e xilanase aos 28 dias de idade.

Tratamentos	Custo alimentar R\$/t frango
CP	3148,64
Amilase (U kg ⁻¹)	
100	3069,65*
200	3053,59*
Xilanase (U kg ⁻¹)	
0	3069,65*
1000	3029,84*
2000	3036,72*
EPM	77,89
CV (%)	2,55
Amilase	0,581
Xilanase	0,463
Amilase vs Xilanase	0,512
Dunnnett Amilase	0,025
Dunnnett Xilanase	0,030

CP – Controle Positivo - ração atendendo as exigências nutricionais, sem adição de enzimas exógenas. As dietas contendo enzimas tiveram valorização nutricional de 100 kcal e 6% de proteína e aminoácidos (lisina, met + cist, treonina e triptofano). Todas as dietas continham 500 U kg⁻¹ de fitase. A valorização nutricional da fitase foi de 0,12% de cálcio e de fósforo. Os tratamentos contendo amilase e xilanase continham 2500 U kg⁻¹ de protease. CV (%): coeficiente de variação, EPM: erro padrão da média. *Média diferente do controle positivo pelo teste de Dunnett. O custo alimentar por tonelada de frango foi calculado pelo custo da ração baseado nos preços dos ingredientes referentes ao mês de março de 2022.

A adição de enzimas nas rações de frangos de corte visa principalmente a redução de custo da dieta por meio da contribuição de nutrientes que a enzima pode liberar, mantendo o requerimento nutricional exigido pelo animal em suas respectivas fases de vida (PASQUALI et al., 2017). Portanto, do ponto de vista econômico, a suplementação enzimática, considerando a depreciação de energia e aminoácidos do presente estudo pode ser viável economicamente, pois as inclusões de 100 e 200 U kg⁻¹ de amilase reduzem R\$79,00 e R\$95,00, respectivamente, por tonelada de frango produzido, representando redução de 2,51% e 3,10%, em relação ao CP. Com as inclusões de 1000 e 2000 U kg⁻¹ de xilanase, as reduções são mais expressivas, reduzindo R\$119,00 e R\$112,00, respectivamente, por tonelada de frango produzido, representando redução de 3,77% e 3,55%, respectivamente, em relação ao CP.

Embora a suplementação enzimática não tenha proporcionado melhor desempenho zootécnico nas fases inicial e de crescimento, é possível verificar que a inclusão das enzimas amilase e xilanase são viáveis economicamente para a produção de frangos de corte pois,

embora a tonelada de frango produzido tenha sido inferior, com valorização nutricional de 100 kcal de energia e 6% de proteínas e aminoácidos propostas obtiveram menor custo de produção.

5 CONCLUSÕES

A inclusão de amilase e xilanase em dietas de frangos de corte com redução de energia e proteína obtiveram resultados semelhantes do grupo controle positivo e não alteraram os parâmetros morfométricos e imunológicos das aves aos 28 dias de idade. Em relação à viabilidade econômica, a análise do custo alimentar sugere que a utilização de amilase e xilanase possibilita redução média de 3,30% do custo de produção por tonelada dos frangos de corte.

6 REFERÊNCIAS

- ABDOLLAHI, M. R.; RAVINDRAN, V.; WESTER, T.J. et al. Influence of conditioning temperature on performance, apparent metabolisable energy, ileal digestibility of starch and nitrogen and the quality of pellets, in broiler starters fed maize-and sorghum-based diets. **Animal Feed Science and Technology**, v.162, n.3-4, p.106-115, 2010.
- ABDOLLAHI, M. R.; RAVINDRAN, V.; WESTER, T.J. et al. Influence of feed form and conditioning temperature on performance, apparent metabolisable energy and ileal digestibility of starch and nitrogen in broiler starters fed wheat-based diet. **Animal Feed Science and Technology**, v.168, n.1-2, p.88-99, 2011.
- ABU, M. H.; ALABI, O. J.; JIYA, E. Z. Pellet Versus Mash: Assessing the Impact of Feed Forms on Growth Performance, Nutrient Digestibility, Carcass Characteristics and Health of Broiler Chickens – A Review. **Nigerian Journal of Animal Science and Technology**, v.6, n.1, p.52-64, 2023.
- ADEOLA, O.; COWIESON, A.J. Board-invited review: opportunities and challenges in using exogenous enzymes to improve nonruminant animal production. **Journal of Animal Science**, v.89, n.10, p.3189-3218, 2011.
- ADERIBIGBE, A.; COWIESON, A.; SORBARA, J.O. et al. Intestinal starch and energy digestibility in broiler chickens fed diets supplemented with α -amylase. **Poultry Science**, v.99, n.11, p.5907-5914, 2020.
- AHSAN, U.; CENGİZ, Ö.; RAZA, I. et al. Sodium butyrate in chicken nutrition: the dynamics of performance, gut microbiota, gut morphology, and immunity. **World's Poultry Science Journal**, v.72, n.2, p.265-275, 2016.
- AFTAB, U.; BEDFORD, M.R. The use of NSP enzymes in poultry nutrition: myths and realities. **World's Poultry Science Journal**, v.74, n.2, p.277-286, 2018.
- ALAGAWANY, M.; ELNESR, Sh.S.; FARAG, M.R. The role of exogenous enzymes in promoting growth and improving nutrient digestibility in poultry. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v.19, n.3, p.157, 2018.
- ALQHTANI, A.H.; AL SULAIMAN, A.R.; ALHARTHI, A.S. et al. Effect of Exogenous Enzymes Cocktail on Performance, Carcass Traits, Biochemical Metabolites, Intestinal Morphology, and Nutrient Digestibility of Broilers Fed Normal and Low-Energy Corn–Soybean Diets. **Animals**, v.12, n.9, p.1094, 2022.
- AMATI, L.; CIRIMELE, D.; PUGLIESE, V. et al. Nutrition and immunity: laboratory and clinical aspects. **Current Pharmaceutical Design**, v.9, n.24, p.1924-1931, 2003.
- AMERAH, A.M.; ROMERO, L.F.; AWATI, A. et al. Effect of exogenous xylanase, amylase, and protease as single or combined activities on nutrient digestibility and growth performance of broilers fed corn/soy diets. **Poultry Science**, v.96, n.4, p.807-816, 2017.

- APAJALAHTI, J.; VIENOLA, K. Interaction between chicken intestinal microbiota and protein digestion. **Animal Feed Science and Technology**, v.221, p.323-330, 2016.
- AWAD, W.A.; HESS, C.; HESS, M. Enteric pathogens and their toxin-induced disruption of the intestinal barrier through alteration of tight junctions in chickens. **Toxins**, v.9, n.2, p.60, 2017.
- BAKER, J.T.; DUARTE, M.E.; HOLANDA, D.M. et al. Friend or foe? Impacts of dietary xylans, xylooligosaccharides, and xylanases on intestinal health and growth performance of monogastric animals. **Animals**, v.11, n.3, p.609, 2021.
- BARBOSA, N.A.A.; BONATO, M.A.; SAKOMURA, N.K. et al. Digestibilidade ileal de frangos de corte alimentados com dietas suplementadas com enzimas exógenas. **Comunicata Scientiae**, v.5, n.4, p.361-369, 2014.
- BEDFORD, M.R. The evolution and application of enzymes in the animal feed industry: the role of data interpretation. **British Poultry Science**, v.59, n.5, p.486-493, 2018.
- BEDFORD, M.R.; SCHULZE, H. Exogenous enzymes for pigs and poultry. **Nutrition Research Reviews**, v.11, n.1, p.91-114, 1998.
- BELLAVER, C; FIALHO, E.L.T; PROTAS, J.F.S. et al. Radícula de malte na alimentação de suínos em crescimento e terminação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.20, n.8, p.969-974, 1985.
- BELOTE, B.L.; SOARES, I.; TUJIMOTO-SILVA, A. et al. Applying I see inside histological methodology to evaluate gut health in broilers challenged with Eimeria. **Veterinary Parasitology**, v.276, p.100004, 2019.
- BELOTE, B.L.; TUJIMOTO-SILVA, A.; HÜMMELGEN, P.H. et al. Histological parameters to evaluate intestinal health on broilers challenged with Eimeria and Clostridium perfringens with or without enramycin as growth promoter. **Poultry Science**, v.97, n.7, p.2287-2294, 2018.
- BROCH, J.; NUNES, R.V.; DA SILVA, I.M. et al. Carboidrases e coproduto da mandioca na alimentação de frangos de corte: revisão. **Agropecuária Catarinense**, v.31, n.2, p.82-86, 2018.
- BUCLAW, M. The use of inulin in poultry feeding: a review. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v.100, n.6, p.1015-1022, 2016.
- CHOCT, M. Managing gut health through nutrition. **British Poultry Science**, v.50, n.1, p.9-15, 2009.
- CARDINAL, K.M.; MORAES, M.L.D.; ANDRETTA, I. et al. Growth performance and intestinal health of broilers fed a standard or low-protein diet with the addition of a protease. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.48, p.1-11, 2019.
- CÓRDOVA-NOBOA, H. A.; OVIEDO-RONDÓN, E.O.; ORTIZ, A. et al. Corn drying temperature, particle size, and amylase supplementation influence growth performance,

- digestive tract development, and nutrient utilization of broilers. **Poultry Science**, v.99, n.11, p.5681-5696, 2020.
- COURTIN, C.M.; BROEKAERT, W.F.; SWENNEN, K. et al. Dietary inclusion of wheat bran arabinoxyloligosaccharides induces beneficial nutritional effects in chickens. **Cereal Chemistry**, v.85, n.5, p.607-613, 2008.
- COWIESON, A. J.; ADEOLA, O. Carbohydrases, protease, and phytase have an additive beneficial effect in nutritionally marginal diets for broiler chicks. **Poultry Science**, v.84, n.12, p.1860-1867, 2005.
- COWIESON, A.J.; BEDFORD, M.R.; RAVINDRAN, V. Interactions between xylanase and glucanase in maize-soy-based diets for broilers. **British Poultry Science**, v.51, n.2, p.246-257, 2010.
- COWIESON, A.J.; KLUENTER, A.M. Contribution of exogenous enzymes to potentiate the removal of antibiotic growth promoters in poultry production. **Animal Feed Science and Technology**, v.250, p.81-92, 2019.
- COWIESON, A.J.; MASEY O'NEILL, H.V. Effects of exogenous xylanase on performance, nutrient digestibility and caecal thermal profiles of broilers given wheat-based diets. **British Poultry Science**, v.54, n.3, p.346-354, 2013.
- COWIESON, A.J.; VIEIRA, S.L.; STEFANELLO, C. Exogenous microbial amylase in the diets of poultry: what do we know? **Journal of Applied Poultry Research**, v.28, n.3, p.556-565, 2019.
- CRAIG, A.D.; KHATTAK, F.; HASTIE, P. et al. Xylanase and xylo-oligosaccharide prebiotic improve the growth performance and concentration of potentially prebiotic oligosaccharides in the ileum of broiler chickens. **British Poultry Science**, v.61, n.1, p.70-78, 2020.
- CROOM, W.J.; BRAKE, J.; COLES, B.A. et al. Is intestinal absorption capacity rate-limiting for performance in poultry? **Journal of Applied Poultry Research**, v.8, n.2, p.242-252, 1999.
- DAL PONT, G.C.; BELOTE, B.L.; LEE, A. et al. Novel models for chronic intestinal inflammation in chickens: intestinal inflammation pattern and biomarkers. **Frontiers in Immunology**, v.12, p.676-628, 2021.
- DAL PONT, G.C.; FARNELL, M.; FARNELL, Y. et al. Dietary factors as triggers of low-grade chronic intestinal inflammation in poultry. **Microorganisms**, v.8, n.1, p.139, 2020.
- DE BRITO, M. S.; DE OLIVEIRA, C.F.S.; DA SILVA, T.R.G. et al. Polissacarídeos não amiláceos na nutrição de monogástricos–revisão. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.2, n.4, p.111-117, 2008.
- DELMASCHIO, I. Enzimas na alimentação de animais monogástricos-revisão de literatura. **Revista Científica de Medicina Veterinária-UNORP**, v.2, n.1, p.06-20, 2018.

- DEL VALLE, T.A.; ZENATTI, T.F.; ANTONIO, G et al. Effect of chitosan on the preservation quality of sugarcane silage. **Grass and Forage Science**, v.73, n.3, p.630-638, 2018.
- DIANA, T.F.; ALBINO, L.F.T.; ROSTAGNO, H.S. et al. Xylanase and B-glucanase in maize-and soybean meal-based diets for broilers. **Semina: Ciências Agrárias**, v.41, p.3259-3274, 2020.
- FERNANDES, J.I.M.; CONTINI, J.P.; PROKOSKI, K. et al. Desempenho produtivo de frangos de corte e utilização de energia e nutrientes de dietas iniciais com milho classificado ou não e suplementadas com complexo enzimático. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.69, p.181-190, 2017.
- FILHO, J.A.B.; OLIVEIRA, J.P.F.; BOAS, A.D.C.V. et al. Características produtivas e qualitativas de frangos de corte alimentados com diferentes complexos enzimáticos. **Boletim de Indústria Animal**, v.75, p.1-9, 2018.
- FORTES, B.D.A.; CAFE, M.B.; STRINGHINI, J.H. et al. Avaliação de programas nutricionais com a utilização de carboidrases e fitase em rações de frangos de corte. **Ciência Animal Brasileira**, v.13, n.1, p.24-32, 2012.
- GAO, F.; JIANG, Y.; ZHOU, G.H. et al. The effects of xylanase supplementation on growth, digestion, circulating hormone and metabolite levels, immunity and gut microflora in cockerels fed on wheat-based diets. **British Poultry Science**, v.48, n.4, p.480-488, 2007.
- GIACOBBO, F.C.; EYNG, C.; NUNES, R.V. et al. Different enzymatic associations in diets of broiler chickens formulated with corn dried at various temperatures. **Poultry Science**, v.100, n.5, p.101013, 2021.
- GONZÁLEZ-ORTIZ, G.; OLUKOSI, O.; BEDFORD, M.R. Evaluation of the effect of different wheats and xylanase supplementation on performance, nutrient and energy utilisation in broiler chicks. **Animal Nutrition**, v.2, n.3, p.173-179, 2016.
- GRACIA, M.I.; ARANIBAR, M.; LAZARO, R. et al. Alpha-amylase supplementation of broiler diets based on corn. **Poultry Science**, v.82, n.3, p.436-442, 2003.
- HASHEMI, M.; SEIDAVI, A.; JAVANDEL, F. et al. Influence of non-starch polysaccharide-degrading enzymes on growth performance, blood parameters, and carcass quality of broilers fed corn or wheat/barley-based diets. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v.30, n.4, p.286-298, 2017.
- HE, H.; GENOVESE, K.J.; KOGUT, M.H. Modulation of chicken macrophage effector function by TH1/TH2 cytokines. **Cytokine**, v.53, n.3, p.363-369, 2011.
- HERWIG, E.; ABBOTT, D.; SCHWEAN-LARDNER, K.V. et al. Effect of rate and extent of starch digestion on broiler chicken performance. **Poultry Science**, v.98, n.9, p.3676-3684, 2019.
- HUMAM, A.M.; LOH, T.C.; FOO, H.L. et al. Supplementation of postbiotic RI11 improves antioxidant enzyme activity, upregulated gut barrier genes, and reduced cytokine, acute

- phase protein, and heat shock protein 70 gene expression levels in heat-stressed broilers. **Poultry Science**, v.100, n.3, p.100908, 2021.
- JHA, R.; MISHRA, P. Dietary fiber in poultry nutrition and their effects on nutrient utilization, performance, gut health, and on the environment: a review. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v.12, p.1-16, 2021.
- JIN, S-H.; CORLESS, A.; SELL, J.L. Digestive system development in post-hatch poultry. **World's Poultry Science Journal**, v.54, n.4, p.335-345, 1998.
- JÓZEFIK, D.; RUTKOWSKI, A.; JENSEN, B.B. et al. Effects of dietary inclusion of triticale, rye and wheat and xylanase supplementation on growth performance of broiler chickens and fermentation in the gastrointestinal tract. **Animal Feed Science and Technology**, v.132, n.1-2, p.79-93, 2007.
- KIARIE, E.; ROMERO, L.F.; NYACHOTI, C.M. The role of added feed enzymes in promoting gut health in swine and poultry. **Nutrition Research Reviews**, v.26, n.1, p.71-88, 2013.
- KIARIE, E.; ROMERO, L.F.; RAVINDRAN, V.J.P.S. Growth performance, nutrient utilization, and digesta characteristics in broiler chickens fed corn or wheat diets without or with supplemental xylanase. **Poultry Science**, v.93, n.5, p.1186-1196, 2014.
- KISIELINSKI, K.; WILLIS, S.; PRESCHER, A. et al. A simple new method to calculate small intestine absorptive surface in the rat. **Clinical and Experimental Medicine**, v.2, p.131-135, 2002.
- KRAIESKI, A.L.; HAYASHI, R.M.; SANCHES, A. et al. Effect of aflatoxin experimental ingestion and Eimeria vaccine challenges on intestinal histopathology and immune cellular dynamic of broilers: applying an Intestinal Health Index. **Poultry Science**, v.96, n.5, p.1078-1087, 2017.
- KIM, E.; MORGAN, N.K.; MOSS, A.F. et al. The flow of non-starch polysaccharides along the gastrointestinal tract of broiler chickens fed either a wheat- or maize-based diet. **Animal Nutrition**, v. 9, p. 138-142, 2022a.
- KIM, E.; MOSS, A.F.; MORGAN, N.K. et al. Ileal profile of non-starch polysaccharides and oligosaccharides in response to exogenous enzymes in broiler chickens offered wheat-or maize-based diets under subclinical necrotic enteritis challenge. **Animal Nutrition**, v.10, p.207-215, 2022b.
- KNUDSEN, K.E.B. Fiber and nonstarch polysaccharide content and variation in common crops used in broiler diets. **Poultry Science**, v.93, n.9, p.2380-2393, 2014.
- KOGUT, M.H. The effect of microbiome modulation on the intestinal health of poultry. **Animal Feed Science and Technology**, v.250, p.32-40, 2019.
- KOGUT, M.H.; GENOVESE, K.J.; SWAGGERTY, C.L. et al. Inflammatory phenotypes in the intestine of poultry: not all inflammation is created equal. **Poultry Science**, v.97, n.7, p.2339-2346, 2018.

- JACOB, J.P.; PESCATORE, A.J. Using barley in poultry diets—A review. **Journal of Applied Poultry Research**, v.21, n.4, p.915-940, 2012.
- JOHNSON, N.C.; OGBAMGBA, V.M.; MBACHIANTIM, J.T. Fiber, Phytic Acid and Enzymology in Non-Ruminants' Productivity with Conventional Feedstuffs. **European Journal of Science, Innovation and Technology**, v.2, n.1, p.54-57, 2022.
- LATHAM, R.E.; WILLIAMS, M.P.; FLORES, C. et al. Impact of variable corn nutrient content, AME prediction, and xylanase inclusion on growth performance. **Journal of Applied Poultry Research**, v.25, n.3, p.338-351, 2016.
- LEE, S.A.; WISEMAN, J.; MASEY O'NEILL, H.V. et al. Understanding the direct and indirect mechanisms of xylanase action on starch digestion in broilers. **Journal of World's Poultry Research**, v.7, n.2, p.35-47, 2017.
- LIN, Y.; OLUKOSI, O.A. Qualitative and quantitative profiles of jejunal oligosaccharides and cecal short-chain fatty acids in broiler chickens receiving different dietary levels of fiber, protein and exogenous enzymes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.101, n.12, p.5190-5201, 2021.
- LIU, W.C.; KIM, I.H. Effects of dietary xylanase supplementation on performance and functional digestive parameters in broilers fed wheat-based diets. **Poultry Science**, v.96, n.3, p.566-573, 2017.
- LIU, H.; SORBARA, J.O.B.; COWIESON, A.J.; ROMERO L.F. et al. Exogenous α -amylase supplementation reduces the variability of ileal digestible energy in broiler chickens fed complete diets with maize batches of variable protein solubility. **Animal Feed Science and Technology**, v.268, p.114610, 2020.
- LU, H.; ADEDOKUN, S.A.; ADEOLA, L. et al. Anti-inflammatory effects of non-antibiotic alternatives in coccidia challenged broiler chickens. **The Journal of Poultry Science**, v.51, n.1, p.14-21, 2014.
- LUNA, L.G. Manual of histologic staining methods of the armed forces. Institute of pathology. 3.ed. New York: Mc Graw-Hill, 1968, 285p.
- MACAMBIRA, G.M.; RABELLO, C.B.V.; DA COSTA LOPES, C. et al. Carboidratos exógenos e a saúde intestinal de aves. **Research, Society and Development**, v.10, n.7, p.e48910716774-e48910716774, 2021.
- MACARI, M; MAIORKA, A. **Fisiologia das aves comerciais**, 1.ed. Jaboticabal, Brasil: Funep, 2017.
- MASEY O'NEILL, H.V.; SMITH, J.A.; BEDFORD, M.R. Multicarbohidrase enzymes for non-ruminants. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v.27, n.2, p.290-301, 2014.

- MASSUQUETTO, A.; PANISSON, J.C.; MARX, F.O. et al. Effect of pelleting and different feeding programs on growth performance, carcass yield, and nutrient digestibility in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 98, n. 11, p.5497-5503, 2019.
- MASSUQUETTO, A.; DURAU, J.F.; BARRILLI, L.N.E. et al. Thermal processing of corn and physical form of broiler diets. **Poultry Science**, v.99, n.6, p.3188-3195, 2020.
- MENDIS, M.; LECLERC, E.; SIMSEK, S. Arabinoxylans, gut microbiota and immunity. **Carbohydrate Polymers**, v.139, p.159-166, 2016.
- MONTAGNE, L.; PLUSKE, J.R.; HAMPSON, D.J. A review of interactions between dietary fibre and the intestinal mucosa, and their consequences on digestive health in young non-ruminant animals. **Animal Feed Science and Technology**, v.108, n.1-4, p.95-117, 2003.
- MORGAN, N.K.; WALLACE, A.; BEDFORD, M.R. et al. Efficiency of xylanases from families 10 and 11 in production of xylo-oligosaccharides from wheat arabinoxylans. **Carbohydrate Polymers**, v.167, p.290-296, 2017.
- NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**, 6.ed. Artmed Editora, 2014.
- NGUYEN, H.T.; BEDFORD, M.R.; MORGAN, N.K. Importance of considering non-starch polysaccharide content of poultry diets. **World's Poultry Science Journal**, v.77, n.3, p.619-637, 2021.
- NGUYEN, T.N.D.; LÊ, H.N.; PHẠM, V.V. et al. Relationship between the ratio of villous height: crypt depth and gut bacteria counts as well production parameters in broiler chickens. **Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển**, v.20, n.3, p.1-10, 2021.
- OLKOWSKI, A.A.; WOJNAROWICZ, C.; CHIRINO-TREJO, M. et al. Responses of broiler chickens orally challenged with *Clostridium perfringens* isolated from field cases of necrotic enteritis. **Research in Veterinary Science**, v.81, n.1, p.99-108, 2006.
- PASQUALI, G.A.M.; OLIVEIRA, R.F.D.; AIELLO, P.A.B. et al. Performance and economic viability of broiler chicken fed diets with multienzyme complexes. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v.39, p.91-96, 2017.
- POLANSKY, O.; SEKELOVA, Z.; FALDYNOVA, M. et al. Important metabolic pathways and biological processes expressed by chicken cecal microbiota. **Applied and Environmental Microbiology**, v.82, n.5, p.1569-1576, 2016.
- PUCCI, L.E.A.; RODRIGUES, P.B.; DE FREITAS, R.T.F. et al. Efeito do processamento, suplementação enzimática e nível nutricional da ração para frangos de corte no período de 22 a 42 dias de idade. **Ciência e Agrotecnologia**, v.34, n.6, p.1557-1565, 2010.
- RAZA, A.; BASHIR, S.; TABASSUM, R. An update on carbohydrases: growth performance and intestinal health of poultry. **Heliyon**, v.5, n.4, p.e01437, 2019.

- ROBERTS, T.; WILSON, J.; GUTHRIE, A. et al. New issues and science in broiler chicken intestinal health: Emerging technology and alternative interventions. **Journal of Applied Poultry Research**, v.24, n.2, p.257-266, 2015.
- ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; HANNAS, M.I. et al. In: **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**, 4.ed. Viçosa: Departamento de Zootecnia, UFV, 2017. p.488.
- RUFINO, J.P.F.; CRUZ, F.G.G.; DE OLIVEIRA FILHO, P.A. et al. Fibra alimentar em dietas para aves—uma revisão. **Revista Científica de Avicultura e Suinocultura**, v.3, n.2, p.033-042, 2017.
- SAKOMURA, V.K.; DA SILVA, J.H.V.; COSTA, F.G.P.; et al. In: **Nutrição de Não Ruminantes**, 1.ed. Jaboticabal, Brasil: Funep, 2014. p.678.
- SAKOMURA, N.K.; ROSTAGNO, H.S. **Métodos de Pesquisa em Nutrição de Monogástricos**, 2.ed. Jaboticabal, Brasil: Funep, 2016. p.262.
- SALEH, K.M.M; AL-ZGHOUL, M.B. Effect of acute heat stress on the mRNA levels of cytokines in broiler chickens subjected to embryonic thermal manipulation. **Animals**, v.9, n.8, p.499, 2019.
- SANCHES, A.W.; BELOTE, B.L.; HÜMMELGEN, P. et al. Basal and infectious enteritis in broilers under the I See Inside methodology: A chronological evaluation. **Frontiers in Veterinary Science**, v.6, p.512, 2020.
- SANGALLI, G.G.; EYNG, C.; SPINDOLA, M.; NUNES, R.V.; BROCH, J.; LENHARDT SAVARIS, V.D.; JR ROHLOFF, N.; KÖHLER, T.L. Performance, bone characteristics, and physiological parameters of broilers fed nutrient-restricted diets supplemented with multicarbohydase complex associated with high levels of phytase. **Journal of Applied Poultry Research**, v.30, n.2, p.100141, 2021.
- SCHRAMM, V. G.; MASSUQUETTO, A.; BASSI, L.S. et al. Exogenous α -amylase improves the digestibility of corn and corn–soybean meal diets for broilers. **Poultry Science**, v.100, n.4, p.101019, 2021.
- SERGEANT, M.J., CONSTANTINIDOU, C., COGAN, T.A. et al. Extensive microbial and functional diversity within the chicken cecal microbiome. **PloS One**, v.9, n.3, p.e91941, 2014.
- ŠIMIĆ, A.; GONZÁLEZ-ORTIZ, G.; MANSBRIDGE, S.C. et al. Broiler chicken response to xylanase and fermentable xylooligosaccharide supplementation. **Poultry Science**, v.102, n.11, p.103000, 2023.
- SINGH, A.; O'NEILL, H.M.; GHOSH, T.K. et al. Effects of xylanase supplementation on performance, total volatile fatty acids and selected bacterial population in caeca, metabolic indices and peptide YY concentrations in serum of broiler chickens fed energy restricted maize–soybean based diets. **Animal Feed Science and Technology**, v.177, n.3-4, p.194-203, 2012.

- SMITH, A.L.; POWERS, C.; BEAL, R. The avian enteric immune system in health and disease. In: **Avian Immunology**, 2.ed. Academic Press, 2022. p.303-326.
- SOUZA, C.S.; VIEITES, F.M.; JUSTINO, L.R. et al. Importance of intestinal health in broilers. **Research, Society and Development**, v.9, n.3, p.e86932475, 2020.
- STEFANELLO, C.; VIEIRA, S. L.; SOSTER, P. et al. Utilization of corn-based diets supplemented with an exogenous α -amylase for broilers. **Poultry Science**, v.98, n.11, p.5862-5869, 2019.
- SURESH, G.; SANTOS, D.U.; ROUISSI, T. et al. In-field poultry tests to evaluate efficacy of bioformulation consisting of enzymes and yeast biomass. **Animal Feed Science and Technology**, v.262, p.114398, 2020.
- SVIHUS, B. Starch digestion capacity of poultry. **Poultry Science**, v.93, n.9, p.2394-2399, 2014.
- VIEIRA, S.L.; STEFANELLO, C.; RIOS, H.V. et al. Efficacy and metabolizable energy equivalence of an α -amylase- β -glucanase complex for broilers. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.17, n.2, p.227-235, 2015.
- WANG, J.; LIU, S.; MA, J. et al. Changes in growth performance and ileal microbiota composition by xylanase supplementation in broilers fed wheat-based diets. **Frontiers in Microbiology**, p.1836, 2021. (a)
- WANG, Y.; HENG, C.; ZHOU, X. et al. Supplemental *Bacillus subtilis* DSM 29784 and enzymes, alone or in combination, as alternatives for antibiotics to improve growth performance, digestive enzyme activity, anti-oxidative status, immune response and the intestinal barrier of broiler chickens. **British Journal of Nutrition**, v.125, n.5, p.494-507, 2021. (b)
- WARD, N.E. Debranching enzymes in corn/soybean meal-based poultry feeds: a review. **Poultry Science**, v.100, n.2, p.765-775, 2021.
- WICKRAMASURIYA, S. S.; PARK, I.; LEE, K. et al. Role of physiology, immunity, microbiota, and infectious diseases in the gut health of poultry. **Vaccines**, v.10, n.2, p.172, 2022.
- WILLIAMS, M.P.; O'NEILL; H.M.; YORK, T. et al. Effects of nutrient variability in corn and xylanase inclusion on broiler performance, nutrient utilisation, and volatile fatty acid profiles. **Journal of Applied Animal Nutrition**, v. 6, n.1, p.1-10, 2018.
- YAN, F.; DIBNER, J.J.; KNIGHT, C.D. et al. Effect of carbohydrase and protease on growth performance and gut health of young broilers fed diets containing rye, wheat, and feather meal. **Poultry Science**, v.96, n.4, p.817-828, 2017.
- YADAV, S.; JHA, R. Strategies to modulate the intestinal microbiota and their effects on nutrient utilization, performance, and health of poultry. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v.10, n.1, p.1-11, 2019.

- YADAV, S.; MISHRA, B.; JHA, R. Cassava (*Manihot esculenta*) root chips inclusion in the diets of broiler chickens: effects on growth performance, ileal histomorphology, and cecal volatile fatty acid production. **Poultry Science**, v.98, n.9, p.4008-4015, 2019.
- YEGANI, M.; KORVER, D.R. Effects of corn source and exogenous enzymes on growth performance and nutrient digestibility in broiler chickens. **Poultry Science**, v.92, n.5, p.1208-1220, 2013.
- YUAN, J.; WANG, X.; YIN, D. et al. Effect of different amylases on the utilization of cornstarch in broiler chickens. **Poultry Science**, v.96, n.5, p.1139-1148, 2017.
- ZHANG, S.; WANG, C.; SUN, Y. et al. Xylanase and fermented Polysaccharide of *Hericium caputmedusae* reduce pathogenic infection of broilers by improving antioxidant and anti-inflammatory properties. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v.2018, p.11, 2018.
- ZHOU, Z.Y.; PACKIALAKSHMI, B.; MAKKAR, S.K. et al. Effect of butyrate on immune response of a chicken macrophage cell line. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.162, n.1-2, p.24-32, 2014.
- ZHOU, H.; WU, Y.; SUN, X. et al. Effects of exogenous α -(1, 4)-amylase on the utilisation of corn starch and glucose metabolism in broiler chickens. **Animal**, v.15, n.11, p.100396, 2021.