

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel**  
**Programa de Pós-Graduação em Zootecnia**



Tese

**Valorização nutricional de dietas para frangos de corte com fitase híbrida e carboidrases**

**Caroline Bavaresco**

Pelotas, 2020.

**Caroline Bavaresco**

**Valorização nutricional de dietas para frangos de corte com fitase híbrida e carboidrases**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (Área do conhecimento: Nutrição Animal).

Orientador: Professor Dr. Victor Fernando Büttow Roll  
Coorientador: Dr. Everton Luiz Krabbe

Pelotas, 2020

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

B353v Bavaresco, Caroline

Valorização nutricional de dietas para frangos de corte com fitase híbrida e carboidrases / Caroline Bavaresco ; Victor Fernando Büttow Roll, orientador ; Everton Luiz Krabbe, coorientador. — Pelotas, 2020.

73 f.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2020.

1. Custos. 2. Desempenho. 3. Digestibilidade. 4. Energia. 5. Enzimas. I. Roll, Victor Fernando Büttow, orient. II. Krabbe, Everton Luiz, coorient. III. Título.

CDD : 636.51

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Caroline Bavaresco

**Valorização nutricional de dietas para frangos de corte com fitase híbrida e carboidrases**

Tese aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Doutor em Ciências, pelo Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 21/02/2020

Banca Examinadora:

---

Professor Dr. Victor Fernando Büttow Roll (Orientador). Doutor em Produção Animal pela Universidade de Zaragoza.

---

Dra. Aline Arassiana Piccini Roll. Doutora em Nutrição Animal pela Universidade Federal de Pelotas.

---

Professor Ph.D. Eduardo Gonçalves Xavier. Ph.D. em *Animal Science* pela Universidade de Kentucky.

---

Professora Dra. Fabiane Pereira Gentilini. Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

---

Professor Ph.D. Fernando Rutz. Ph.D. em *Animal Science* pela Universidade de Kentucky.

## **Agradecimentos**

Agradeço a todas as pessoas que ajudaram na realização desse trabalho, e que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal. O sucesso de mais esta etapa é resultado da confiança e força de cada um de vocês (família, amigos e mestres);

A minha família, em especial a minha mãe Jocelina por todo o esforço, dedicação e apoio incondicional para que eu chegasse até aqui. Ao meu marido Jorge Franck pela amizade e apoio;

Aos professores colaboradores do GEASPEL, Débora Lopes, Eduardo Xavier, Fabiane Gentilini, Fernanda Medeiros, Fernando Rutz, Marcos Anciuti e Victor Roll, pelas orientações, contribuindo para o meu crescimento pessoal e profissional, desde a graduação. Em especial ao meu orientador Victor Roll, por ter aceitado me orientar no mestrado e no doutorado, e por todo apoio dado nessas etapas. Ao pesquisador Everton Krabbe, que me recepcionou muito bem na Embrapa Suínos e Aves, o que nos permitiu construir um ótimo ambiente de trabalho que perdura até hoje;

As colegas de trabalho que auxiliaram nas atividades do experimento, Adenise, Edenilse, Renata e Thaís. Aos funcionários da Embrapa Suínos e Aves que forneceram todo o aporte da rotina de trabalho no aviário, fábrica de ração e atividades no laboratório;

A empresa BASF SA pelas contribuições realizadas, que possibilitaram a execução do projeto. Em especial aos profissionais Bruno e Nicolas, sempre presentes;

A todos os integrantes do Grupo de Aves e Suínos de Pelotas, pela grande parceria onde compartilhamos momentos agradáveis com muita troca de experiência. Dentre eles, saliento as colegas de pós-graduação Aline, Bia, Débora, Juliana, Renata e Suelen;

Ao Programa de Pós Graduação em Zootecnia pela oportunidade de cursar o doutorado, em especial a secretária Norma Braunner, sempre solícita;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela concessão da bolsa de doutorado;

Finalmente, a Deus por me permitir estar aqui,

Muito Obrigada!

## Resumo

BAVARESCO, Caroline. **Valorização nutricional de dietas para frangos de corte com fitase híbrida e carboidrases**. Orientador: Victor Fernando Büttow Roll. 2020. 73f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Departamento de Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2020.

Através do presente estudo avaliou-se o efeito da suplementação de uma fitase híbrida associada com um pacote específico de carboidrases, em dietas contendo reduções nutricionais de Ca, P e energia, sobre o desempenho, rendimento de carcaça, custos de produção, digestibilidade de nutrientes e qualidade óssea de frangos de corte. O experimento foi conduzido no Setor Experimental de Aves, na Embrapa Suínos e Aves/ Concórdia - SC, Brasil. Um total de 1875 frangos de corte machos com um dia de idade da linhagem *Cobb 500* foram alojados em boxes. As aves apresentaram peso médio inicial de  $46,9 \pm 3,7$  g e foram distribuídas ao acaso em cinco tratamentos, com 15 repetições de 25 frangos. Os tratamentos consistiam de uma dieta controle positivo e dietas com reduções de energia metabolizável (EM) de 70 e 100 kcal/kg, e reduções fixas de 0,16% Ca e 0,15% P disponível (P<sub>disp</sub>), com ou sem suplementação de uma fitase híbrida (500 FTU/kg) associada ou não com xilanase (560 TXU/kg) e glucanase (250 TGU/kg). Foi utilizado um programa alimentar considerando as fases: pré-inicial, inicial, crescimento e final. Para as avaliações da digestibilidade dos nutrientes e qualidade óssea, foram abatidos aos 28 dias de idade três aves por boxe ( $\pm 5\%$  do peso médio). Para as avaliações de desempenho foram consideradas as variáveis: peso corporal médio, ganho de peso médio diário, consumo de ração e conversão alimenta. Ao final dos 42 dias foi realizada a avaliação do rendimento de carcaça através da seleção de duas aves por boxe ( $\pm 5\%$  do peso médio), e ao final do experimento via cálculo foi obtido o custo da tonelada da carcaça resfriada. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de *Tukey* ( $P \leq 0,05$ ). A suplementação de 500 FTU/kg de uma fitase híbrida demonstrou ser eficiente no restabelecimento da energia metabolizável corrigida para nitrogênio (EMAN) de dietas para frangos até 28 dias de idade, com redução dietética de 70 kcal/kg, 0,16% de Ca e 0,15% de P. Dietas com matriz nutricional de -100kcal/kg, -0,16% Ca e -0,15% P<sub>disp</sub>, pode ser implementada desde que a fitase esteja associada com as carboidrases. As reduções nutricionais de Ca e P<sub>disp</sub> foram superadas com o uso da fitase + carboidrases, mantendo a qualidade óssea dos animais. O uso isolado da fitase foi eficiente na manutenção do desempenho das aves alimentadas com dietas contendo redução de até 70kcal/kg, 0,16%Ca e 0,15%P<sub>disp</sub>, ao longo de 42 dias. A associação da fitase + carboidrases foi eficaz na manutenção do peso corporal e ganho de peso quando as dietas aplicaram a maior redução nutricional. Frangos de corte alimentados durante 42 dias com dietas contendo fitase + carboidrases (-100 kcal/kg, 0,16% Ca e 0.15% P<sub>disp</sub>) apresentaram o menor custo de produção por tonelada de carcaça resfriada.

**Palavras-chave:** Custos. Desempenho. Digestibilidade. Energia. Enzimas. Minerais.

## Abstract

BAVARESCO, Caroline. **Nutritional reformulation of diets for broilers using hybrid phytase and carbohydrases**. Advisor: Victor Fernando Büttow Roll. 2020. 73p. Thesis (Doctor of Science) – Graduate Program of Animal Science, Department of Animal Science, College of Agronomy Eliseu Maciel, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2020.

The present study aimed to evaluate the effect of hybrid phytase and carbohydrases supplementation in broiler diets with nutritional reduction of Ca, P and energy on performance, carcass yield, production cost, nutrient digestibility and bone quality. The experiment was carried out at the EMBRAPA poultry research facility located in Concordia - SC, Brazil. A total of 1875 one-day-old *Cobb 500* male broilers with an average weight of  $46.9 \pm 3.7$  g were housed in pens, and were randomly distributed among five treatments with 15 replicates of 25 broilers each. The treatments consisted of a positive control diet and diets with metabolizable energy (ME) reductions of 70 and 100 kcal/kg, and fixed reductions of 0.16% Ca and 0.15% available P, with or without supplementation of a hybrid phytase (500 FTU/kg) associated or not with xylanase (560 TXU/kg) and glucanase (250 TGU/kg). A four-phase feeding program was used as follows: pre-starter, starter, grower and finishing. At 28 days of age three birds per pen were selected for slaughter based on the mean body weight of its experimental unit ( $\pm 5\%$ ) to evaluate nutrient digestibility and bone quality. The broilers' average body weight, average daily weight gain, average feed intake, and average feed conversion ratio were analyzed to compare performance according to dietary treatments. At the end of the experimental period (42 days of age), two birds from each experimental unit with the weight closest to the average of the pen (5% above or below the mean) were selected and used for subsequent carcass yield evaluations. The results of carcass yield were used to calculate the cost per ton of cooled carcasses. The data were analyzed using analysis of variance (ANOVA), and the means were compared via *Tukey's* test ( $P \leq 0,05$ ) using the "LSM - least squares means" procedure. Hybrid phytase supplementation of 500 FTU/kg was efficient for re-establishing the AMEn of diets for broilers up to 28 days of age, with dietary reductions of 70 kcal/kg, 0.16% Ca, and 0.15% available P. Diets with a nutritional matrix of -100 kcal/kg, -0.16% Ca, and 0.15% available P can be improved through combined supplementation of hybrid phytase with carbohydrase. The nutritional reductions of Ca and available P were overcome by use of hybrid phytase + carbohydrases, maintaining the bone quality of the animals. The use of hybrid phytase alone was effective to maintain the performance of broilers fed diets with a reduction of up to 70 kcal/kg, 0.16% Ca, and 0.15% available P during a 42-day period. The association of the hybrid phytase + carbohydrases was effective for maintaining body weight and daily weight gain of broilers even when the greatest nutritional reduction were applied. Broilers fed for 42 days with diets containing phytase + carbohydrases (-100 kcal/kg, 0.16% Ca and 0.15% available P) presented the lowest production cost per ton of cooled carcass.

**Key-words:** Costs. Digestibility. Energy. Enzymes. Minerals. Performance.

*“Reprograme a tua meta, busca o bem e você viverá melhor.  
Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo,  
qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim”.*

**Chico Xavier**



## Lista de Figuras

### Capítulo 1 - Revisão de Literatura

Figura 1	(A) Estrutura do ácido fítico (mio-inositol, 1, 2, 3, 4, 5, 6 hexafosfato) IP6. IUPAC (1989). (B) – Estrutura do fitato e principais nutrientes passíveis de formação de complexo.....	16
Figura 2	Efeito do pH e cátions metálicos na natureza do fitato.....	19
Figura 3	pH do alimento (ração farelada), nos diferentes segmentos do trato digestório do frango de corte, alimentado <i>ad libitum</i> , durante 6 semanas.....	20
Figura 4	Nova 6-fitase híbrida (Nathuphos <sup>®</sup> E - BASF).....	23
Figura 5	Perfil da faixa de pH da Natuphos <sup>®</sup> E.....	23
Figura 6	(A): Ambiente intestinal em condição normal (sem a presença de PNA's); (B): Ambiente intestinal na presença de PNA's.....	25
Figura 7	Distribuição das fibras dietéticas nos grãos e os sítios de ataque das enzimas xilanase e glucanase.....	27

### Capítulo 2 - Fitase híbrida e carboidrases em dietas à base de milho e farelo de soja para frangos de corte: digestibilidade de nutrientes e qualidade óssea

Figura 1	Fotografias (A) Amostras das dietas; (B) Amostras digestas liofilizadas.	39
Figura 2	Fotografias (A) Preparação das tíbias para a realização das análises de qualidade óssea; (B) Texturômetro utilizado para as análises de força, rigidez e flexibilidade óssea.....	41
Figura 3	Gráficos da Força (1A), Rigidez (1B) e Flexibilidade (1C) de tíbias de frangos alimentados com uma fitase híbrida associada à carboidrases..	43

### Capítulo 3 - Fitase híbrida e carboidrases em dietas à base de milho e farelo de soja para frangos de corte: desempenho e custo de produção

Figura 1	Fotografias (A) Área externa galpão experimental; (B); Área interna galpão experimental.....	50
----------	--	----

Figura 2	Fotografias (A) Animais aos 7 dias de idade; (B); Frangos aos final do período experimental (42 dias).....	54
Figura 3	Gráfico do custo de produção de carcaças resfriadas de frangos de corte alimentados com dietas contendo reduções nutricionais suplementadas ou não com enzimas.....	60

## Lista de Tabelas

### Capítulo 1 - Revisão de Literatura

Tabela 1	Porcentagem de fósforo fítico, disponível e total de ingredientes vegetais utilizados na alimentação de aves.....	17
Tabela 2	Resultados de estudos sobre o efeito dietético do ácido fítico sobre o ganho de peso (GP) de frangos de corte.....	18

### Capítulo 2 - Fitase híbrida e carboidrases em dietas a base de milho e farelo de soja para frangos de corte: digestibilidade de nutrientes e qualidade óssea

Tabela 1	Tratamentos experimentais.....	35
Tabela 2	Composição e perfil nutricional das dietas experimentais.....	37
Tabela 3	Valores da energia metabolizável corrigida para nitrogênio (EMAn) e dos Coeficientes de digestibilidade ileal da proteína bruta (PB), matéria seca (MS), matéria mineral (MM), cálcio (Ca) e fósforo (P), de frangos alimentados com dietas contendo uma fitase híbrida associada à carboidrases (média ± desvio padrão).....	42
Tabela 4	Composição mineral (cálcio – Ca, fósforo – P e zinco- Zn), de tíbias de frangos alimentados com uma fitase híbrida associada à carboidrases (média ± desvio padrão).....	42

### Capítulo 3 - Fitase híbrida e carboidrases em dietas a base de milho e farelo de soja para frangos de corte: desempenho e custo de produção

Tabela 1	Composição e perfil nutricional das dietas experimentais.....	52
Tabela 2	Valores em reais (R\$) e em dólares americanos (USD) por kg dos ingredientes utilizados nas dietas experimentais.....	55
Tabela 3	Desempenho de frangos de corte alimentados com dietas contendo diferentes níveis de energia, Ca e Pdisp, suplementadas ou não com enzimas exógenas (média ± desvio padrão).....	56

## Sumário

<b>1 Introdução</b> .....	13
<b>Capítulo 1 - Revisão da Literatura</b> .....	15
1.1 Fitato: O substrato da fitase.....	16
1.1.1 Atuação do fitato como fator antinutricional.....	18
1.2 Fitase.....	20
1.2.1 Fontes e caracterização das principais fitases utilizadas na nutrição animal.....	21
1.2.2 Fitase Híbrida (Natuphos <sup>®</sup> E – BASF).....	22
1.3 Efeito antinutritivo dos polissacarídeos não amiláceos (PNA's).....	24
1.4 Xilanase e glucanase na dieta de aves.....	26
1.5 Ca e P: requerimentos, redução nutricional e suplementação da fitase.....	28
1.6 Associação da fitase com carboidrases e custo de produção.....	30
<b>Capítulo 2 - Fitase híbrida e carboidrases em dietas à base de milho e farelo de soja para frangos de corte: digestibilidade de nutrientes e qualidade óssea</b> .....	32
2.1 Introdução.....	33
2.2 Materiais e métodos.....	34
2.2.1 Animais e tratamentos.....	34
2.2.2 Enzimas.....	35
2.2.2.1 Fitase.....	35
2.2.2.2 Carboidrases.....	35
2.2.2.3 Atividade enzimática.....	36
2.2.3 Programa alimentar.....	36
2.2.4 Variáveis analisadas.....	36

2.2.4.1 Digestibilidade dos nutrientes.....	39
2.2.4.2 Qualidade óssea.....	40
2.2.5 Análise estatística.....	41
2.3 Resultados.....	41
2.4 Discussão.....	44
2.5 Conclusões.....	46
<b>Capítulo 3 - Fitase híbrida e carboidrases em dietas à base de milho e farelo de soja para frangos de corte: desempenho e custo de produção.....</b>	<b>47</b>
3.1 Introdução.....	48
3.2 Materiais e métodos.....	49
3.2.1 Animais e tratamentos.....	49
3.2.2 Enzimas.....	50
3.2.2.1 Fitase.....	50
3.2.2.2 Carboidrases.....	51
3.2.2.3 Atividade enzimática.....	51
3.2.3 Programa alimentar.....	51
3.2.4 Variáveis analisadas.....	54
3.2.4.1 Desempenho zootécnico.....	54
3.2.4.2 Rendimento de carcaça e custos de produção.....	54
3.2.5 Análise estatística.....	55
3.3 Resultados e discussão.....	55
3.3.1 Desempenho.....	56
3.3.2 Rendimento de carcaça e custos.....	59
3.4 Conclusões.....	60
<b>4 Considerações Finais.....</b>	<b>61</b>
<b>Referências.....</b>	<b>62</b>

## 1 Introdução

A base nutricional utilizada na alimentação de aves é composta principalmente por dietas vegetais, e o milho e farelo de soja são os ingredientes mundialmente mais requeridos. Apesar de serem considerados alimentos de excelência, por apresentarem alta digestibilidade, eles possuem fatores antinutricionais, que impactam no desempenho animal.

Dentre os antinutrientes presentes nessas matérias-primas tem-se o fitato. Trata-se de uma estrutura composta pelo ácido fítico quelatado com minerais e outros nutrientes, acarretando baixa disponibilidade do fósforo (P), bem como de outros compostos (LU et al., 2017). Os polissacarídeos não amiláceos (PNA's), também são antinutrientes que ocasionam transtornos digestivos nas aves. São conhecidos como fibras alimentares, e elas podem ser solúveis ou insolúveis (RAZA et al., 2019). Quando solúveis, aumentam a viscosidade intestinal, e com isso reduzem o acesso de enzimas aos substratos (CHOCT et al., 1996). Em relação às porções insolúveis da fibra, elas indisponibilizam nutrientes por estarem encapsulados na matriz insolúvel da parede celular, agindo como uma barreira entre substratos e enzimas, reduzem a taxa de passagem, modificam o pH do intestino, entre outros (RAZA et al., 2019).

É possível contornar os problemas gerados pelo fitato e PNA's através do uso de enzimas específicas, como as fitases e algumas carboidrases. A fitase (mio-inositol-hexaquisfosfato fosfo-hidrolase) é responsável por catalizar a reação de hidrólise que libera o fósforo inorgânico do fitato (GREINER, 2007). Atualmente existem diversas fitases no mercado, que apresentam variações quanto à origem, atividade, resistência aos processamentos das rações, entre outras características. Quanto às carboidrases, elas são disponibilizadas no mercado de acordo com o mecanismo de ação, comercializadas individualmente, na forma de complexo ou cocktail. Tratando especificamente da xilanase e glucanase, a primeira irá degradar os PNA's em xilo-oligossacarídeos, e ao final do processo, por ação bacteriana serão produzidos ácidos graxos voláteis, que posteriormente serão utilizados como substrato para a produção de energia (CHOCT et al., 1996). As glucanases clivam aleatoriamente ligações glicosídicas  $\beta$ -1-4 no interior das cadeias celulolíticas (WILSON, 2012).

Após isso, por ação de outras enzimas os produtos produzidos ao longo das reações catalíticas irão formar ao final do processo glicose (BAYER et al., 1994).

Por muito tempo, acreditou-se que o uso de carboidrases em dietas à base de milho e farelo de soja, não impactaria de maneira significativa no desempenho dos animais. Contudo diversos trabalhos vêm relatando o oposto, demonstrando eficiência comprovada, mesmo quando o conteúdo de substrato para ação enzimática é reduzido. Além disso, verificou-se que quando as dietas são suplementadas com a associação de fitase e carboidrases, uma ação sinérgica pode ser esperada, havendo contribuições mútuas na eficácia dessas enzimas (COWIESON et al., 2009a).

Ao longo dos anos, novas fitases vêm sendo lançadas no mercado, obtidas à partir de diferentes fontes, apresentando maior atividade e resistência ao passar pelo trato digestório do animal, este é o caso da fitase híbrida. Para o desenvolvimento desta fitase, utilizou-se a engenharia genética, que uniu o genoma de três bactérias, e inoculou esse material no fungo *Aspergillus niger*. Essa tecnologia tornou essa enzima mais resistente à ação da pepsina e aos processos térmicos, como a peletização. Portanto, estudos baseados no uso da fitase híbrida são necessários.

Assim, o presente trabalho foi realizado para avaliar a eficiência da fitase híbrida associada com um pacote específico de carboidrases (xilanasase + glucanase), em dietas à base de milho e farelo de soja contendo reduções nutricionais de cálcio (Ca), P e energia, sobre o desempenho, rendimento de carcaça, custos de produção, digestibilidade de nutrientes e qualidade óssea de frangos de corte.

## **Capítulo 1**

---

Revisão de Literatura



### 1.1 Fitato: O substrato da fitase

O fitato foi identificado a mais de um século (HARTIG, 1855), e esse termo refere-se ao sal misto de ácido fítico (DERSEJANT et al., 2015). Apesar de erroneamente muitas vezes ser encontrado na literatura o termo 'ácido fítico' (AF) como sinônimo de fitato, o AF é a designação utilizada para identificar o mio inositol hexaquisfosfato (IP6) na sua forma livre (SELLE e RAVINDRAN, 2007), sendo um álcool cíclico inositol esterificado com seis grupos fosfóricos (RAO et al., 2009). Na figura 1 A e B é possível visualizar as estruturas do AF e fitato, respectivamente.

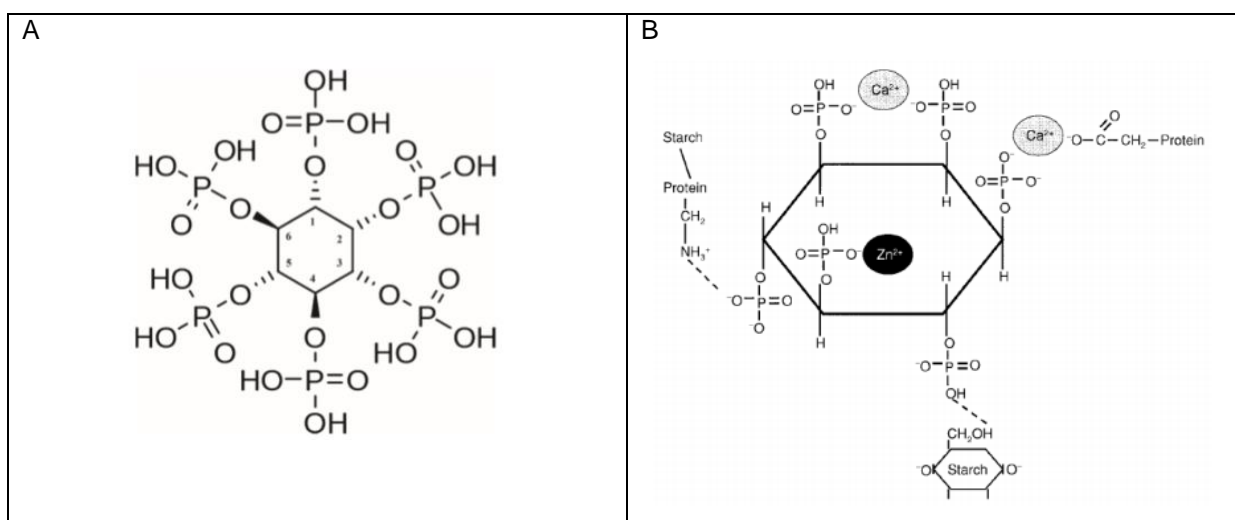


Figura 1 - (A) – Estrutura do ácido fítico (mio-inositol, 1, 2, 3, 4, 5, 6 hexafosfato) IP6. IUPAC (1989). (B) – Estrutura do fitato e principais nutrientes passíveis de formação de complexo. Fonte: Adaptado de Kornegay (2001).

O fitato é a principal fonte de P das plantas, e essa forma orgânica representa de 60 a 90% do conteúdo total desse mineral (SINGH et al., 2013; VOHRA e SATYANARAYANA, 2003), contudo as aves possuem baixa capacidade de degradar e aproveitar essa estrutura, por isso dois terços do P contido no fitato é pouco disponível para as aves (COWIESON et al., 2016). Esses animais não produzem em quantidade suficiente a fitase, enzima que hidrolisa as ligações do AF (componente da estrutura do fitato) com os grupos fosfóricos, sendo que a digestibilidade do AF não atinge 10% em frangos de corte (COWIESON et al., 2006a; KORNEGAY, 2001; RUTHERFURD et al., 2012). Esse baixo aproveitamento do P acarreta em maior presença desse mineral nas excretas, ocasionando o aumento da poluição ambiental (KNOWLTON et al., 2004; TOTH et al., 2006).

O AF pode também reduzir a digestibilidade de alguns nutrientes, pois sua molécula é um forte agente quelante reagindo principalmente com minerais como

cálcio (Ca), sódio (Na), magnésio (Mg), cobre (Cu), ferro (Fe), zinco (Zn), cobalto (Co) e manganês (Mn) (RUCKEBUSCH et al., 2013). Além disso, o AF também influencia na digestibilidade de aminoácidos e da energia (WOYENGO e NYACHOTI, 2011).

Nas matérias-primas, é provável que o AF esteja na forma de complexos, ligados a minerais como Mg, Ca e K (potássio) (REDDY et al., 1982), e esses são pouco reativos (LOTT et al., 2000). Contudo, quando o alimento é exposto à condições de baixo pH (estômago), o fitato se dissocia e se torna solúvel (COSGROVE, 1966), e ao encontrar zonas do trato gastrointestinal com faixa de pH mais altos (intestino delgado), o AF irá se complexar com minerais (ANGEL et al., 2002). Já a afinidade do AF em ligar-se a proteínas ocorre em uma ampla faixa de pH. No estômago (pH ácido), ele se liga a aminoácidos básicos, como arginina, histidina e lisina, formando complexos, enquanto que no intestino delgado, ao encontrar uma faixa de pH acima do ponto isoelétrico das proteínas, o AF apresenta capacidade de se ligar a proteínas e formar complexos proteína-mineral-fitato (CHERYAN e RACKIS, 1980; KIES et al., 2006).

Existem variações nas quantidades de AF encontradas nos ingredientes utilizados na alimentação animal (Tabela 1), sendo alguns deles potencialmente problemático. Porém mesmo a ingestão de baixas concentrações de um antinutriente, é capaz de impactar negativamente no desenvolvimento animal (CAMPBELL e BEDFORD, 1992; JANSMAN et al., 1994; SAUVEUR, 1989).

Tabela 1: Porcentagem de fósforo fitico, disponível e total de ingredientes vegetais utilizados na alimentação de aves.

Ingrediente	P Fítico (%)	P disponível (%)	P total (%)
Farelo de Arroz	1,37	0,35	1,71
Farelo de Girassol	0,66	0,32	0,98
Farelo de Soja	0,38	0,21	0,59
Farelo de Trigo	0,45	0,49	0,94
Milho	0,15	0,04	0,19
Sorgo	0,16	0,07	0,23

Fonte: Adaptado de Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos: Composição de alimentos e exigências nutricionais (2017).

Ao longo dos anos, a literatura tem abordado os efeitos deletérios do AF sobre o desempenho animal. Em uma revisão realizada por Woyengo e Nyachoti

(2013), sobre os efeitos antinutricionais do AF na dieta de aves e suínos, em um apanhado de alguns estudos, os autores reuniram em uma tabela os principais resultados encontrados quando frangos foram alimentados com dietas contendo uma quantidade maior de AF. Na tabela 2 é possível verificar que com o aumento do AF ocorreu a redução do ganho de peso dos animais.

Tabela 2: Resultados de estudos sobre o efeito dietético do ácido fítico sobre o ganho de peso (GP) de frangos de corte.

Início (dias)	Duração (dias)	AF DC <sup>1</sup> (%)	AF DD <sup>2</sup> (%)	Resposta	Redução <sup>3</sup> (%)	Referência
0	21	0,78	1,57	GP	3	A
0	28	0,78	1,57	GP	3	B
0	21	0,78	1,57	GP	7	C
7	18	1,04	1,57	GP	7	D
8	14	0,00	1,65	GP	28	E

<sup>1</sup> DC (dieta controle); <sup>2</sup> DD (dieta desafio); <sup>3</sup> controle *versus* desafio. A= Liu et al., 2009; B= Liu et al., 2008a; C= Liu et al., 2008b; D= Cabahug et al., 1999; E= Onyango e Adeola, 2009. Fonte: Adaptado de Woyengo e Nyachoti (2013).

A presença do AF na dieta de aves é prejudicial ao desempenho animal, devido aos impactos negativos sobre a digestibilidade dos nutrientes. Nos estudos resumidos na Tabela 2, fica evidente que 0,53% de aumento na quantidade de AF (1,04 para 1,57%) foi suficiente para impactar negativamente no ganho de peso (redução de 7%) (WOYENGO e NYACHOTI, 2011). Porém, quando avaliamos o impacto do AF sobre outras respostas, como digestibilidade de minerais e da energia, fica claro que esses limites podem ser diferentes, conforme reportado por Ravindran et al. (2006). Os autores verificaram que o aumento do AF em 3,2% reduziu a digestibilidade do Ca e Fe em frangos. Neste mesmo estudo, o acréscimo de 3,6% de AF diminuiu a energia metabolizável das dietas em 2,1%. Contudo, existem grandes variações entre os estudos, desde a genética dos animais, composição das dietas e dos ingredientes, idade das aves, entre outros. Todas essas oscilações dificultam o melhor entendimento do impacto das quantidades de AF sobre a digestibilidade de nutrientes e desempenho das aves.

### 1.1.1 Atuação do fitato como fator antinutricional

O AF existe na forma livre ou complexado com um metal (metal – fitato), e essa relação estreita depende basicamente do pH do meio e dos cátions metálicos

divalentes disponíveis. Assim, quando esses componentes são submetidos a um pH neutro, ocorre a formação de complexos devido a interação eletrostática direta, sendo que existe a preferência por cátions metálicos com grandes raios iônicos (OH et al., 2004), sendo o  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  os mais susceptíveis (KORNEGAY, 2001).

O grau de fosforilação do fitato está relacionado com a sua capacidade quelatante, quanto maior a fosforilação do mio-inositol, maior o poder de complexação (NAVES, 2014). De acordo com Cúneo et al. (2000), os fosfatos de inositol determinados em grãos correspondem, aproximadamente, a 90% na forma hexafosfórica, com os 10% restantes ao somatório das frações penta-, tetra- e trifosfórica. Na figura 1 é apresentado o esquema do efeito do pH e cátions metálicos sobre o fitato.

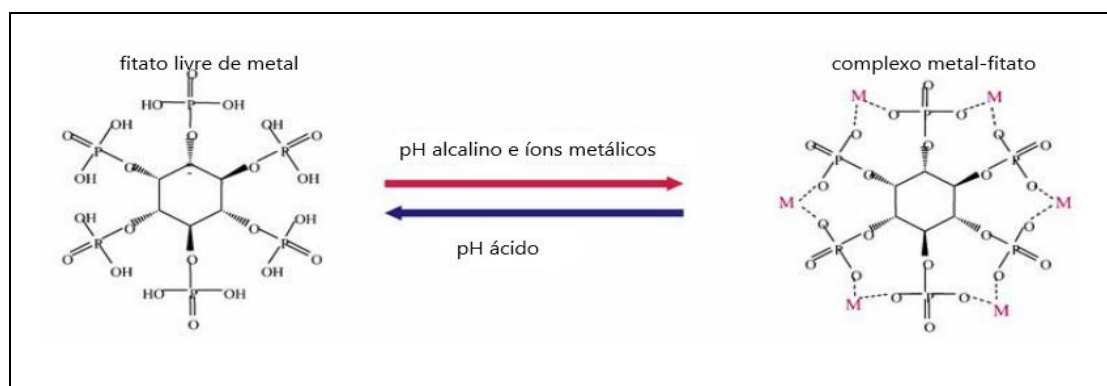


Figura 2 - Efeito do pH e cátions metálicos na natureza do fitato.  
Fonte: Adaptado de Oh et al. (2004).

A maior taxa de formação de complexos entre o AF e outros nutrientes se dá no trato digestório das aves. No caso do Ca, por exemplo, estima-se que 1/3 dele forme complexos com o AF durante a passagem do alimento pelo intestino (NAVES, 2014). As condições de pH são extremamente marcantes no trato digestório e determinantes nas reações entre AF e demais nutrientes. Na figura 3 é apresentado o desenho esquemático das variações de pH dessa porção do organismo das aves.

Em pH de 5,0 a 8,5, o complexo de Ca-fitato é formado, sendo que a afinidade entre esses compostos cresce conforme aumenta o pH do local. Em condições de pH alcalino, torna-se inevitável a formação de fitato complexado com nutrientes, o que acarreta na redução da disponibilidade deles para o aproveitamento animal (NAVES, 2014). Uma maneira de reduzir a ocorrência dessas

reações é incluir a fitase nas dietas, pois ela irá atuar principalmente sobre o ácido fítico, reduzindo a sua capacidade complexante.

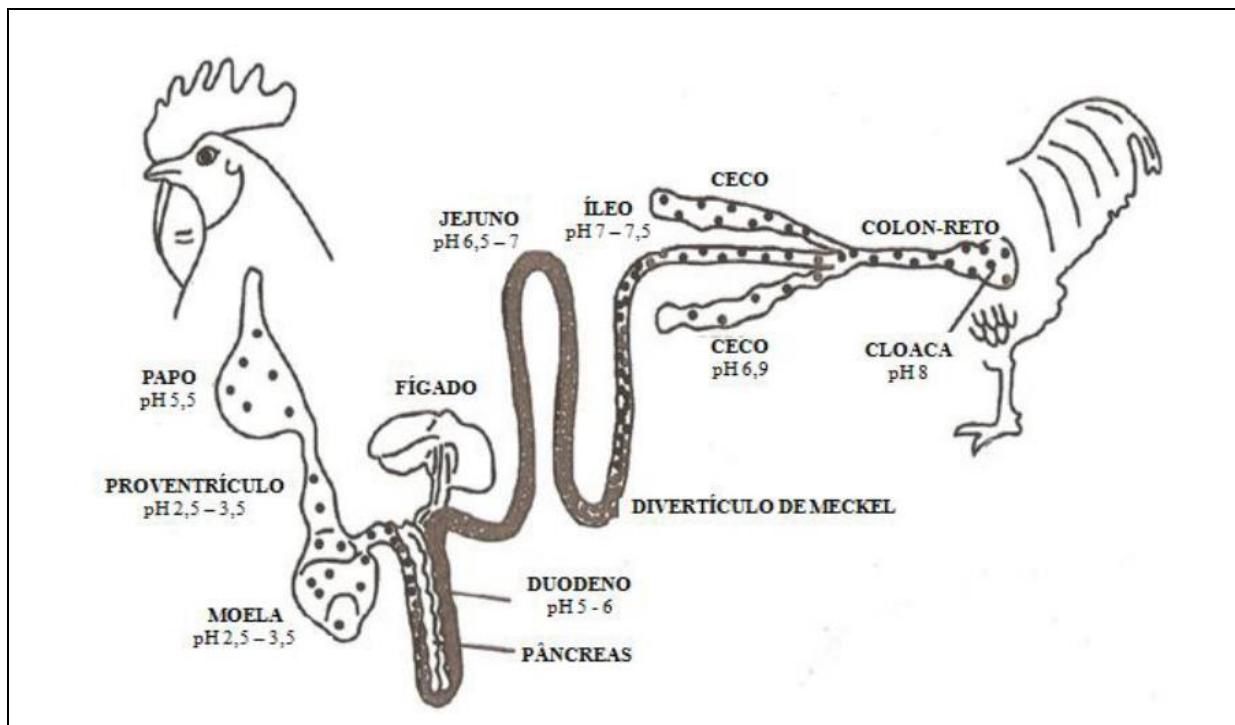


Figura 3 - pH do alimento (ração farelada), nos diferentes segmentos do trato digestório do frango de corte, alimentado *ad libitum*, durante 6 semanas.

Fonte: Gauthier, 2002.

Na avicultura moderna, a suplementação dietética com fitase é uma prática rotineira. Comprovadamente, essa enzima além de impactar positivamente sobre a digestibilidade do P, também melhora a digestibilidade do Ca, de outros minerais, de aminoácidos e da energia (DERSJANT-LI et al., 2015).

## 1.2 Fitase

A fitase (mio-inositol-hexaquisfosfato fosfo-hidrolase) é categorizada na classe das fosfatases (EC 3.1.3), e é responsável por catalisar a reação de hidrólise que libera o fósforo inorgânico do AF (GREINER, 2007).

Estudos da fitase como suplemento alimentar datam por volta dos anos 60, onde a empresa International Minerals & Chemicals (IMC), iniciou trabalhos voltados para o desenvolvimento de um produto comercial (WODZINSKI e ULLAH, 1996). Durante a pesquisa, diversos microrganismos foram avaliados para serem potenciais fornecedores de fitase. Contudo em 1968, os trabalhos foram encerrados já que não

foi possível identificar um organismo que produzisse a enzima em quantidade suficiente e com atividade alta para ser viável comercialmente (LEI et al., 2013).

Na tentativa pioneira da IMC, ela forneceu um isolado muito valioso de *Aspergillus niger*, que permitiu a identificação posterior da primeira fitase comercializada no ano de 1991, após a caracterização inicial por Irving e Cosgrove (1972). Outro marco no desenvolvimento da fitase como aditivo na alimentação animal foi na década de 80, onde a aplicação da tecnologia de DNA recombinante permitiu a clonagem da sequência parcial de um gene da fitase por Mullaney e colaboradores (1991). Esses pesquisadores também orientaram a clonagem completa do gene e sua superexpressão para a produção da primeira fitase comercializada (VAN HARTINGSVELDT et al., 1993).

A Natuphos – BASF (*Aspergillus niger*), foi a primeira fitase comercializada globalmente em 1991. Contudo, nos anos seguintes, o desenvolvimento do mercado dessa enzima foi lento, até que em 1999 foi descoberto que a *Escherichia coli* produzia uma fitase mais eficiente do que a fúngica (DERSJANT-LI et al., 2015; HEGEMAN e GRABAU, 2001; HA et al., 1999; RODRIGUEZ et al., 1999a; RODRIGUEZ et al., 1999b). A partir disso, a suplementação de fitase na dieta de aves e suínos tornou-se uma realidade, e estima-se que o mercado da fitase movimente mais de 350 milhões de dólares por ano, com crescimento anual de 10% (CHEN et al., 2015; LEI et al., 2013).

### **1.2.1 Fontes e caracterização das principais fitases utilizadas na nutrição animal**

As fitases podem ser derivadas de diversas fontes que incluem plantas, animais e microrganismos (bactérias, leveduras e fungos). Contudo as fontes microbianas se mostraram candidatas mais promissoras para a produção de fitase em escala comercial (RAO et al., 2009; SINGH e SATYANARAYANA, 2011; VATS e BANERJEE, 2004). Tratando-se do início do local de desfosforilação e mecanismo catalítico, as fitases podem ser classificadas em diferentes categorias. De acordo com Cosgrove (1970), as fitases podem ser divididas em três grupos quanto ao início do local de desfosforilação. 3 – fitase (EC 3.1.3.8): isoladas de *Aspergillus niger*, *Neurospora crassa*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* sp, essa categoria de fitase inicia a hidrólise do AF no terceiro grupo fosfato (SAJIDAN et al., 2004). 6 – fitase (EC 3.1.3.26): extraídas de *Escherichia coli*, *Peniophora lycij*, *Paramecium*, entre

outros. Essa enzima inicia a hidrólise do fitato no sexto grupo fosfato do anel do inositol (GREINER et al., 1993; VAN DER KAAJ e VAN HAASSTERT, 1995). 5 – fitase (EC 3.1.3.72): origem à partir da alfafa (*Medicago sativa*), feijão (*Phaseolus vulgaris*) e ervilha (*Pisum sativum*). Iniciam a hidrólise do fosfato no quinto grupo do anel do inositol. Em relação ao mecanismo catalítico, pode-se classificar as fitases em três categorias: histidina ácido fosfatase ou fosfatase ácida (EC 3.1.3.2); fitase  $\beta$  - hélice (EC 3.1.3.8), e fosfatases ácidas roxas ou fitases de cisteína (EC 3.1.3.2) (TYE et al., 2002).

As fitases EC 3.1.3.8 e EC 3.1.3.26 são fosfatases ácidas amplamente caracterizadas (VATS e BANERJEE, 2004). Os membros desse grupo possuem conservado o sítio ativo RHGXPXP, que é exclusivo dessa classe de enzimas, apresentando alto peso molecular que hidrolisam os fosfomonoésteres (ULLAH et al., 1991; VAN ETTEN et al., 1991). As fosfatases ácidas reagem com a forma livre de 'metal-fitato' sob condição de pH ácido (OH et al., 2004), e a hipótese mais aceita é que elas hidrolisam o AF em seguimentos anteriores ao duodeno, acarretando em fosfatos de mio-inositol menores, os quais possuem menor capacidade de quelatar e indisponibilizar nutrientes (NAVES, 2014).

Ao longo dos anos, novas fitases vêm sendo lançadas no mercado, obtidas à partir de diferentes fontes, apresentando maior atividade e resistência ao passar pelo trato digestório do animal, e este é o caso da fitase híbrida.

### **1.2.2 Fitase híbrida (Natuphos<sup>®</sup> E - BASF)**

Segundo o fabricante, a Natuphos<sup>®</sup> E [EC 3.1.3.26] é uma nova molécula de enzima, de origem bacteriana, criada a partir de um método exclusivo de engenharia enzimática (Figura 4). Essa nova tecnologia resultou em grande estabilidade do produto, projetado especificadamente para decompor o fitato em locais específicos do trato gastrointestinal.

A liberação de fósforo mediada por essa fitase ocorre principalmente no trato digestivo superior de suínos e aves, local com pH fisiológico variando entre 2,0 a 5,5, e a atividade ótima da Natuphos<sup>®</sup> E corresponde perfeitamente nessa faixa de pH (Figura 5).

A superioridade das fitases bacterianas já é conhecida, e é fundamentada pelas suas propriedades biológicas diferenciadas, como a especificidade ao substrato, maior atividade catalítica, amplitude de faixa de pH e resistência à

proteólise (KONIETZNY e GREINER, 2004; WYSS et al., 1999). Essas características juntamente com as condições compatíveis entre o trato gastrointestinal das aves e a atividade ótima da enzima bacteriana (AUGSPURGER e UGALDE, 2009), explica a melhor eficiência dessas fitases.

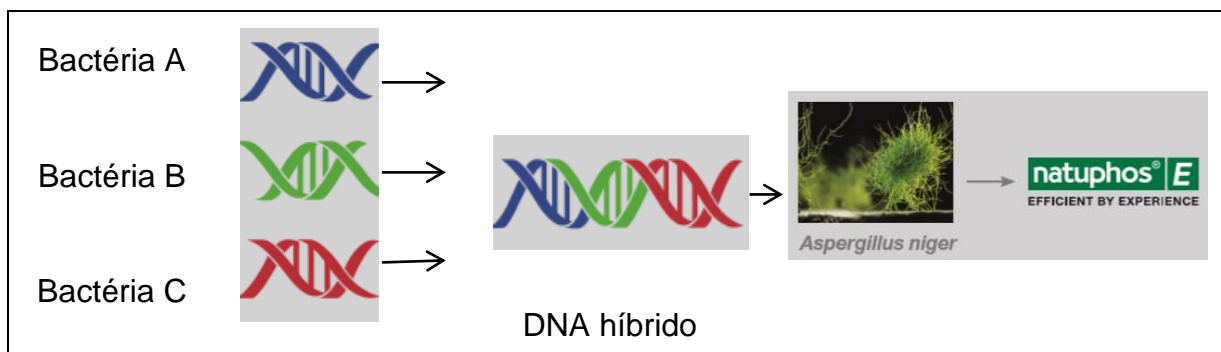


Figura 4 - Nova 6-fitase híbrida (Natuphos® E - BASF).

Fonte: Adaptado de BASF (<https://nutrition.basf.com/en/Animal-nutrition/Natuphos-E.html>).

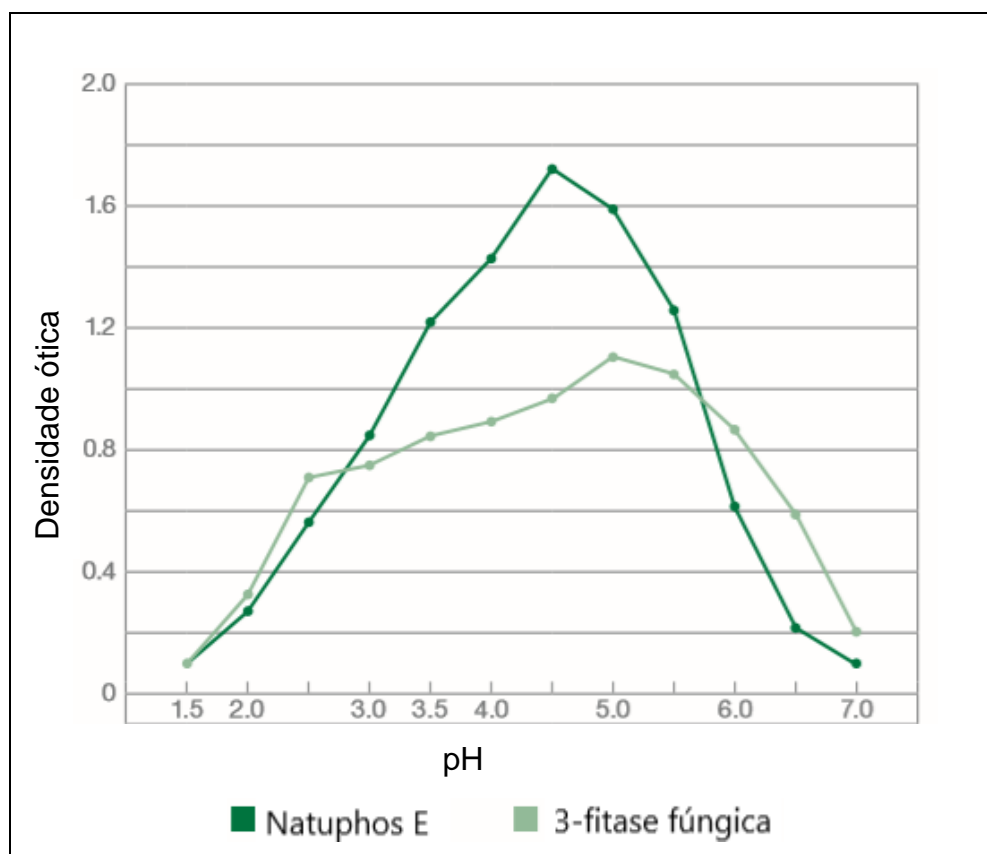


Figura 5 - Perfil da faixa de pH da Natuphos® E.

Fonte: Adaptado de BASF (<https://nutrition.basf.com/en/Animal-nutrition/Natuphos-E.html>).

Acredita-se que a fitase híbrida seja superior a outras fitases (bacterianas e fúngicas), pois através da engenharia genética obteve-se um produto com



características únicas, já que essa enzima é produzida através da união do DNA de três bactérias, e sua expressão é realizada através do fungo *Aspergillus niger*. Além disso, o fornecedor garante que a molécula da fitase híbrida é protegida através de um processo sofisticado, para suportar a peletização que ocorra até 95°C, tornando o produto altamente estável a esse processamento.

Um conceito que deve estar claro, é que independentemente da fitase utilizada, ela irá melhorar o aproveitamento do fósforo fítico quando suplementada na dieta. Contudo, já é conhecido que o efeito da fitase deve ser estendido para outros nutrientes, pois com a hidrólise do fitato, ele se torna menos reativo para quelatar outros compostos, como minerais, proteínas e carboidratos (OLUKOSI et al., 2008; SLOMINSKI, 2011), além do possível efeito sinérgico que ocorre, por exemplo, com as carboidrases, que ao hidrolisarem os polissacarídeos não amiláceos (PNA's), aumentam a acessibilidade da fitase ao fitato (WOYENGO e NYACHOTI, 2011).

### **1.3 Efeito antinutritivo dos polissacarídeos não amiláceos (PNA's)**

Os PNA's são alguns dos fatores antinutricionais presentes nos ingredientes vegetais, classificados como fibras com grupos heterogêneos de polissacarídeos, com diferentes estruturas, tamanho e solubilidade (RAZA et al., 2019). Neste grupo estão inseridos a celulose, hemicelulose (arabinoxilanos),  $\beta$ -glucanos, frutanos, etc, sendo que a celulose, arabinoxilanos e  $\beta$ -glucanos compreendem a maior parte da fibra em grãos de cereais utilizados na alimentação de aves (KNUDSEN, 1997).

Segundo Raza et al. (2019) a celulose é uma fibra insolúvel em água, sendo que sua molécula é composta por glicoses ligadas entre si por ligações ( $\beta$  1-4). Os arabinoxilanos são compostos por um esqueleto linear de unidades de xilose com ligações  $\beta$  (1-4), com cadeias laterais de arabinose e outros açúcares ligados ao carbono 2, 3 ou 5 na xilose. Os  $\beta$ -glucanos são polissacarídeos  $\beta$ -D-glicose, com ligações glicosídicas  $\beta$  (1-3) e  $\beta$  (1-4).

Os efeitos antinutricionais relacionados aos PNA's atuam através de diversos mecanismos de acordo com a solubilidade. Porções solúveis da fibra atuam aumentando a viscosidade intestinal, pois elas reagem com o glicocálix da borda em escova das células intestinais, aumentando a produção de géis viscosos que diminuem a taxa de difusão de enzimas e substratos digestivos, por consequência da interação prejudicada na superfície da mucosa (CHOCT et al., 1996). Além disso,

a baixa tensão de oxigênio no intestino delgado da ave, na situação de aumento da viscosidade, favorecerá a proliferação de microflora anaeróbica (bactérias patogênicas), que deixará de ser aeróbica ou anaeróbica facultativa, para estritamente anaeróbica (RAZA et al., 2019). Nas figuras 6 A e B é possível visualizar uma ilustração adaptada da revisão realizada por Raza et al. (2019), que de forma simplificada demonstra as alterações no ambiente intestinal na presença ou não de PNA's solúveis.

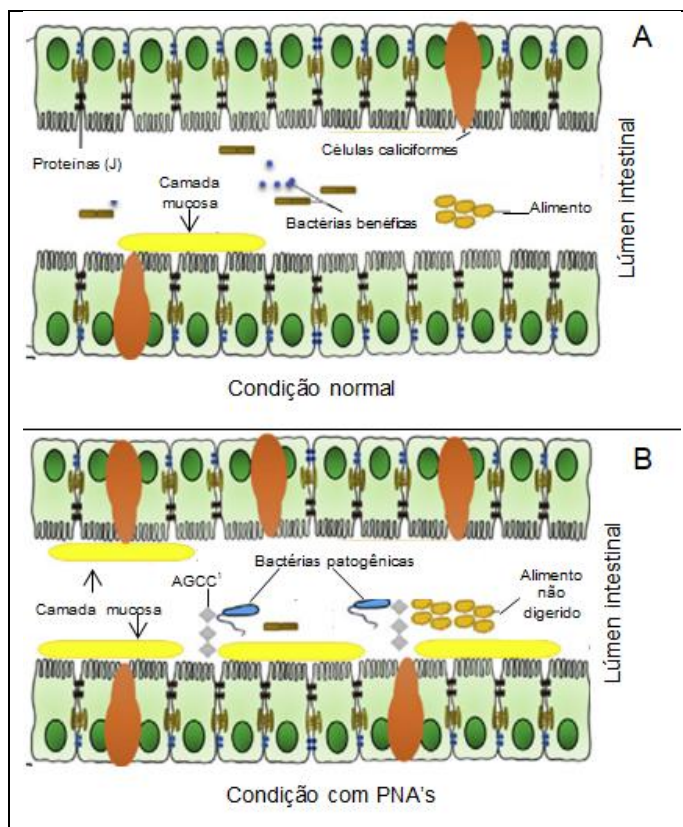


Figura 6 – (A): Ambiente intestinal em condição normal (sem a presença de PNA's); (B): Ambiente intestinal na presença de PNA's.

Fonte: Adaptado de Raza et al. (2019).

Em relação às porções de fibras insolúveis, a redução no aproveitamento dos nutrientes ocorre por outra via. O amido, a gordura e as proteínas permanecem encapsulados na matriz insolúvel da parede celular, ocorrendo a formação de uma barreira, que limita o acesso do conjunto de enzimas aos substratos (SLOMINSKI et al., 1993; THEANDER et al., 1989).

As aves produzem carboidrases, contudo elas são específicas para carboidratos com ligação alfa ( $\alpha$ ), como as encontradas no amido, não atuando sobre carboidratos fibrosos com ligações  $\beta$  e oligossacarídeos contendo galactose,

<sup>1</sup>AGCC – ácido graxo de cadeia curta

rafinose e estaquiose. Por isso PNA's não podem ser aproveitados por esses animais (RAZA et al., 2019), tornando a suplementação das dietas com carboidrases uma ferramenta para reduzir os efeitos deletérios desses compostos.

#### **1.4 Xilanase e glucanase na dieta de aves**

Segundo Choct et al. (1996), durante a degradação dos PNA's pela xilanase exógena, xilo-oligossacarídeos são liberados no intestino delgado e fermentados pela microbiota intestinal, restando ao final do processo, ácidos graxos voláteis, que posteriormente são utilizados como substrato para a produção de energia para os frangos. Contudo, Cowieson e Masey O'neill (2013) afirmam que os ácidos graxos apesar de contribuírem com algum valor energético, talvez mais importante do que isso seja a redução do pH que ocorre a nível intestinal, restringindo o aumento de organismos putrefativos, favorecendo a proliferação de enterócitos, e mediando o esvaziamento gástrico. Além disso, a eficiência da xilanase é influenciada diretamente pelo microbioma intestinal, e é possível que todas essas reações sejam cumulativas, conforme ocorre a adaptação da microbiota de acordo com o substrato presente.

As endo-glucanases clássicas (EC 3.2.1.4) clivam aleatoriamente ligações glicosídicas  $\beta$  (1-4) no interior das cadeias celulolíticas (WILSON, 2012), liberando  $\beta$ -celobiose como produto final (RAZA et al., 2019). Até que ocorra a liberação de glicose existe a ação de outras enzimas, as exo-glucanases (EC 3.2.1.74) que atuam nas ligações O-glicosídicas internas, resultando em cadeias de glucanas de diferentes comprimentos, e as  $\beta$ -glucosidases (EC 3.2.1.21), que atuam especificamente nos dissacarídeos da  $\beta$ -celobiose produzindo glicose (BAYER et al., 1994).

Na figura 7 é apresentado um esquema simplificado adaptado de uma revisão publicada por Raza et al. (2019), onde é possível visualizar a distribuição das fibras no grão e os substratos de ação da xilanase e glucanase.

É muito complexo abordar a eficiência enzimática, pois são muitos os fatores que influenciam sua resposta, desde a própria enzima (fonte, atividade catalítica específica, resistência à ação proteolítica da pepsina), características do substrato (concentração e acessibilidade) e condições do trato digestivo (teor de umidade, pH, tempo em que a digesta permanece na fase gástrica, etc) (RAVINDRAN, 2013). Contudo, ao tratar da suplementação de carboidrases em dietas à base de milho e

farelo de soja, um questionamento muito pertinente é sobre a eficiência dessas enzimas, baseado na composição da dieta, já que a quantidade de PNA's presente nesses ingredientes é baixa, o que não causaria problemas digestivos nas aves (RAZA et al., 2019; SLOMINSKI, 2011).

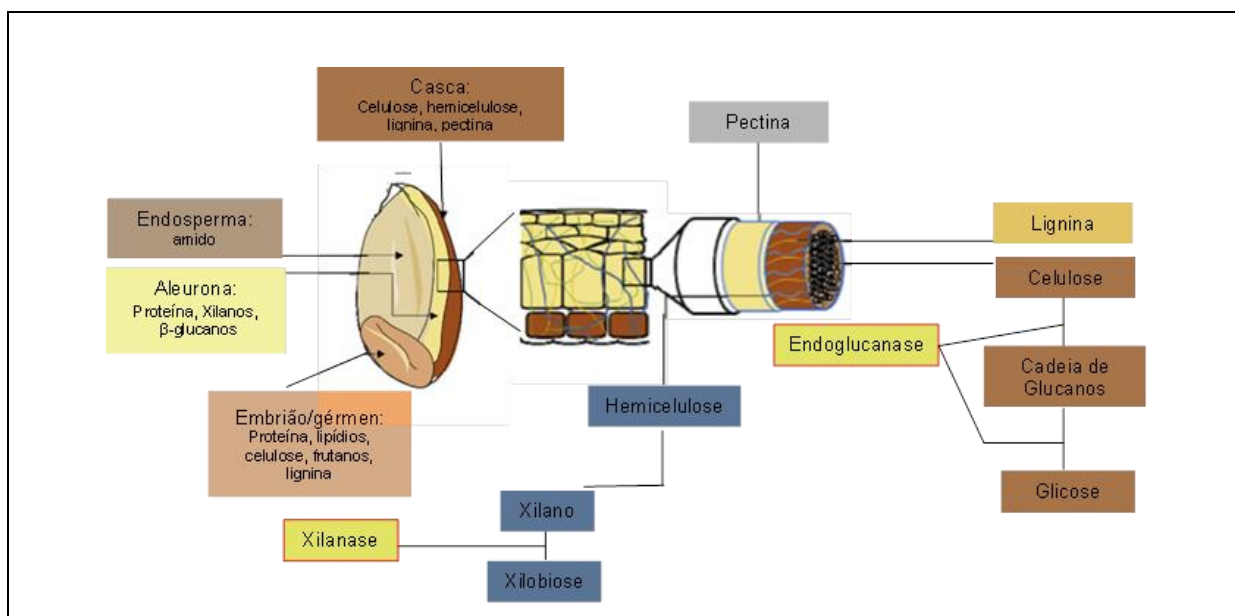


Figura 7 – Distribuição das fibras dietéticas nos grãos e os locais de ataque das enzimas xilanase e glucanase.

Fonte: Adaptado de Raza et al. (2019).

Arabinoxilanos e β-glucanos são solúveis em água, contudo os arabinoxilanos presentes no milho apresentam baixo peso molecular e baixa concentração de β-glucanos. O farelo de soja contém níveis baixos de arabinogalactanos, galactanos, xilanos e β-glucanos como componentes estruturais das paredes celulares (KNUDSEN, 1997; SLOMINSKI, 2011). Obviamente, resultados mais expressivos são esperados quando as carboidrases são suplementadas em dietas com maior quantidade de substrato para a sua ação, como quando são utilizadas em uma matriz dietética contendo trigo, centeio, cevada, entre outros.

Dietas com altas concentrações de PNA's atingem uma digestibilidade em torno de 75%, podendo haver uma melhora na digestão dos nutrientes entre 25 a 35%, quando ocorre a suplementação enzimática. Dietas à base de milho e farelo de soja são consideradas altamente digestíveis, atingindo valores entre 85 a 90% de aproveitamento do amido, proteína e lipídeos, assim a ação das carboidrases é menor (RAVINDRAN, 2013). Portanto, dietas com menor quantidade de substrato para ação enzimática, conseqüentemente apresentarão menor capacidade de resposta. Mesmo o milho e farelo de soja apresentando baixas quantidades de

PNA's, a suplementação de carboidrases para essa matriz nutricional é uma realidade. Trabalhos atuais como de Allouche et al. (2015) e Stefanello et al. (2016), demonstraram a eficiência de carboidrases quando suplementadas em dietas à base de milho e farelo de soja, sobre a digestibilidade de nutrientes e da energia.

De maneira geral, ao adicionar enzimas exógenas na dieta de não ruminantes, os efeitos dos fatores antinutricionais são reduzidos, e ocorre o aumento da disponibilidade de minerais, proteína e energia (LIMA, 2005). Devido a esse comportamento, uma prática aplicada na nutrição de aves, é a reformulação das dietas contando com a contribuição de nutrientes provenientes da ação enzimática (PASQUALI et al., 2017). Tratando-se da suplementação dietética de fitase e carboidrases, a diminuição de minerais como Ca e P e da energia são comuns, e quando considera-se o uso dessas enzimas associadas, pode-se prever um efeito potencializado devido a ação sinérgica entre elas (WOYENGO e NYACHOTI, 2011).

### **1.5 Ca e P: exigências, redução nutricional e suplementação da fitase**

Alguns nutrientes, por desempenharem diversas funções essenciais, são tidos como prioritários quando se trata da formulação de dietas para aves, como é o caso do Ca e P. Esses dois minerais participam da formação óssea e são cofatores enzimáticos. O Ca é imprescindível no processo de coagulação sanguínea, formação da casca dos ovos, e na função dos nervos e músculos (KLASING, 1998). Enquanto o P apresenta função importante no sistema nervoso, é componente da casca dos ovos, fosfolipídeos e ácidos nucleicos, além de ser mediador do metabolismo energético através do ATP (LI et al., 2016).

Considerando que os grãos de cereais mais utilizados na alimentação de aves apresentam conteúdo de Ca baixo, e quantidade de P alta (no formato de fitato), biologicamente indisponível para o animal (LI et al., 2017), a suplementação dietética desses nutrientes é uma prática rotineira na produção avícola. Fontes inorgânicas de P, altamente digeríveis, são adicionadas nas dietas (LIU et al., 2013), porém acrescentam uma parcela substancial aos custos da alimentação, são fontes esgotáveis (RIBEIRO et al., 2019), e o excesso do P liberado no ambiente pelas excretas das aves, acarreta no aumento da poluição ambiental (LI et al., 2016). As fontes de suplementação do Ca em geral são mais baratas do que as de P, acarretando em uma menor preocupação em determinar os requerimentos do Ca, ocasionando no uso em excesso desse mineral nas dietas (POWELL et al., 2011).

Além disso, os requisitos para a determinação dos requerimentos de Ca e P ainda são mal definidos, já que ocorre grande variabilidade nos critérios estabelecidos (genótipo, idade da ave, ingredientes, uso de enzimas) (LI et al., 2017).

O primeiro estudo relatando a quantificação dietética de Ca e P em frangos em crescimento para um adequado desenvolvimento ósseo foi realizado por Wilgus (1931). Ele verificou que a quantidade mínima de P disponível era de 0,5%, com uma razão de Ca:P entre 1,0:1,0 e 2,2:1,0. A partir daí muitas pesquisas foram realizadas para estabelecer os requerimentos de Ca e P para as aves, e atualmente segundo as Tabelas Brasileiras de Aves e Suínos (2017), o requerimento de P disponível para frangos machos com desempenho regular varia de 0,480% (1-7 dias), atingindo o valor de 0,277% aos 42 dias. Para o Ca as quantidades variam de 1,006% (1-7 dias), e aos 42 dias chega a um requerimento de 0,594%.

As interações existentes entre o Ca e P são extremamente importantes para a definição das exigências desses minerais, ainda mais que eles apresentam uma relação antagônica no ambiente intestinal (LIU et al., 2013). Pode-se esperar a formação de complexos entre Ca e o AF no intestino delgado da ave (SELLE et al., 2009), pelo aumento do pH gastrointestinal que irá impactar também na redução da atividade da pepsina no proventrículo e moela (GUINOTTE et al., 1995; WALK et al., 2012). Foi relatado por Tamim e Angel (2003) em estudo com frangos, a influência do Ca sobre a capacidade endógena das aves em utilizar o fitato. Os autores observaram que os animais foram capazes de hidrolisar 69% do fitato quando receberam dietas com 0,2% de Ca. Contudo, quando os frangos foram alimentados com 0,5% de Ca, a hidrólise do fitato foi reduzida para 25%.

A ampla adoção do uso da fitase nas dietas renovou os interesses em determinar as exigências de Ca e P, já que de forma geral é aceito que o teor de P disponível pode ser reduzido em 0,1%, ou mais em dietas para frangos suplementadas com fitase (SLOMINSKI, 2011). Porém, nos últimos anos, novas fitases foram lançadas no mercado, apresentando maior atividade e resistência aos processos térmicos como a peletização, o que aumenta a sua eficiência. Além de que, o uso de outras enzimas associadas à fitase, como as carboidrases, apresenta um potencial melhorador na liberação de P do fitato, potencializando a ação da fitase, pois ao hidrolisar os PNA's, libera o fitato para ação enzimática (COWIESON et al., 2009b).

## 1.6 Associação da fitase com carboidrases e custos de produção

Uma prática muito utilizada na formulação de dietas para aves quando são suplementadas com enzimas, é a valorização de alguns nutrientes, ou seja, por considerar a ação enzimática, o nutricionista, baseado nas recomendações do fabricante, realiza redução dos níveis de alguns ingredientes que compõem a matriz nutricional da ração.

Ao suplementar dietas com fitase, pode-se considerar a contribuição da enzima para alguns nutrientes, como P, Ca, energia e aminoácidos, e essas formulações permitem a redução de alguns ingredientes como calcário, fosfatos, farelo de soja, entre outros, contribuindo assim para a diminuição no custo com alimentação (SHELTON et al., 2004). Contudo, é de extrema importância que a matriz aplicada seja realista no ambiente comercial em que é empregada (BEDFORD et al., 2016), e no momento em que ocorre a associação da fitase com carboidrases, uma resposta aditiva das enzimas pode ser esperada, ampliando ainda mais as reduções nutricionais aplicadas.

As carboidrases ao serem suplementadas nas dietas estarão atuando de duas formas, (a) liberando ao final de uma cadeia de reações, nutrientes encapsulados na parede celular; (b) reduzindo a viscosidade intestinal, mantendo o ambiente adequado para a proliferação de microflora benéfica, melhorando de maneira geral o acesso e ação das enzimas aos respectivos substratos (BEDFORD e SCHULZE, 1998). E devido a esses fatores é que as xilanases (hemicelulases) e  $\beta$ -glucanases (celulases) melhoram a digestibilidade da proteína, energia metabolizável aparente, consumo de ração, ganho de peso e conversão alimentar (RAZA et al., 2019).

Diversos estudos como os realizados por Olukosi e Adeola (2008), Olukosi et al. (2008) e Williams et al. (2014), demonstraram que o uso de carboidrases como xilanase, amilase e glucanase melhorou a disponibilização da energia e o desempenho de frangos. E mesmo, quando a suplementação de carboidrases ocorreu em dietas com baixas concentrações de PNA's, como é o caso de dietas à base de milho e farelo de soja, o uso dessas enzimas pode maximizar a magnitude das repostas (COWIESON et al., 2010). Contudo, para que os resultados sejam satisfatórios, é necessário atribuir um valor energético para as preparações enzimáticas (carboidrases), a fim de realizar com precisão as reduções nas quantidades dos ingredientes (MASEY O'NEILL et al., 2012).

Cowieson e colaboradores (2010), testando a ação da xilanase e glucanase em dietas para frangos, à base de milho e farelo de soja, realizaram reduções na energia, através da diminuição das quantidades do óleo de soja. Ao final do estudo (42 dias), os autores afirmaram que a redução da densidade energética das dietas associada à suplementação de xilanase e/ou glucanase, foi benéfica para frangos jovens, que apresentaram taxa de conversão alimentar equivalente aos animais alimentados com a dieta controle (sem enzimas). Apesar dos autores abordarem sobre o uso de carboidrases e a redução dos custos da alimentação, nenhum resultado foi apresentado.

Allouche et al. (2015) utilizando uma mistura comercial de enzima – CE - (xilanase, glucanase, protease e amilase) associada com dietas hipocalóricas, verificaram a redução no consumo de ração dos frangos alimentados com o CE (-13,68%) em relação às aves que receberam a dieta controle sem enzimas. Como conclusão do estudo, os autores afirmam que a adição do CE permite que os frangos sejam produzidos com um menor custo.

Em estudo realizado por Rios et al. (2017), os autores confirmaram que o uso de um complexo enzimático composto principalmente por xilanase e glucanase, melhorou a utilização da energia em dietas à base de milho e farelo de soja com redução de 120 kcal/kg, diminuição de 6% na energia metabolizável aparente da dieta em relação ao tratamento controle, aplicando a redução principalmente do óleo na matriz das dietas. Apesar desses resultados, o referido trabalho não apresentou resultados sobre o custo das dietas.

Baseado no exposto é relevante considerar o uso estratégico das carboidrases para a redução dos custos das dietas, mesmo quando a matriz nutricional for à base de milho e farelo de soja, pois a suplementação pode maximizar o aproveitamento das baixas concentrações dos PNA's desses ingredientes (BEDFORD, 2000; CHOCT, 2006; COWIESON et al., 2010). Além disso, ao associar as carboidrases com a fitase, pode-se esperar uma ação aditiva entre elas, aumentando a eficiência de ambas.



## **Capítulo 2**

---

Fitase híbrida e carboidrases em dietas à base de milho e farelo de soja para frangos de corte: digestibilidade de nutrientes e qualidade óssea

## 2.1 Introdução

Diversos aditivos podem ser adicionados na dieta de aves com o objetivo de aumentar a digestibilidade e absorção dos nutrientes, esse é o caso das enzimas. De forma geral pode-se afirmar que elas destroem os fatores antinutricionais dos alimentos e aumentam a biodisponibilidade dos nutrientes (LU et al., 2017).

Ao utilizar enzimas nas rações das aves é possível considerar duas vias de suplementação: *on top*, onde não é estabelecida uma contribuição nutricional da atividade enzimática sobre os nutrientes, ou quando essa contribuição é considerada, exigindo a reformulação da matriz dietética (PASQUALI et al., 2017). A grande vantagem da suplementação enzimática realizando reduções nutricionais nas dietas é a possibilidade de limitar a entrada de ingredientes com alto custo na matriz, diminuindo o custo das rações sem que ocorram perdas no desempenho dos animais (ROMERO et al., 2014). Além disso, reduzir a quantidade de alguns nutrientes a limites marginais quando ocorre a suplementação de enzimas nas dietas é essencial para obter-se resultados satisfatórios (RAVINDRAN, 2014).

Diversas pesquisas como as realizadas por Meng e Slominski (2005) e Yu e Chung (2004), demonstraram que a suplementação de xilanase e  $\beta$ -glucanase em dietas para frangos à base de milho e farelo de soja são capazes de compensar a redução na energia metabolizável. Este fato pode ser explicado pela hidrólise dos polissacarídeos que acontece quando as dietas são suplementadas com carboidrases, descapsulando nutrientes e propiciando a utilização da energia, que de outra forma não seria aproveitada (ZOU et al., 2013). Tratando-se da fitase, ocorre um comportamento semelhante, pois quando ela é adicionada em dietas com redução dos níveis de P ocorre um aumento na digestibilidade desse mineral (BEIKI et al., 2013). Além de compensar a deficiência dietética nos níveis de fósforo (P), a suplementação de fitase reduz a capacidade dele se complexar com cátions divalentes, como o cálcio (Ca), manganês (Mn), magnésio (Mg), ferro (Fe) e zinco (Zn), melhorando a disponibilidade desses minerais (NEWMAN, 1991).

A prática do uso de enzimas nas dietas de aves vem se consolidando ao longo dos anos, sendo que o setor produtor de enzimas, cada vez mais moderno, lança no mercado produtos mais resistentes aos processamentos das rações e às condições adversas do trato gastrointestinal. No caso das fitases existe a bacteriana de origem híbrida, que melhora a utilização do P e de outros nutrientes ligados ao fitato (TORRALLARDONA et al., 2017). Desta forma, se faz necessário

estabelecer novas pesquisas para determinar a eficiência desse produto.

Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar diferentes matrizes dietéticas com reduções nutricionais de energia metabolizável, Ca e P disponível (Pdisp), suplementadas com uma fitase híbrida associada ou não à carboidrases específicas (xilanase+glucanase), sobre a digestibilidade de nutrientes e qualidade óssea de frangos de corte.

## **2.2 Materiais e métodos**

O experimento foi conduzido no Setor Experimental de Aves, na Embrapa Suínos e Aves – CNPSA, em Concórdia, SC, Brasil. O projeto foi aprovado pela Comissão de ética no uso de animais da Embrapa e registrado com o número 006-2017.

### **2.2.1 Animais e tratamentos**

Um total de 1875 frangos de corte machos com um dia de idade da linhagem *Cobb 500* foram alojados em boxes com cama de maravalha de pinus, equipados com comedouros tubulares, bebedouros tipo *nipple* (cinco/boxe), e aquecimento elétrico através de campânulas.

As aves apresentaram peso médio inicial de  $46,9 \pm 3,7$  g e foram distribuídas ao acaso em cinco tratamentos, com 15 repetições de 25 aves cada, alojadas em boxes com dimensões de 1,65m x 1,70m, totalizando 2,80 m<sup>2</sup> (unidade experimental). As dietas experimentais apresentaram matrizes nutricionais distintas, sendo uma dieta controle positivo (atendendo as exigências nutricionais das aves), e dietas com reduções de EM de 70 e 100 kcal/kg e reduções fixas de 0,16% Ca e 0,15% Pdisp, com ou sem a suplementação de uma fitase híbrida (500 FTU/kg), xilanase (560 TXU/kg) e glucanase (250 TGU/kg) conforme pode ser observado na Tabela 1.

A valorização de 500 FTU/kg da fitase híbrida de 70 kcal/kg de EM, 0,16% de Ca e 0,15% de Pdisp, foi aplicada de acordo com a recomendação do fabricante. Krabbe e colaboradores (2014) ao testarem o pacote de carboidrases contendo xilanase e glucanase (Naturgrain TS), verificaram um aumento de 32 kcal/kg na energia metabolizável em dietas à base de milho e farelo de soja. Assim, quando ocorreu a associação das enzimas a valorização energética utilizada foi de 100 kcal/kg.

Tabela 1: Tratamentos experimentais

Redução nutricional	Tratamentos				
	1	2	3	4	5
Energia (kcal/kg)		70	100	70	100
Ca (%)	*	0,16	0,16	0,16	0,16
P disponível (%)		0,15	0,15	0,15	0,15
Suplementação Enzimática					
Fitase (FTU/kg)	0	0	0	500	500
Xilanase (TXU/kg)	0	0	0	0	560
Glucanase (TGU/kg)	0	0	0	0	250

\*Controle positivo. De acordo com as recomendações das Tabelas Brasileiras de Aves e Suínos (2011) – frangos machos visando desempenho regular de acordo com quatro fases de criação: Pré- inicial (1-7dias) – 2925 kcal/kg, 0.92% Ca, 0.47 % Pd; Inicial (8-21dias) – 2980 kcal /kg, 0.86% Ca, 0.38% Pd; Crescimento (22-35dias) – 3050 kcal/kg, 0.75% Ca, 0.33% Pd.

## 2.2.2 Enzimas

### 2.2.2.1 Fitase

Foi utilizada a fitase híbrida de origem microbiana, mio-inositol-hexaquisfosfato-beta-fosfohidrolase [EC 3.1.3.26] (Natuphos E<sup>®</sup> 10.000 G – BASF SA), granulada, contendo 10,000 FTU/g de atividade de fitase. Sua atividade em unidade de FTU, é definida como a quantidade de enzima que libera 1 µmol de fósforo inorgânico/min à partir de 0,0051 mol/L de fitato de sódio, sob pH 5,5 e temperatura de 37°C.

De acordo com o fabricante, esta nova molécula foi criada através de um método único, originando uma fitase híbrida, criada à partir de três bactérias, conferindo ao produto maior resistência, às condições de pH ácido, ao ataque de proteases endógenas e também ao processo de peletização (até 95°C).

### 2.2.2.2 Carboidrases

As carboidrases utilizadas possuem atividade sobre as ligações Endo-1,4-beta-xilanase [EC 3.2.1.8] e Endo-1,4-beta-glucanase [EC 3.2.1.4]. Ambas as enzimas são produzidas a partir de *Aspergillus niger* (Natugrain<sup>®</sup>TS – BASF SA). Segundo o fabricante, a unidade de endo xilanase (TXU) é definida como a quantidade de enzima que libera a quantidade de 5 µmol de açúcar redutor, medidos como xilase equivalente por minuto de uma solução contendo 1g de arabinoxilano

por 100ml, a um pH 3,5 e temperatura de 40°C.

Uma unidade de endo glucanase (TGU) é definida como a quantidade de enzima que libera 1 µmol de açúcar redutor, medidos como glicose equivalente por minuto de uma solução contendo 0,714g de beta glucano por 100 ml a um pH 3,5 e temperatura de 40°C.

### **2.2.2.3 Atividade enzimática**

As amostras das dietas foram encaminhadas para o Laboratório CBO, que fica localizado em Valinhos/SP, para a avaliação da atividade enzimática.

Para o tratamento 4 (dose de 500 FTU/kg de fitase), a recuperação nas dietas experimentais conforme as fases de criação foi: Pré-inicial - (420 FTU); Inicial - (440 FTU); e Crescimento - (510 FTU). Para o tratamento 5 (dose de 500 FTU/kg de fitase, 560 TXU/kg de xilanase e 250 TGU/kg de glucanase), a recuperação das enzimas nas dietas por fase foram: Pré-inicial - (440 FTU; 529 TXU; 322 TGU); Inicial – (480 FTU; 579 TXU; 290 TGU); e Crescimento – (470 FTU; 540 TXU; 321 TGU).

### **2.2.3 Programa alimentar**

Foi utilizado um programa alimentar de três fases, sendo: pré-inicial (1 até 7 dias), inicial (8 até 21 dias) e crescimento (22 até 28 dias). As dietas foram peletizadas (80°C por 20 segundos), e fornecidas trituradas, tendo a composição e o perfil nutricional descritos na Tabela 2.

### **2.2.4 Variáveis analisadas**

Para as avaliações da digestibilidade dos nutrientes e qualidade óssea, foram abatidos aos 28 dias de idade três aves por unidade experimental ( $\pm 5\%$  do peso médio do boxe).



Perfil nutricional									
EMAn, kcal/kg	2925 <sup>1</sup>	2855	2825	2980 <sup>1</sup>	2910	2880	3050 <sup>1</sup>	2980	2950
Proteína Bruta %	23,65	23,65	23,65	22,14	22,14	22,14	22,01	22,03	22,03
Gordura, %	5,72	4,94	4,60	5,95	5,17	4,83	6,99	6,20	5,86
Fibra Bruta, %	3,17	3,17	3,17	3,05	3,05	3,05	3,05	3,05	3,05
P disponível, %	0,47 <sup>1</sup>	0,32	0,32	0,38 <sup>1</sup>	0,23	0,23	0,33 <sup>1</sup>	0,18	0,18
P Total, %	0,74	0,58	0,58	0,64	0,49	0,49	0,59	0,44	0,44
Ca,%	0,92 <sup>1</sup>	0,76	0,76	0,86 <sup>1</sup>	0,70	0,70	0,75 <sup>1</sup>	0,59	0,59
Lisina digest %	1,30	1,30	1,30	1,14	1,14	1,14	1,09	1,09/1,14	1,09/1,14
Met+Cist digest %	0,93	0,93	0,93	0,82	0,82	0,82	0,76	0,76/0,82	0,76/0,82
Metionina digest %	0,59	0,59	0,59	0,49	0,49	0,49	0,43	0,43/0,49	0,43/0,49
Treonina digest %	0,84	0,84	0,84	0,74	0,74	0,74	0,73	0,73/0,74	0,73/0,74
Triptofano digest %	0,26	0,26	0,26	0,24	0,24	0,24	0,25	0,25/0,24	0,25/0,24

<sup>1</sup>Segundo as recomendações das Tabelas Brasileiras de Aves e Suínos (2011) – frangos machos visando desempenho regular; <sup>2</sup>cálcio: mínimo de 210g/kg, máximo de 250g/kg; fósforo: 180g/kg; <sup>3</sup>mínimo de cálcio 33%; <sup>4</sup>sequestrante de micotoxina – aluminossilicatos, parede de levedura, carbono ativado; <sup>5</sup>Composição do produto (níveis de garantia por kg do produto): Vit A = 11.000.000 U.I.; Vit D3 = 4.000.000 U.I.; Vit E = 55.000 U.I.; Vit K3 = 3.000 mg; Vit B1 = 2.300mg; Vit B2 = 7.000 mg; Ácido Pantotênico = 12 g; Vit B6 = 4.000 mg; Vit B12 = 25.000 mcg; Ácido Nicotínico = 60 g; Ácido Fólico = 2.000 mg; Biotina = 250 mg; Selênio = 300 mg. <sup>6</sup>Composição do produto (níveis de garantia por Kg do produto): Ferro = 100 g; Cobre = 20 g; Manganês = 130 g; Zinco = 130 g; Iodo = 2.000mg; <sup>7</sup>Natuphos® 10000G – 0,005kg/100kg de dieta; <sup>8</sup>Natugrain®TS – 0,010kg/100kg de dieta.

### 2.2.4.1 Digestibilidade dos nutrientes

Foi determinada utilizando o método da coleta ileal, adicionando o óxido crômico ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ) a todas as dietas experimentais em nível de 0,5% como indicador indigestível. As aves foram alimentadas durante sete dias com as dietas contendo o indicador, e no oitavo dia os frangos foram abatidos, os íleos foram expostos por incisão abdominal e um segmento de 20 cm terminando a 4 cm da junção íleo-cecal foi removido e os seus conteúdos coletados e congelados para posterior análise. O descongelamento foi realizado à temperatura ambiente e as digestas foram homogeneizadas, pesadas e submetidas à secagem por liofilização a vácuo ( $-50^\circ\text{C}$ ;  $-80\text{kPa}$ ) (VLP20, Thermo Fisher®) por 72 horas. A seguir, as amostras foram moídas em micro moinho (A11 BASIC – IKA®, São Paulo) e juntamente com as amostras das dietas experimentais, foram encaminhadas ao laboratório (Figura 1: A e B).



Figura 1: Fotografias (A) Amostras das dietas; (B) Amostras digestas liofilizadas.  
Fonte: Acervo pessoal.

Os teores de matéria seca (liofilizada na digesta – JJ Científica, Liofilizador LII0XX e gravimetria na ração/ IAL 012/IV), matéria mineral (gravimetria – (CBAA, 2009 - met 36), Ca (Analytical Methods - Flame Atomic Absorption Spectrometry - Varian), P (AOAC, 2012 - met 958.01), proteína (Dumas Protein Analyzer FP 628 - LECO), e energia bruta (bomba calorimétrica/ Leco Corporation/ AC500 Automatic Calorimeter), foram determinados nas dietas e digestas.

A determinação do  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ , através de espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP-OES), foi utilizada para a obtenção do fator de indigestibilidade (FI), que foi calculado através da fórmula abaixo:



$$(FI) = \frac{\text{Indicador na ração (\%MS)}}{\text{Indicador eliminado (\%MS)}}$$

A partir dos resultados laboratoriais, foram determinados os coeficientes de digestibilidade (CD) da matéria seca (MS), matéria mineral (MM), Ca, P, proteína bruta (PB) e os valores de energia metabolizável corrigida para nitrogênio (EMAn), de acordo com as fórmulas descritas por Sakomura e Rostagno (2007), que seguem abaixo:

$$CD (\%) = 100 - (FI \times \left( \frac{\text{Nutriente eliminado}}{\text{Nutriente na ração}} \right) \times 100)$$

Em que: FI é o fator de indigestibilidade;

$$BN = N \text{ dieta} - (N \text{ eliminado} * FI)$$

Em que: BN é o balanço de nitrogênio e N é nitrogênio;

$$EMAn (\text{kcal/kg de MS}) = EBR - [(EBD \times FI) \pm 8,22 \times BN]$$

Em que: EBR – energia bruta da ração, EBD – energia bruta da digesta;

#### 2.2.4.2 Qualidade óssea

As tíbias direitas e esquerdas dos três animais selecionados da unidade experimental foram extraídas para as avaliações de força de quebra (kgf), rigidez (kgf/mm) e flexibilidade (kg/sec), que foram determinadas através de um Texturômetro TA XT Plus (Texture Analyser, Technologies Corporation, USA), acoplado ao software Exponent (Stable Micro Systems) (Figura 2 A e B).

Após os resultados das análises físicas, os ossos foram secos em estufa a 105°C para a determinação da matéria seca (Instituto Adolfo Lutz, 2008). Após essa etapa, as tíbias foram encaminhadas para a análise de cinzas totais (CBAA, 2009). Ao final do processo de calcinação, as seis tíbias foram maceradas e armazenadas em sacos plásticos devidamente identificados e encaminhadas para a análise de Ca que foi determinada via absorção atômica (AOAC, 1995 - met. 965.17) e os conteúdos de P e Zn foram determinados pela análise de injeção de fluxo (AOAC, 1995 - met 965.17).

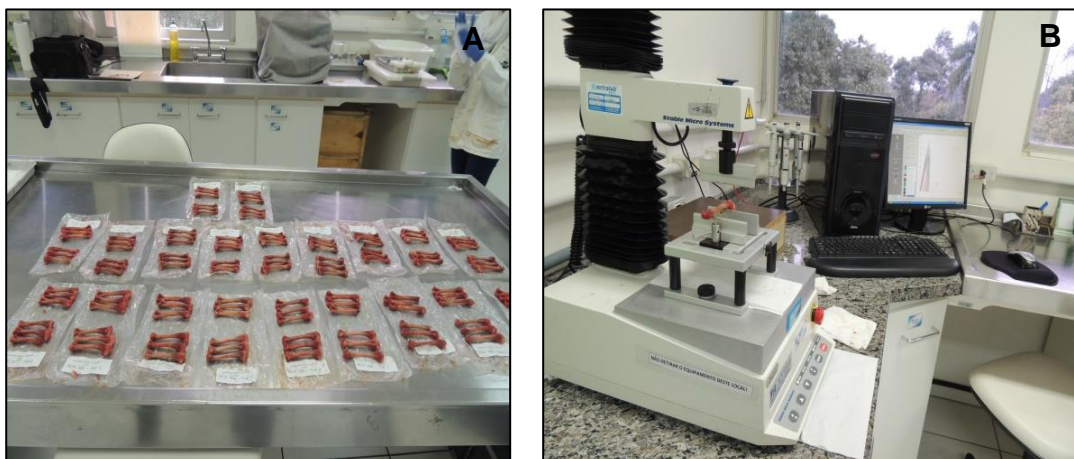


Figura 2: Fotografias (A) Preparação das tíbias para a realização das análises de qualidade óssea; (B) Texturômetro utilizado para as análises de força, rigidez e flexibilidade óssea.  
Fonte: Acervo pessoal

### 2.2.5 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA, e após utilizando o procedimento “LSM- least squares means”, as médias foram comparadas pelo teste de *Tukey*. Para todas as análises realizadas foi utilizado o pacote estatístico R (R CORE TEAM, 2015), com um nível de significância de 5%.

### 2.3 Resultados

Os resultados de EMAn e dos coeficientes de digestibilidade podem ser observados na tabela 3. A energia metabolizável foi afetada pelos tratamentos ( $P=0,01$ ). As dietas sem a suplementação enzimática contendo as reduções nutricionais de 70 e 100 kcal/kg, apresentaram diminuição da EMAn (T2: 3203 kcal/kg e T3: 3192 kcal/kg) em relação ao controle positivo (T1: 3368 kcal/kg) e aos tratamentos que contaram com a adição das enzimas (T4 e T5). O uso da fitase isolada (T4: 3273 kcal/kg) ou associada com as carboidrases (T5: 3216 kcal/kg) proporcionou a melhora na disponibilidade da energia, e as médias desses tratamentos equipararam-se ao valor obtido pelo T1.

Os coeficientes de digestibilidade ileal para a PB ( $P<0,0001$ ) foram melhorados pelo uso das enzimas, atingindo resultados semelhantes (T4: 84,17%; T5: 83,12%) ao T1 (85,02%). Para a MM ( $P<0,0001$ ), os resultados da suplementação enzimática foram superiores (T4: 37,73%; T5: 37,13%) aos

coeficientes encontrados para os tratamentos controle negativos (T2: 31,55%; T3: 33,11%). Em relação aos coeficientes de digestibilidade do P ( $P < 0,0001$ ), os valores obtidos para as dietas com adição das enzimas foram superiores (T4: 70,10%; T5: 72,48%) aos observados para o T1 (55,45%). O coeficiente de digestibilidade do Ca ( $P = 0,07$ ), não foi afetado pelos tratamentos.

Tabela 3: Valores da energia metabolizável corrigida para nitrogênio (EMAn) e dos Coeficientes de digestibilidade ileal da proteína bruta (PB), matéria seca (MS), matéria mineral (MM), cálcio (Ca) e fósforo (P), de frangos alimentados com dietas contendo uma fitase híbrida associada à carboidrases (média  $\pm$  desvio padrão).

Trat	EMAn (kcal/kg)	Coeficientes de digestibilidade ileal				
		-----base seca (%)-----				
		PB	MS	MM	Ca	P
1	3368,40 $\pm$ 100,42a	85,02 $\pm$ 1,65a	71,21 $\pm$ 1,96a	41,20 $\pm$ 3,18a	41,88 $\pm$ 15,81	55,45 $\pm$ 6,80c
2	3203,36 $\pm$ 129,61b	81,79 $\pm$ 2,23bc	64,72 $\pm$ 2,80c	31,55 $\pm$ 1,91c	41,52 $\pm$ 10,16	58,93 $\pm$ 10,08c
3	3192,17 $\pm$ 183,38b	82,57 $\pm$ 1,49ac	66,16 $\pm$ 2,21bc	33,11 $\pm$ 2,98c	49,96 $\pm$ 13,56	62,05 $\pm$ 9,10bc
4	3273,77 $\pm$ 164,03ab	84,17 $\pm$ 2,28ab	68,21 $\pm$ 2,55b	37,73 $\pm$ 2,72b	48,72 $\pm$ 9,30	70,10 $\pm$ 8,49ab
5	3216,62 $\pm$ 161,65ab	83,12 $\pm$ 2,77ac	65,74 $\pm$ 3,83bc	37,13 $\pm$ 4,52b	51,59 $\pm$ 10,30	72,48 $\pm$ 11,36a
P*	0,01	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,07	<0,0001

<sup>1</sup> Tratamentos: T1= controle positivo - dieta basal (DB) - milho e farelo de soja; T2= DB com redução de 70kcal/kg e 0.16% Ca e 0.15% P; T3= DB com redução de 100 kcal/kg e 0.16% Ca e 0.15% Pdisp; T4= T2+fitase (500FTU/kg); T5= T3+fitase (500FTU/kg)+ xilanase (560TXU/kg)+glucanase (250TGU/kg); \*Probabilidade; \*\*Médias seguidas por letras minúsculas, na coluna, diferem-se entre si pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade.

Os resultados da composição mineral das tíbias dos frangos são apresentados na tabela 4. Para as variáveis de MM ( $P < 0,0001$ ) e P ( $P = 0,01$ ), a suplementação enzimática foi eficiente, permitindo a redução nutricional de Ca em 0,16% e de Pdisp em 0,15%, sem ocorrer à queda desses parâmetros. Para as variáveis de Ca ( $P = 0,44$ ) e Zn ( $P = 0,38$ ), não foram verificados efeitos significativos dos tratamentos.

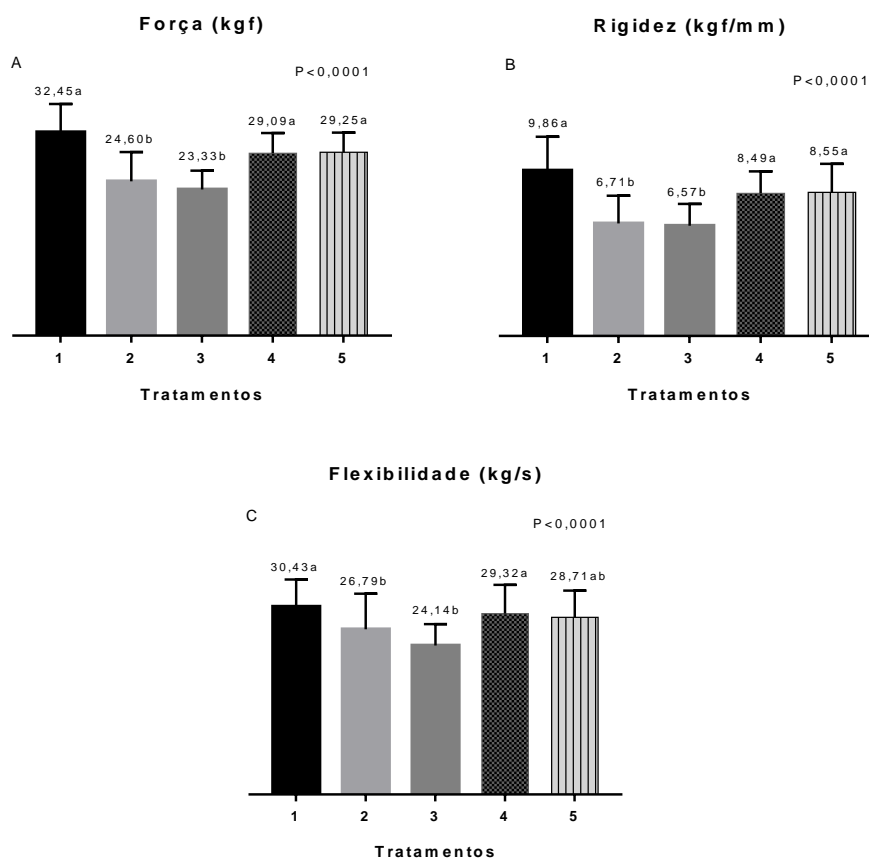
Tabela 4: Composição mineral (cálcio – Ca, fósforo – P e zinco- Zn), de tíbias de frangos alimentados com uma fitase híbrida associada à carboidrases (média  $\pm$  desvio).

Trat	Composição mineral			
	-----base seca -----			
	MM (%)	Ca (%)	P (%)	Zn (mg/kg)
1	45,71 $\pm$ 1,17a	15,38 $\pm$ 1,20	7,02 $\pm$ 0,39ab	162,68 $\pm$ 11,42
2	43,15 $\pm$ 1,36b	14,69 $\pm$ 1,05	6,64 $\pm$ 0,47ab	161,12 $\pm$ 12,60
3	43,00 $\pm$ 1,29b	14,68 $\pm$ 1,66	6,60 $\pm$ 0,52b	163,61 $\pm$ 8,33

4	44,99±1,22a	15,24±1,46	6,94±0,48ab	167,42±9,18
5	45,20±1,11a	15,21±1,05	7,11±0,53a	167,66±12,44
P*	<0,0001	0,44	0,01	0,38

<sup>1</sup> Tratamentos: T1= controle positivo - dieta basal (DB) - milho e farelo de soja; T2= DB com redução de 70kcal/kg e 0.16% Ca e 0.15% P; T3= DB com redução de 100 kcal/kg e 0.16% Ca e 0.15% Pdisp; T4= T2+fitase (500FTU/kg); T5= T3+fitase (500FTU/kg)+ xilanase (560TXU/kg)+glucanase (250TGU/kg); \*Probabilidade; \*\*Médias seguidas por letras minúsculas, na coluna, diferem-se entre si pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade.

Na figura 1 observar-se os resultados das avaliações de força (1A, P<0,0001), rigidez (1B, P<0,0001) e flexibilidade (1C, P<0,0001).



<sup>1</sup>Tratamentos: T1= controle positivo - dieta basal (DB) - milho e farelo de soja; T2= DB com redução de 70kcal/kg e 0.16% Ca e 0.15% P; T3= DB com redução de 100 kcal/kg e 0.16% Ca e 0.15% Pdisp; T4= T2+fitase (500FTU/kg); T5= T3+fitase (500FTU/kg)+ xilanase (560TXU/kg)+glucanase (250TGU/kg); \*Probabilidade; \*\*Médias seguidas por letras minúsculas diferem-se entre si pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade.

Figura 3: Gráficos da Força (1A), Rigidez (1B) e Flexibilidade (1C) de tíbias de frangos alimentados com uma fitase híbrida associada à carboidrases.

Os animais alimentados com as enzimas apresentaram melhora em todos esses parâmetros, demonstrando a eficiência da suplementação da fitase e da associação da fitase com carboidrases, em dietas com redução nutricional de EM

(70 e 100 kcal/kg), Ca (0,16%) e Pdisp (0,15%).

## 2.4 Discussão

O uso da fitase na nutrição de não ruminantes vem ao longo dos anos gerando interesse ao setor, já que novos produtos lançados no mercado apresentam valores diferenciados de equivalência de P, além de seus efeitos extra-fosfóricos (ADEOLA e APPLGATE, 2010; COWIESON et al., 2011; DERSJANT-LI et al., 2015; SELLE e RAVINDRAN, 2007). Isso porque o fitato não possui apenas capacidade de se ligar ao P, mas também se liga fortemente a outros nutrientes, como proteínas, carboidratos e minerais (BRYDEN et al., 2007; SELLE et al., 2006), e com o desaparecimento da molécula de fitato do ambiente intestinal, os nutrientes ficam liberados e disponíveis para absorção (LI et al., 2017). Desta forma, cria-se a oportunidade de adicionar carboidrases às dietas, que poderão atuar em porções da parede celular dos ingredientes, permitindo o aproveitamento de compostos antes indisponíveis, pelo organismo animal (COWIESON et al., 2006b; JUANPERE et al., 2005; KARIMI et al., 2013; OLUKOSI et al., 2008).

A melhora que ocorreu na EMAn quando as dietas foram suplementadas com a fitase híbrida (redução de 70 kcal/kg, 0,16% Ca e 0,15 P disp + 500 FTU/kg), ou com fitase + carboidrases (redução de 100 kcal/kg, 0,16% Ca e 0,15 P disp + 500 FTU/kg + 560 TXU/kg + 250 TGU/kg), demonstrou que o nutricionista deve extrapolar o efeito da fitase para outros nutrientes além do P. Ao suplementar carboidrases nas dietas, elas atuarão no rompimento da matriz dos polissacarídeos não amiláceos (MENG et al., 2005), eliminando os compostos que reduzem a digestão e absorção dos nutrientes (CHOCT et al., 1996), melhorando o desenvolvimento das células intestinais e o aproveitamento da dieta. Além de induzir modificações nos padrões de fermentação, retardando o esvaziamento gástrico, o que aumenta a oportunidade de ação da fitase (COWIESON e MASEY O'NEILL, 2013).

Apesar da ampla adoção da adição de fitase na dieta de frangos, tem havido um interesse renovado pelos requisitos para Ca e P (LI et al., 2017). Algumas informações neste contexto já estão consolidadas, como de que os melhores desempenhos dos animais são atingidos quando as dietas apresentam baixo teor de Pdisp e concentrações adequadas de Ca (LU et al., 2017), mas as exigências desses nutrientes na dieta ainda são mal definidas (LI et al., 2017).

No presente estudo o Ca e Pdisp foram reduzidos em 0,16 e 0,15%, respectivamente, e esse nível de restrição demonstrou ser muito prejudicial quando são avaliados os coeficientes de digestibilidade da MM e P. O coeficiente da MM atingiu reduções de 16,37% (T2) e 10,82% (T3) em relação aos tratamentos com a mesma matriz nutricional porém com a suplementação enzimática (T4 e T5, respectivamente). Para o P as reduções dos coeficientes foram de 15,93% (T2 *versus* T4) e de 14,39% (T3 *versus* T5).

Ficou evidente que ao não suplementar as dietas com fitase, o fitato presente nos ingredientes da dieta acabou limitando a biodisponibilidade de P ligado, e de outros minerais (Ca, Zn, Cu, etc.), devido à formação de complexos (COWIESON e BEDFORD, 2009), implicando na redução dos coeficientes de digestibilidade da MM e P. Para contornar essa situação, pode-se adicionar às dietas a fitase, que irá melhorar a disponibilidade do P, permitindo inclusive que ele e outros minerais como o Ca sejam reduzidos nas matrizes nutricionais.

A dose da fitase é um dos fatores determinantes na obtenção de resultados satisfatórios quando trata-se da disponibilização de Ca e P. Atualmente, muitos trabalhos encontrados na literatura, como de Boney e Moritz (2017), Oliveira et al. (2018), e Woyengo e Wilson (2019), defendem a superdosagem de fitase, baseados no fato de que os efeitos antinutricionais do fitato são aliviados de forma mais eficiente, além da melhora na disponibilidade do P. Porém nesse estudo, a dose de 500 FTU/kg da fitase híbrida, demonstrou ser eficiente na hidrólise da molécula de fitato, melhorando a digestibilidade da MM e P. Esse efeito é confirmado pelos resultados da composição mineral das tíbias dos frangos, onde o uso da fitase híbrida (500 FTU/kg) aumentou os conteúdos de MM e P em dietas com baixas concentrações de Ca e P (T4 e T5).

A saúde óssea de frangos pode ser avaliada de diversas formas, como pelo conteúdo mineral, que corresponde a 70% da composição total do osso (JÚNIOR, 2002), e parâmetros como força, rigidez e flexibilidade. A força óssea é dada pela força aplicada por área óssea e é influenciada por fatores como tamanho ósseo e composição mineral (GOPINGER et al., 2017). A razão entre a força e a distância (distância que a sonda percorre até romper o osso), representa rigidez óssea (ŚWIĄTKIEWICZ e ARCZEWSKA-WLOSEK, 2012). A flexibilidade óssea é representada pela área, e mede a deformidade óssea em função da força aplicada sobre o mesmo.

As variáveis de força, rigidez e flexibilidade das tíbias de frangos alimentados com dietas contendo as reduções nutricionais de 0,16% Ca e 0,15% Pdisp, demonstraram piorar essas respostas, sugerindo dessa forma a possível indisponibilização do P, diminuindo a absorção desse mineral para a formação óssea (LETOURNEAU-MONTMINY et al., 2008). A dose de 500 FTU/kg da fitase híbrida ou sua associação com xilanase (560 TXU/kg) e glucanase (250 TGU/kg), auxiliaram na manutenção da força, rigidez e flexibilidade óssea, quando as matrizes nutricionais utilizaram baixo conteúdo de Ca e Pdisp.

A suplementação de fitase já está estabelecida no setor produtor de aves, que em geral ao utilizá-la nas dietas realiza a redução nutricional apenas de Ca e P, devido a dúvidas quanto aos demais nutrientes. E tratando-se da combinação da fitase com outras enzimas, as incertezas são ainda maiores.

Assim, estudos que estabeleçam essas determinações são de extrema importância, pois geram respostas e a partir delas é possível estabelecer matrizes nutricionais reais aplicáveis na produção avícola.

## **2.5 Conclusões**

A suplementação de 500 FTU/kg de uma fitase híbrida demonstrou ser eficiente no restabelecimento da EMAn de dietas para frangos até 28 dias de idade, com redução dietética de 70 kcal/kg, 0,16% de Ca e 0,15% de P. Dietas com matriz nutricional mais restritiva (100kcal/kg, 0,16% de Ca e 0,15% de P) podem ser implementadas desde que a fitase híbrida esteja associada com pacote específico de carboidrases (xilanase – 560TXU/kg + glucanase – 250 TGU/kg).

As reduções nutricionais de 0,16% de Ca e 0,15% de Pdisp foram superadas quando a fitase híbrida ou sua associação com carboidrases foi adicionada nas dietas, mantendo a qualidade óssea dos animais.

### Capítulo 3

---

Fitase híbrida e carboidrases em dietas à base de milho e farelo de soja para frangos de corte: desempenho e custo de produção

*(Capítulo que gerou o artigo "Hybrid phytase and carbohydrases in corn and soybean meal-based diets for broiler chickens: performance and production costs", aceito para publicação na Revista Brasileira de Ciência Avícola em 13 de janeiro de 2020)*



### 3.1 Introdução

Nos últimos anos os custos com a alimentação de frangos de corte têm aumentado constantemente, tornando o processo produtivo menos eficiente. O milho e o farelo de soja juntos totalizam em torno de 80% da composição da matriz dietética de frangos de corte (ZOU et al., 2013). Sendo assim, as variações dos preços desses insumos refletem grandemente sobre o preço total das dietas. As fontes lipídicas quando utilizadas nas dietas também contribuem para o aumento dos custos com alimentação, contudo muitas vezes se faz necessário seu uso para complementar a energia das rações e assim atender as exigências dos animais. Outro ingrediente com grande impacto sobre os custos da alimentação são as fontes de fósforo (P) (WOYENGO e NYACHOTI, 2011). Sua suplementação é necessária pela baixa disponibilidade de P nos alimentos vegetais, no entanto essa prática além de encarecer as dietas, contribui com a poluição ambiental (SELLE e RAVINDRAN, 2007; WOYENGO e NYACHOTI, 2011).

O P é encontrado nas plantas como fitato e serve como a maior fonte de estocagem desse mineral (MAENZ, 2001). As aves possuem capacidade reduzida em desfosforilar o P do anel de inositol devido à baixa produção de fitase (BEDFORD, 2000). Assim, para melhorar o aproveitamento do P nas dietas, é indicado o uso exógeno da enzima fitase. Outro componente encontrado nas dietas vegetais que prejudica o aproveitamento dos nutrientes é a presença dos carboidratos estruturais, que são conhecidos como polissacarídeos não amiláceos (PNA's). Alguns desses PNA's induzem o aumento da viscosidade intestinal, pois eles são solúveis e dessa forma tem uma grande capacidade de ligar-se a água, ocasionando a redução efetiva da taxa de digestão, pelo impedimento de acesso das enzimas digestivas aos substratos (BEDFORD, 2000). Portanto, a adição de carboidrases na dieta de aves atuaria na clivagem da matriz dos polissacarídeos não amídicos encontrados nas paredes celulares (LU et al., 2013; MENG e SLOMINSKI, 2005), além de desempenhar o papel de facilitar o acesso de outras enzimas como a fitase ao substrato, por expor o fitato (JUANPERE et al., 2005).

Uma das estratégias utilizadas por nutricionistas é reduzir as quantidades de alguns ingredientes na matriz dietética devido à melhora no aproveitamento dos nutrientes da dieta pela ação das enzimas, que evita que alimentos passem intactos e/ou com baixo aproveitamento pelo trato gastrointestinal (ROMERO et al., 2014;

ZOU et al., 2013). Além disso, novos produtos enzimáticos com características diferenciadas, que podem ser mais eficientes, são lançados anualmente no mercado. Este é o caso das fitases bacterianas de origem híbrida, que já demonstraram melhorar a utilização do P e de outros nutrientes ligados ao fitato (TORRALLARDONA et al., 2017).

Apesar do uso da fitase estar relativamente estabelecido, quando ela é suplementada nas dietas, geralmente ocorre apenas à valorização de Ca e P, sem considerar a energia. Pode-se afirmar que essa 'insegurança' é ainda maior quando se trata da associação da fitase com outras enzimas. É de extrema importância para a cadeia avícola que estudos sejam realizados, testando os produtos disponíveis no mercado, gerando respostas que auxiliarão o usuário na tomada de decisão sobre a matriz nutricional a ser adotada. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a eficiência de uma fitase híbrida adicionada isolada ou associada à carboidrases específicas (xilanasase+glucanase), em dietas para frangos contendo reduções nutricionais de energia metabolizável, Ca e P disponível (P<sub>disp</sub>), sobre o desempenho e custos de produção.

### **3.2 Material e métodos**

O experimento foi conduzido no Setor Experimental de Aves, na Embrapa Suínos e Aves – CNPSA, em Concórdia, SC, Brasil. O projeto foi aprovado pela Comissão de ética no uso de animais da Embrapa (número 006-2017).

#### **3.2.1 Animais e tratamentos**

Um total de 1875 frangos de corte machos com um dia de idade da linhagem *Cobb 500* foram alojados em boxes com cama de maravalha de pinus, equipados com comedouros tubulares, bebedouros tipo *nipple* (cinco/boxe), e aquecimento elétrico através de campânulas (Figura 1 A e B).

As aves apresentaram peso médio inicial de  $46,9 \pm 3,7$  g e foram distribuídas ao acaso em cinco tratamentos, com 15 repetições de 25 aves cada uma alojadas em boxes com dimensões de 1,65m x 1,70m, totalizando 2,80 m<sup>2</sup> (unidade experimental).

As dietas experimentais apresentaram matrizes nutricionais distintas, sendo uma dieta controle positivo (atendendo as exigências nutricionais das aves), e dietas com reduções de EM (kcal/kg) de 70 (R<sub>70</sub>) e 100 (R<sub>100</sub>), e reduções fixas de

0,16% Ca e 0,15% P disponível (Pdisp), sem ou com a suplementação de uma fitase híbrida [500 FTU/kg] – (R\_70+F), xilanase [560 TXU/kg] e glucanase [250 TGU/kg] – (R\_100 + F + XG).

Em estudo prévio realizado com frangos por Krabbe et al. (2014), foi testado o pacote específico de enzimas contendo xilanase e glucanase (Naturgrain TS), e verificou-se que houve um aumento de 32 kcal/kg na energia metabolizável nas dietas à base de milho e farelo de soja. A matriz energética da fitase utilizada no presente estudo (500 FTU/kg) prevê uma valorização de 68,9 kcal/kg da EM, e essas informações foram utilizadas para determinar as reduções de energia (70 kcal/kg e 100 kcal/kg). As reduções de Ca% (0,16) e Pdisp% (0,15) aplicadas na matriz das dietas também seguiram as recomendações do fabricante.

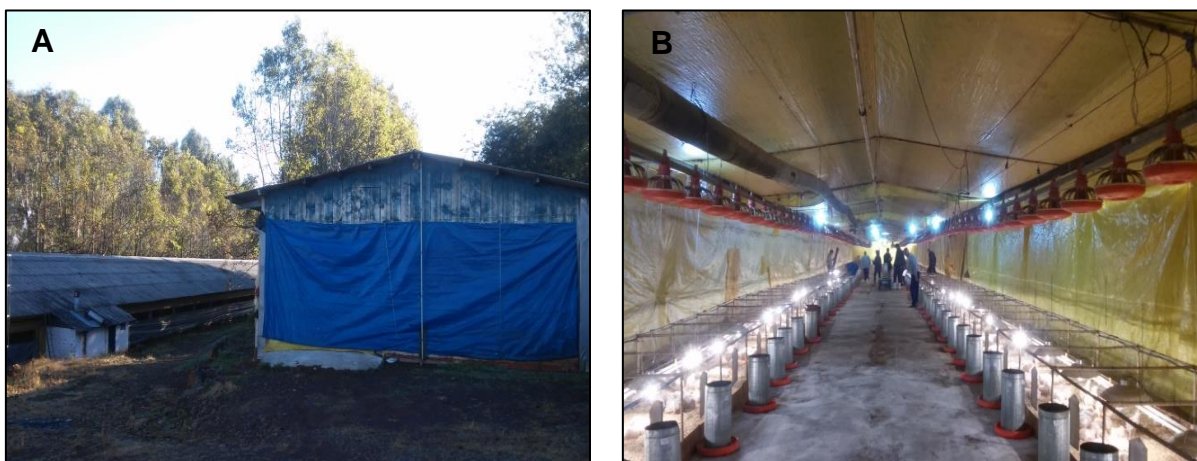


Figura 1: Fotografias (A) Área externa - galpão experimental; (B); Área interna - galpão experimental. Fonte: Acervo pessoal.

### 3.2.2 Enzimas

#### 3.2.2.1 Fitase

Foi utilizada a fitase híbrida de origem microbiana, mio-inositol-hexaquisfosfato-beta-fosfohidrolase [EC 3.1.3.26] (Natuphos E<sup>®</sup> 10.000 G – BASF SA), granulada, contendo 10,000 FTU/g de atividade de fitase. Sua atividade em unidade de FTU, é definida como a quantidade de enzima que libera 1  $\mu$ mol de fósforo inorgânico/min à partir de 0,0051 mol/L de fitato de sódio, sob pH 5,5 e temperatura de 37°C.

De acordo com o fabricante, esta nova molécula foi criada através de um método único, originando uma fitase híbrida, criada a partir de três bactérias,

conferindo ao produto maior resistência, às condições de pH ácido, ao ataque de proteases endógenas e também ao processo de peletização (até 95°C).

### **3.2.2.2 Carboidrases**

As carboidrases utilizadas possuem atividade sobre as ligações Endo-1,4-beta-xilanase [EC 3.2.1.8] e Endo-1,4-beta-glucanase [EC 3.2.1.4]. Ambas as enzimas são produzidas a partir de *Aspergillus niger* (Natugrain<sup>®</sup>TS – BASF SA). Segundo o fabricante, a unidade de endo xilanase (TXU) é definida como a quantidade de enzima que libera a quantidade de cinco micromoles de açúcar redutor, medidos como xilase equivalente por minuto de uma solução contendo 1g de arabinoxilano por 100 ml, a um pH 3,5 e temperatura de 40°C. Uma unidade de endo glucanase (TGU) é definida como a quantidade de enzima que libera um micromol de açúcar redutor, medidos como glicose equivalente por minuto de uma solução contendo 0,714g de beta glucano por 100 ml a um pH 3,5 e temperatura de 40°C.

### **3.2.2.3 Atividade enzimática**

A atividade enzimática das dietas foi realizada em amostras das rações peletizadas, que logo após o preparo foram coletadas e encaminhadas para o Laboratório de Análises CBO, em Valinhos, São Paulo/Brasil.

Para a dose esperada de 500 FTU/kg a recuperação variou de 420 a 540 unidades. Para a dose de xilanase de 560 TXU/kg a recuperação variou de 517 a 579 unidades. Para a dose de glucanase de 250 TGU/kg, a recuperação variou de 265 a 381 unidades.

### **3.2.3 Programa alimentar**

Foi utilizado um programa alimentar de quatro fases, sendo: pré-inicial (1 até 7 dias), inicial (8 até 21 dias), crescimento (22 até 35 dias) e final (36 até 42 dias). As dietas foram peletizadas (80°C por 20 segundos) e fornecidas trituradas nas fases pré-inicial, inicial e crescimento e peletizadas sem triturar na fase final. A composição e o perfil nutricional das dietas experimentais estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1: Composição e perfil nutricional das dietas experimentais

Ingrediente (%)	Pré-inicial (1-7dias)			Inicial (8-21dias)			Crescimento (22-35 dias)			Final (36-42 dias)		
	CP	R_70/ R_70+F	R_100/ R_100+F+XG	CP	R_70/ R_70+F	R_100/ R_100+F+XG	CP	R_70/ R_70+F	R_100/ R_100+F+XG	CP	R_70/ R_70+F	R_100/ R_100+F+XG
Milho	48,440	48,440	48,440	52,380	52,380	52,380	50,727	50,727	50,727	65,590	65,590	65,590
Farelo soja	44,050	44,050	44,050	40,570	40,570	40,570	40,660	40,650	40,650	28,517	28,510	28,510
Óleo soja	3,240	2,450	2,105	3,385	2,565	2,236	4,456	3,663	3,321	2,750	1,963	1,607
Caulim	0,045	1,540	1,885	0,040	1,570	1,884	1,055	2,562	1,855	0,050	1,573	1,914
Fosfato bicálcico <sup>2</sup>	1,780	0,970	0,970	1,330	0,520	0,520	1,066	0,255	0,255	0,970	0,159	0,159
Calcário <sup>3</sup>	0,970	1,070	1,070	1,120	1,220	1,220	1,010	1,112	1,112	0,878	0,980	0,980
Sal	0,530	0,530	0,530	0,500	0,500	0,500	0,480	0,480	0,480	0,455	0,450	0,450
DL- Metionina	0,300	0,300	0,300	0,210	0,210	0,210	0,151	0,151	0,151	0,189	0,180	0,180
L-Lisina	0,170	0,170	0,170	0,060	0,060	0,060	0,000	0,000	0,000	0,195	0,190	0,190
Notox <sup>4</sup>	0,185	0,185	0,185	0,185	0,185	0,185	0,185	0,185	0,185	0,185	0,185	0,185
L-Treonina	0,080	0,080	0,080	0,010	0,010	0,010	0,000	0,000	0,000	0,061	0,060	0,060
Premix vitamínico <sup>5</sup>	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100
Premix mineral <sup>6</sup>	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050
Monensina sódica	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050	0,000	0,000	0,000
BHT	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010
Fitase <sup>7</sup>	-	R_70+F	R_100+F+XG	-	R_70+F	R_100+F+XG	-	R_70+F	R_100+F+XG	-	R_70+F	R_100+F+XG
X+G <sup>8</sup>	-	-	R_100+F+XG	-	-	R_100+F+XG	-	-	R_100+F+XG	-	-	R_100+F+XG
Total	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Perfil Nutricional calculado												
EMAn, kcal/kg	2925 <sup>1</sup>	2855	2825	2980 <sup>1</sup>	2910	2880	3050 <sup>1</sup>	2980	2950	3100 <sup>1</sup>	3030	3000
Proteína Bruta%	23,65	23,65	23,65	22,14	22,14	22,14	22,01	22,03	22,03	17,74	17,73	17,73
Gordura, %	5,72	4,94	4,60	5,95	5,17	4,83	6,99	6,20	5,86	5,60	4,82	4,48
Fibra Bruta, %	3,17	3,17	3,17	3,05	3,05	3,05	3,05	3,05	3,05	2,65	2,64	2,65
P disponível, %	0,47 <sup>1</sup>	0,32	0,32	0,38 <sup>1</sup>	0,23	0,23	0,33 <sup>1</sup>	0,18	0,18	0,29 <sup>1</sup>	0,14	0,14
P Total, %	0,74	0,58	0,58	0,64	0,49	0,49	0,59	0,44	0,44	0,53	0,38	0,38
Ca, %	0,92 <sup>1</sup>	0,76	0,76	0,86 <sup>1</sup>	0,70	0,70	0,75 <sup>1</sup>	0,59	0,59	0,65 <sup>1</sup>	0,49	0,49
(Dig) <sup>9</sup> Lis, %	1,30	1,30	1,30	1,14	1,14	1,14	1,09	1,09/1,14	1,09/1,14	0,96	0,96	0,96
Dig Met+Cis, %	0,93	0,93	0,93	0,82	0,82	0,82	0,76	0,76/0,82	0,76/0,82	0,70	0,69	0,69
Dig Met, %	0,59	0,59	0,59	0,49	0,49	0,49	0,43	0,43/0,49	0,43/0,49	0,42	0,41	0,41

Dig Treo, %	0,84	0,84	0,84	0,74	0,74	0,74	0,73	0,73/0,74	0,73/0,74	0,63	0,63	0,63
Dig Trip, %	0,26	0,26	0,26	0,24	0,24	0,24	0,25	0,25/0,24	0,25/0,24	0,19	0,19	0,19

Perfil nutricional analisado

Proteína Bruta, %	24,8	24,7/24,4	24,4/24,8	23,3	22,7/23,0	23,3/23,5	22,6	24,0/22,9	22,9/23,6	18,7	19,0/18,7	18,4/18,9
Gordura, %	8,29	5,43/5,45	5,47/5,07	6,32	5,30/5,75	5,50/5,56	7,59	6,7/6,4	6,2/6,6	5,72	4,9/5,3	4,7/4,9
P total, %	0,69	0,52/0,55	0,52/0,51	0,60	0,50/0,43	0,51/0,43	0,50	0,37/0,35	0,34/0,39	0,47	0,31/0,32	0,30/0,32
Ca, %	0,74	0,61/0,64	0,55/0,60	0,60	0,62/0,54	0,61/0,58	0,65	0,53/0,52	0,56/0,56	0,59	0,47/0,45	0,45/0,49

CP= controle positivo – dieta basal com milho e farelo de soja (DB); R\_70 = DB com redução de 70kcal/kg, 0,16% Ca e 0.15% Pdisp; R\_100 = DB com redução de 100 kcal/kg, 0,16% Ca e 0.15% Pdisp; R\_70+F = DB com redução de 70kcal/kg, 0,16% Ca e 0.15% Pdisp + fitase (500 FTU/kg); R\_100+ F + XG = DB com redução de 100 kcal/kg, 0,16% Ca e 0.15% Pdisp + fitase (500 FTU/kg) + xilanase (560 TXU/kg) + glucanase (250 kcal/kg).<sup>1</sup>Segundo as recomendações das Tabelas Brasileiras de Aves e Suínos (2011) – frangos machos visando desempenho regular; <sup>2</sup>cálcio:mínimo 210 g/kg, máximo:250 g/kg, fósforo:180 g/kg; <sup>3</sup> cálcio mínimo 33%; <sup>4</sup>sequestrante de micotoxina – aluminossilicatos, parede de levedura, carbono ativado; <sup>5</sup>Composição do produto (níveis de garantia por kg do produto): Vit A = 11.000.000 U.I.; Vit D3 = 4.000.000 U.I.; Vit E = 55.000 U.I.; Vit K3 = 3.000 mg; Vit B1 = 2.300mg; Vit B2 = 7.000 mg; Ácido Pantotênico = 12 g; Vit B6 = 4.000 mg; Vit B12 = 25.000 mcg; Ácido Nicotínico = 60 g; Ácido Fólico = 2.000 mg; Biotina = 250 mg; Selênio = 300 mg. <sup>6</sup>Composição do produto (níveis de garantia por Kg do produto): Ferro = 100 g; Cobre = 20 g; Manganês = 130 g; Zinco = 130 g; Iodo = 2.000mg; <sup>7</sup>Natuphos<sup>®</sup> 10000G – 500 FTU/kg = 0,005kg/100kg de dieta; <sup>8</sup> Xilanase (560TXU/kg) + Glucanase (250 TGU/kg) = Natugrain<sup>®</sup>TS – 0,010 kg/100 kg de dieta. <sup>9</sup> digestível.

### 3.2.4 Variáveis analisadas

#### 3.2.4.1 Desempenho zootécnico

As variáveis avaliadas foram: peso corporal médio (PC), ganho de peso médio diário (GMD), consumo de ração (CR) e conversão alimentar (CA). As aves foram pesadas no dia do alojamento (dia 1), e semanalmente ao longo do período experimental (até 42 dias). A ração fornecida e as sobras foram pesadas semanalmente para a obtenção do valor do consumo de ração e para o cálculo da conversão alimentar. A mortalidade também foi registrada para corrigir os dados de desempenho.

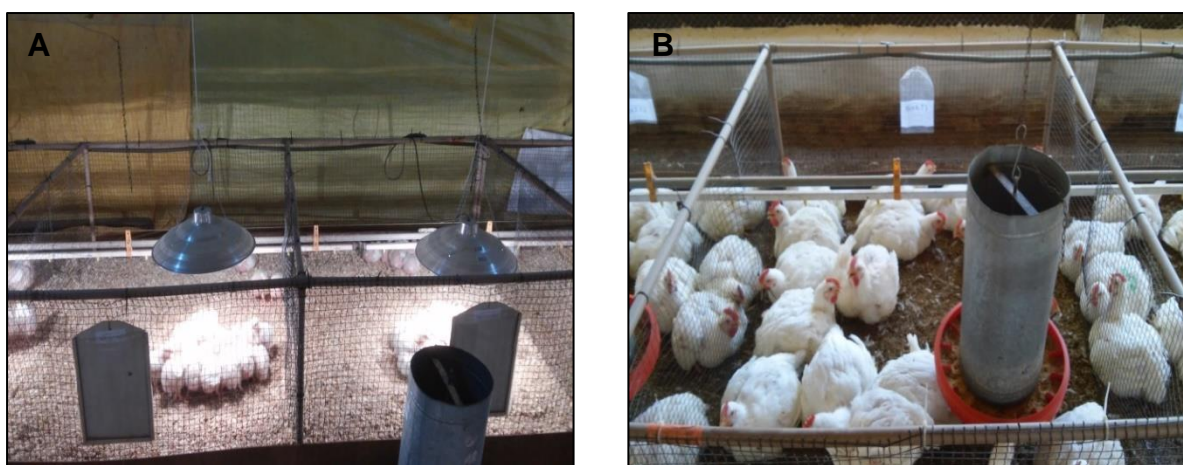


Figura 2: Fotografias (A) Animais aos 7 dias de idade; (B); Frangos aos final do período experimental (42 dias).

Fonte: Acervo pessoal.

#### 3.2.4.2 Rendimento de carcaça e custos de produção

Aos 42 dias de idade para a avaliação do rendimento de carcaça foram selecionadas duas aves que estivessem dentro do intervalo de  $\pm 5\%$  do peso médio de cada unidade experimental. Os animais foram transportados até um frigorífico local com Inspeção Municipal e abatidos de acordo com a legislação vigente para este tipo de estabelecimento. Os animais foram pesados antes do abate para a determinação do peso vivo. Após a evisceração e pré-chiller, as carcaças foram pesadas para calcular o rendimento de carcaça (RC) utilizando a seguinte equação: RC (%):  $(\text{peso da carcaça} \times 100) / \text{peso vivo}$ .

O resultado de rendimento de carcaça foi utilizado no cálculo do custo da tonelada da carcaça resfriada, de acordo com metodologia proposta por Miele et al. (2010). Essa metodologia baseia-se na definição do sistema de produção, no levantamento de coeficientes zootécnicos de produção e de preços de mercado.

O custo das dietas foi realizado utilizando os valores dos ingredientes cotados em setembro de 2017 e convertidos para dólares americanos (USD) utilizando a taxa Ptax (3,2659) referente ao dia 14/09/2017, conforme pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2: Valores em reais (R\$) e em dólares americanos (USD) por kg dos ingredientes utilizados nas dietas experimentais.

Ingredientes	R\$/kg	USD/kg
Milho	0,440	0,135
Farelo soja	0,983	0,301
Óleo soja	2,661	0,815
Caulim	0,440	0,135
Fosfato bicálcico	2,459	0,753
Calcário	0,179	0,055
Sal	0,329	0,101
DL- Metionina	13,75	4,213
L-Lisina	6,469	1,981
Notox	23,63	7,238
L-Treonina	8,109	2,483
Premix vitamínico	14,86	4,553
Premix mineral	6,828	2,091
Monensina sódica (Coban)	31,86	9,758
BHT	17,97	5,505
Fitase 500FTU/kg	48,98	15,00
Xilanase+glucanase	45,72	14,00

### 3.2.5 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA, e as médias foram comparadas pelo teste de *Tukey* utilizando o procedimento “LSM- least squares means”. A análise foi realizada com um nível de significância de 5% utilizando o pacote estatístico R (R CORE TEAM, 2015).

### 3.3 Resultados e discussão

Ao considerar os períodos avaliados, não foi verificado efeito dos tratamentos sobre a mortalidade dos animais, 1 - 7 dias (P= 0,29), 1 - 14 dias (P= 0,75), 1 - 21 dias (P= 0,14), 1 - 28 dias (P= 0,18), 1 - 35 dias (P= 0,17), e 1 - 42 dias (P= 0,46).



### 3.3.1 Desempenho

Na primeira semana o principal efeito da suplementação enzimática foi observado sobre a CA, onde os tratamentos com enzimas apresentaram resultados similares ao tratamento CP (Tabela 3).

Foi observado um efeito cumulativo positivo sobre a variável PC nos animais que receberam dietas com enzimas a partir dos 14 dias de idade até o final do período experimental (42 dias). Comportamento similar foi observado para a variável GMD (Tabela 3), a partir da segunda semana experimental. Frangos que receberam dietas com a suplementação enzimática apresentaram um consumo de ração equivalente aos animais do grupo controle positivo em todos os períodos avaliados (Tabela 3). Os resultados de PC e GMD indicam que os tratamentos com reduções nutricionais (R\_70 e R\_100) pioraram esses índices zootécnicos, que puderam ser revertidos pela suplementação enzimática (R\_70+F e R\_100+F+XG).

Tabela 3: Desempenho de frangos de corte alimentados com dietas contendo diferentes níveis de energia, Ca e Pdisp, suplementadas ou não com enzimas exógenas (média  $\pm$  desvio padrão).

Período	Tratamentos <sup>1</sup>	PC (g)	GMD (g/ave/dia)	CR (g/ave/dia)	CA (g/g)
1 – 7	CP	200,11 $\pm$ 8,60 ab	21,87 $\pm$ 0,99 ab	21,52 $\pm$ 0,93 a	0,984 $\pm$ 0,02 c
	R_70	192,88 $\pm$ 6,78 b	20,85 $\pm$ 0,64 c	21,28 $\pm$ 0,65 a	1,021 $\pm$ 0,02 ab
	R_100	195,40 $\pm$ 7,95 ab	21,20 $\pm$ 0,99 bc	21,75 $\pm$ 0,99 a	1,025 $\pm$ 0,02 a
	R_70+F	200,93 $\pm$ 5,65 ab	21,99 $\pm$ 0,74 ab	21,46 $\pm$ 1,18 a	0,983 $\pm$ 0,03 c
	R_100+F+XG	202,09 $\pm$ 9,93 a	22,15 $\pm$ 1,12 a	22,04 $\pm$ 1,30 a	0,994 $\pm$ 0,02 bc
	P*	0,008	<0,001	0,323	<0,0001
1 – 14	CP	563,27 $\pm$ 14,70 a	36,87 $\pm$ 0,87 a	42,63 $\pm$ 0,95 ab	1,156 $\pm$ 0,01 d
	R_70	528,05 $\pm$ 27,65 b	34,36 $\pm$ 1,81 b	41,38 $\pm$ 1,55 b	1,205 $\pm$ 0,02 ab
	R_100	529,13 $\pm$ 18,79 b	34,44 $\pm$ 1,18 b	42,06 $\pm$ 1,35 ab	1,221 $\pm$ 0,02 a
	R_70+F	557,56 $\pm$ 18,11 a	36,47 $\pm$ 1,14 a	42,82 $\pm$ 1,08 ab	1,174 $\pm$ 0,02 cd
	R_100+F+XG	561,07 $\pm$ 25,22 a	36,72 $\pm$ 1,64 a	43,49 $\pm$ 1,91 a	1,184 $\pm$ 0,01 bc
	P*	<0,0001	<0,0001	0,001	<0,0001
1 – 21	CP	1126,43 $\pm$ 25,30 a	51,40 $\pm$ 1,11 a	63,81 $\pm$ 1,13 a	1,241 $\pm$ 0,01 d
	R_70	1034,92 $\pm$ 38,82 b	47,04 $\pm$ 1,75 b	60,89 $\pm$ 2,16 b	1,294 $\pm$ 0,02 b
	R_100	1037,69 $\pm$ 29,00 b	47,17 $\pm$ 1,28 b	62,05 $\pm$ 1,68 b	1,315 $\pm$ 0,02 a
	R_70+F	1111,24 $\pm$ 30,15 a	50,67 $\pm$ 1,36 a	63,81 $\pm$ 1,36 a	1,259 $\pm$ 0,01 cd
	R_100+F+XG	1119,12 $\pm$ 36,56 a	51,05 $\pm$ 1,63 a	64,91 $\pm$ 1,97 a	1,271 $\pm$ 0,01 c
	P*	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

1 – 28	CP	1796,85 ± 38,26 a	62,49 1,34 a	82,87 ± 1,63 ab	1,326 ± 0,01 c
	R_70	1682,51 ± 55,74 b	58,41 ± 1,91 b	79,33 ± 2,63 c	1,358 ± 0,01 b
	R_100	1680,11 ± 52,37 b	58,32 ± 1,79 b	80,92 ± 2,33 bc	1,387 ± 0,02 a
	R_70+F	1788,60 ± 69,71 a	62,20 ± 2,45 a	83,09 ± 1,91 ab	1,336 ± 0,02 c
	R_100+F+XG	1797,91 ± 64,48 a	62,53 ± 2,21 a	84,06 ± 2,54 a	1,344 ± 0,01 bc
	P*	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
1 – 35	CP	2578,80±60,15 a	72,33±1,72 a	101,37 ±2,00 ab	1,401±0,02 b
	R_70	2440,97±79,12 b	68,40 ±2,20b	97,58 ±3,10 c	1,426 ±0,02 b
	R_100	2407,25 ±62,30 b	67,43 ± 1,72 b	98,98 ±2,62 bc	1,467 ±0,02 a
	R_70+F	2563,38±62,30 a	71,89 ±1,76 a	101,86 ±2,00 a	1,417 ±0,01 b
	R_100+F+XG	2592,92 ±93,66 a	72,73 ±2,62 a	103,22 ± 2,35 a	1,419 ±0,03 b
	P*	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
1 – 42	CP	3364,30 ± 67,98 a	78,98 ± 1,60 a	118,44 ± 2,17 bc	1,499 ± 0,03 b
	R_70	3226,84 ± 85,92 b	75,71 ± 2,01 b	115,12 ± 3,18 d	1,520 ± 0,02 ab
	R_100	3219,56 ± 82,94 b	75,53 ± 1,94 b	116,80 ± 2,92 cd	1,546 ± 0,03 a
	R_70+F	3357,18 ± 98,86 a	78,81 ± 2,34 a	120,05 ± 2,89 ab	1,523 ± 0,02 ab
	R_100+F+XG	3385,52 ± 102,98 a	79,48 ± 2,40 a	121,38 ± 2,85 a	1,527 ± 0,02 a
	P*	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,001

CP= controle positivo – dieta basal com milho e farelo de soja (DB); R\_70 = DB com redução de 70kcal/kg, 0,16% Ca e 0.15% Pdisp; R\_100 = DB com redução de 100 kcal/kg, 0,16% Ca e 0.15% Pdisp; R\_70+F = DB com redução de 70kcal/kg, 0,16% Ca e 0.15% Pdisp + fitase (500 FTU/kg); R\_100+F + XG = DB com redução de 100 kcal/kg, 0,16% Ca e 0.15% Pdisp + fitase (500 FTU/kg) + xilanase (560 TXU/kg) + glucanase (250 kcal/kg); Peso corporal (PC), Ganho de peso médio diário (GMD), Consumo de ração (CR), Conversão alimentar (CA). \*Probabilidade; \*\*Médias seguidas por letras minúsculas, na coluna, diferem-se entre si pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade.

Assumindo que a melhora dos resultados de PC e GMD dos animais ocorreu devido ao aumento da disponibilidade dos nutrientes da dieta pela ação das enzimas, era de se esperar também uma queda no consumo de ração, como relatado por Kocher et al. (2003). Esses autores afirmam que o uso de carboidrases acarreta na maior disponibilidade da energia resultando em menor consumo. Contudo, no presente estudo esse comportamento não foi verificado, e frangos alimentados com a dieta R\_100+F+XG apresentaram consumo de ração equivalente ao CP, no período de 1 a 42 dias.

A capacidade de consumo voluntário das aves pode ser explicada pela quantidade de energia da dieta. Segundo Ferket e Gernat (2006), frangos de corte são incapazes de reduzir adequadamente a ingestão de alimento, quando ocorre um maior aporte de energia, sendo que raças mais pesadas tendem a manter constante o consumo de ração, independentemente da concentração de energia da

dieta. Provavelmente a causa desta incapacidade está associada aos programas de melhoramento genético que visam a hiperfagia associada a altos ganhos de tecido muscular nas linhagens comerciais de frangos de corte (BARBATO, 1994).

Para que os animais possam expressar o seu potencial ótimo, é necessário que as dietas forneçam a quantidade de nutrientes exigida para a manutenção do organismo e um adicional para a deposição de tecido muscular e adiposo. No presente estudo, a dieta controle positivo (por fase de criação), foi formulada visando o crescimento de frangos de corte machos com desempenho regular, de acordo com as Tabelas Brasileiras de Aves e Suínos (2011), e era esperado que esses animais apresentassem respostas de desempenho de acordo com essa categoria (valores de consumo de ração [g/dia] e ganho de peso [g/dia], respectivamente, por fase são: 1 a 7 dias – 23,0 e 19,6; 8 a 21 dias – 65,8 e 45,8; 22 a 33 dias – 137 e 77,6; 34 a 42 dias – 181 e 187). Contudo, o desenvolvimento dos frangos desse estudo foi maior do que o reportado nessa literatura para PC, GMD e CR, com um acréscimo de 18% no PC, 11% no GMD, e quase 2% no CR.

A suplementação de fitase (R\_70+F) e fitase + carboidrases (R\_100+ F+ XG) em dietas com redução da EM, resultaram em taxas de CA equivalentes ao tratamento CP nos períodos de 1-7, 1-28 e 1-35 dias. No entanto, nos períodos de 1-14, 1-21 e 1-42 dias, apenas o tratamento R\_70+ F apresentou taxa de conversão alimentar semelhante ao do controle positivo (Tabela 3). Comparando os resultados encontrados nesse estudo com os esperados para frangos machos de desempenho regular, observa-se que os maiores índices de crescimento aconteceram de 1 - 14 e 1 - 21 dias de idade, em que o PC, GMD e CR apresentaram valores superiores aos previstos, atingindo 21%, 13% e 6%, respectivamente.

Fornecer dietas deficientes em energia e demais nutrientes nas fases iniciais de crescimento impacta negativamente na taxa de crescimento e índices zootécnicos dos frangos. Portanto, pode-se presumir que as reduções nutricionais das dietas experimentais de 70 e 100 kcal/kg, 0,16% de Ca e 0,15% de Pdisp, foram ainda mais restritivas, já que o desenvolvimento dos animais foi superior ao esperado. E este fato poderia explicar a ausência de resposta da associação enzimática da fitase + carboidrases (R\_100+ F +XG) sobre a CA nos períodos de 1 - 14 e 1 - 21 dias, já que esse tratamento aplicou a maior restrição da energia metabolizável (100kcal/kg).

Muitos estudos têm avaliado o uso de fitase associada com carboidrases

principalmente em dietas com altas quantidades de PNA's, como é o caso de dietas à base de trigo, arroz e cevada (COWIESON e ADEOLA 2005; OLUKOSI e ADEOLA 2008; RAVINDRAN et al., 1999), e o efeito das carboidrases não teve impacto óbvio sobre a digestibilidade do P e Ca (COWIESON e ADEOLA, 2005). Isso pode estar relacionado com a composição do principal cereal utilizado nas dietas que foi o milho, um ingrediente com baixa concentração de arabinoxilanos (CHOCT, 1997). Portanto, o potencial da xilanase para melhorar a digestibilidade dos minerais foi um tanto menor do que seria se as dietas fossem à base de trigo, por exemplo.

Por isso, por algum tempo assumiu-se que dietas à base de milho e farelo de soja não causavam disfunções digestivas nas aves, e por esta razão o uso de carboidrases exógenas nestes casos era desnecessário (ZOU et al., 2013). Contudo, na composição desses ingredientes, é possível verificar que existem quantidades consideráveis de PNA's, desta forma o uso de carboidrases pode apresentar resultados positivos no desempenho animal. Schramm et al. (2016) afirmaram que a presença da fitase, em uma dieta à base de milho e farelo de soja, tem um efeito potencializador para a xilanase exógena. Neste estudo, os resultados de desempenho foram melhorados em frangos de corte alimentados com dietas contendo redução nutricional de 100 kcal/kg, 0,16% de Ca e 0,15 de Pdisp e suplementação enzimática de carboidrases (xilanase+glucanase), demonstrando a ação sinérgica dessa associação de enzimas.

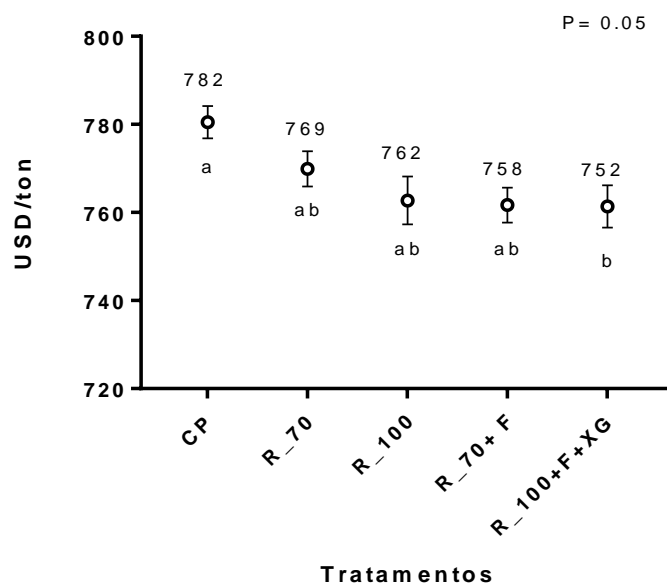
### 3.3.2 Rendimento de carcaça e custo de produção

Na avaliação do rendimento de carcaça resfriada não houve diferença significativa entre os tratamentos ( $P=0,21$ ), e as médias encontradas para cada tratamento foram: (CP) =  $79,94 \pm 0,83$ ; (R\_70) =  $79,05 \pm 0,89$ ; (R\_100) =  $79,07 \pm 1,39$ ; (R\_70 + F) =  $79,54 \pm 1,07$ ; (R\_100 + F + XG) =  $79,77 \pm 0,77$ .

O tratamento controle positivo apresentou maior custo de produção (USD/tonelada de carcaça resfriada) diferindo significativamente do tratamento R\_100+ F +XG (redução de 100 kcal/kg, 0,16% de Ca e 0,15% de Pdisp + fitase + xilanase + glucanase). Os tratamentos contendo reduções nutricionais sem a suplementação enzimática (R\_70 e R\_100) apresentaram custo de produção intermediário, equivalentes ao CP e ao tratamento R\_100+ F + XG.

A análise permitiu verificar que o custo de produção de 1 tonelada de carcaça resfriada de aves alimentadas com o tratamento controle positivo foi de 782 USD,

enquanto que dos frangos alimentados com o tratamento com redução nutricional e as enzimas (R\_100+ F + XG), foi de 752 USD, gerando ao final do processo uma redução de 30,0 USD no custo de produção da tonelada de carne resfriada.



Controle positivo (CP) - dieta basal (DB) - milho e farelo de soja; R\_70= DB com redução de 70 kcal/kg e 0.16% Ca e 0.15% Pdisp; R\_100= DB com redução de 100 kcal/kg e 0.16% Ca e 0.15% Pdisp; R\_70 + F= DB com redução de 70 kcal/kg e 0.16% Ca e 0.15% Pdisp+fitase (500FTU/kg); R\_100+ F + XG= DB com redução de 100 kcal/kg e 0.16% Ca e 0.15% Pdisp+fitase (500FTU/kg)+ xilanase (560TXU/kg)+glucanase (250TGU/kg). Médias seguidas por letras minúsculas distintas diferem entre si pelo teste de *Tukey* ( $P \leq 0,05$ ).

Figura 3: Gráfico do custo de produção de carcaças resfriadas de frangos de corte alimentados com dietas contendo reduções nutricionais suplementadas ou não com enzimas.

### 3.4 Conclusões

O uso isolado da fitase híbrida (500FTU/kg) é eficiente na manutenção do desempenho das aves alimentadas com dietas contendo redução de até 70 kcal/kg, 0.16% de Ca e 0.15% de Pdisp, ao longo de 42 dias. A associação da fitase híbrida (500 FTU/kg) com xilanase (560 TXU/kg) e glucanase (250 TGU/kg) é eficaz na manutenção do peso corporal e ganho de peso quando aplicada redução nutricional das matrizes dietéticas de 100 kcal/kg, 0,16% de Ca e 0,15% de Pdisp.

Frangos de corte alimentados com um pacote enzimático específico (500 FTU/kg fitase híbrida + 560 TXU/kg xilanase + 250 TGU/kg glucanase), associado a uma dieta com redução nutricional de 100 kcal/kg, 0,16% de Ca e 0,15% de Pdisp, durante 42 dias, apresentaram o menor custo de produção em USD/ tonelada de carcaça resfriada.

#### **4 Considerações Finais**

A dose de 500 FTU/kg da fitase híbrida, enzima criada a partir da união do DNA de três bactérias, e pela inoculação desse material no fungo *Aspergillus niger*, demonstrou ser eficaz no fornecimento de 70kcal/kg, permitindo a redução dessa quantidade de energia nas dietas. A qualidade óssea dos frangos também foi mantida pela suplementação da fitase híbrida (500 FTU/kg) em dietas com redução de 70 kcal/kg de EM, 0,16% de Ca e 0,15% de P disponível.

A maior valorização da energia (100 kcal/kg) pode ser aplicada quando a fitase híbrida for suplementada em associação com o pacote específico de carboidrases (xilânase – 560 TXU/kg + glucanase – 250 TGU/kg), sem impactos negativos sobre a digestibilidade da energia e dos parâmetros ósseos.

Ao avaliar o desempenho dos animais até os 42 dias de idade, o uso da fitase híbrida isolada (500 FTU/kg), aplicada sobre uma matriz nutricional menos restritiva (-70 kcal/kg), ou a associação da fitase com as carboidrases em rações com maior redução de energia (-100 kcal/kg), pode ser utilizada, sem que ocorram diminuições sobre as variáveis de peso corporal e ganho de peso. Porém, a suplementação da fitase + carboidrases não pôde reverter a piora na conversão alimentar aos 42 dias quando as aves foram alimentadas com dietas contendo redução de 100 kcal/kg de EM. Contudo, mesmo perante a esse resultado, o menor custo de produção em ton/carcaça resfriada foi atingido quando aplicada a matriz nutricional de 100 kcal/kg, 0,16% de Ca, 0,15% de Pdisp + fitase + carboidrases.

## Referências

- ADEOLA, O.; APPLGATE, T. J. Phosphorus and calcium equivalency of phytase. **In: Proceedings of the 1st international phytase summit.** Washington, DC, US, 2010. 45–64p.
- ALLOUCHE, L.; MADANI, T.; HAMOUDA, A.; BOUCHERIT, M. R.; TALEB, H.; SAMAH, O.; RAHMANI, K.; TOUABTI, A. Effect of addition of exogenous enzymes in hypocaloric diet in broiler chicken on performance, biochemical parameters and meat characteristics. **Biotechnology Animal Husbandry**, 31(4):551–565, 2015.
- ANGEL, R.; TAMIM, N. M.; APPLGATE, T. J.; DHANDU, A. S.; ELLESTAD, L. E. Phytic acid chemistry: influence on phytin-phosphorus availability and phytase efficacy. **Journal of Applied Poultry Research**, 11: 471–480, 2002.
- AOAC. **Official methods of analysis.** 16<sup>th</sup> ed. Assoc.Off. Anal. Chem., Gaithersburg, MD, USA, 1995.
- AOAC. **Official Methods of Analysis.** Fertilizers, met 958. 01. 19<sup>th</sup> ed. Assoc.Off. Anal. Chem., Gaithersburg, MD, USA., 2012.
- AUGSPURGER, N.; UGALDE, E. 2009. Comparative phytase utilization in pigs and broiler chickens. **In: CONGRESSO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE AVES E SUÍNOS.** Campinas, SP, BR. 2009. 17–18p.
- BARBATO, G. F. Genetic control of food intake in chickens. **The Journal of Nutrition**, 124 (8):1341S-1348S, 1994.
- BAYER, E. A.; MORAG, E.; LAMED, R. The cellulosome - A treasure-trove for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, 12 (9): 379-386, 1994.
- BEDFORD, M. R. Exogenous enzymes in monogastric nutrition - Their current value and future benefits. **Animal Feed Science Technology**, 86 (1-2):1–13, 2000.
- BEDFORD, M. R.; SCHULZE, H. Exogenous enzymes for pigs and poultry. **Nutrition Research Reviews**, 11:91–114, 1998.
- BEDFORD, M. R.; WALK, C. L.; MASEY O'NEILL, H. V. Assessing measurements in feed enzyme research: Phytase evaluations in broilers. **Journal Applied of Poultry Research**, 25:305–314, 2016.
- BEIKI, M.; HASHEMI, S. M.; YAGHOOBFAR, A. The use of phytase and low phosphorus levels in broiler diets with different metabolizable energy levels. **Journal of Animal and Poultry Science**, 2 (2):48–54, 2013.

BONEY, J. W.; MORITZ, J. S. Phytase dose effects in practically formulated diets that vary in ingredient composition on feed manufacturing and broiler performance. **The Journal of Applied Poultry Research**, 26 (2):273–285, 2017.

BRYDEN, W.L.; SELLE, P.H.; RAVINDRAN, V.; ACAMOVIC, T. Phytate: an anti-nutrient factor in animal diets. **In: Poisonous plants: global research and solutions.** Eds KE Panter, TZ, Wierenga, J. fister, ed. CABI Publishing, Wallingford, UK. 2007. 279–289p.

CABAHUG, S.; RAVINDRAN, V.; SELLE, P. H.; BRYDEN, W. L. Response of broiler chickens to microbial phytase supplementation as influenced by dietary phytic acid and non-phytate phosphorus contents. I. Effects on bird performance and toe ash. **British Poultry Science**, 40: 660-666, 1999.

CAMPBELL, G. L.; BEDFORD, M. R. Enzyme applications for monogastric feeds: a review. **Canadian Journal of Animal Science**, 72, 449-466, 1992

CHEN, C. C.; CHENG, K. J.; KO, T. P.; GUO, R. T. Current Progresses in phytase research: three-dimensional structure and protein engineering. **ChemBioEng Rev**, 2 (2), 76-86, 2015.

CHERYAN, M.; RACKIS, J. J. Phytic acid interactions in food systems. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 13 (4): 297-335, 1980.

CHOCT, M. Enzymes for the feed industry: past, present and future. **World's Poultry Science Journal**, 62 (1): 5-16, 2006.

CHOCT, M. Feed non-starch polysaccharides: Chemical structures and nutritional significance. **In: Feed Milling International.** 1997, 191p.

CHOCT, M.; HUGHES, R. J.; WANG, J.; BEDFORD, M. R.; MORGAN, A. J.; ANNISON, G. Increased small intestinal fermentation is partly responsible for the anti-nutritive activity of non-starch polysaccharides in chickens. **British Poultry Science**, 37 (3): 609-621, 1996.

COMPÊNDIO BRASILEIRO DE ALIMENTAÇÃO ANIMAL - CBAA. Sindirações, São Paulo. 2009. 00p

COSGROVE, D. J. Inositol phosphate phosphatases of microbiological origin. inositol phosphate intermediates in the dephosphorylation of the hexaphosphates of myo-inositol, scyllo-inositol, and D-chiro-inositol by a bacterial (*Pseudomonas* sp.) phytase. **Australian Journal of Biological Science**, 23 (6): 1207-1220, 1970.

COSGROVE, D.J. Chemistry and biochemistry of inositol polyphosphates. **Reviews of Pure and Applied Chemistry**, 16: 209-224, 1966.

COWIESON, A. J.; ADEOLA, O. Carbohydrases, protease, and phytase have an additive beneficial effect in nutritionally marginal diets for broiler chicks. **Poultry Science**, 84 (12):1860–1867, 2005.



COWIESON, A. J.; BEDFORD, M. R. The effect of phytase and carbohydrase on ileal amino acid digestibility in monogastric diets: complimentary mode of action? **World's Poultry Science Journal**, 65 (4):609-624, 2009a.

COWIESON, A. J.; BEDFORD, M. R.; SELLE, P. H.; RAVINDRAN, V. Phytate and microbial phytase: implications for endogenous nitrogen losses and nutrient availability. **World's Poultry Science Journal**, 65 (03):401–418, 2009b.

COWIESON, A. J.; BEDFORD, M. R.; RAVINDRAN, V. Interactions between xylanase and glucanase in maize-soy-based diets for broilers. **British Poultry Science**, 51 (2):246–257, 2010.

COWIESON, A. J.; HRUBY, M.; PIERSON, E. E. M. Evolving enzyme technology: impact on commercial poultry nutrition. **Nutrition Research Reviews**, 19: 90-103, 2006a.

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**, 54 (3), 346-354, 2013.

COWIESON, A. J.; RUCKEBUSCH, J. P.; KNAP, I.; GUGGENBUHL, P.; FRU-NIJ, F. Phytate-free nutrition: A new rew paradigm in monogastric animal production. **Animal Feed Science and Techonology**, 222: 180-189, 2016.

COWIESON, A. J.; SINGH, D. N.; ADEOLA, O. Prediction of ingredient quality and the effect of a combination of xylanase, amylase, protease and phytase in the diets of broiler chicks. Energy and nutrient utilisation. **British Poultry Science**, 47 (4), 490-500, 2006b.

COWIESON, A. J.; WILCOCK, P.; BEDFORD, M. R. Super-dosing effects of phytase in poultry and other monogastrics. **World's Poultry Science Journal**, 67 (02), 225-236, 2011.

CÚNEO, F.; J. AMAYA-FARFAN, J.; CARRARO, F. Distribuição dos fitatos em farelo de arroz estabilizado e tratado com fitase exógena. **Food Science and Techology**, 20 (1): 24-98, 2000.

DERSJANT-LI, Y.; AWATI, A.; SCHULZE, H.; PARTRIDGE, G. Phytase in non-ruminant animal nutrition: A critical review on phytase activities in the gastrointestinal tract and influencing factors. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 95 (5):878–896, 2015.

FERKET, P. R.; GERNAT, A. G. Factors that affect feed intake of meat birds: A review. **International Journal of Poultry Science**, 5 (10):905–911, 2006.

GAUTHIER, R. Intestinal health, the key to productivity: the case of organic acids. In: Precongresso Científico Avícola IASA, XXVII Convernacion ANECA-WPDC. Puerto Vallarta, Mexico, 2002. 1-14p.

GOPINGER, E.; KRABBE, E.; SUREK, D.; LOPES, L.; AVILA, V. Live performance,

carcass, and bone quality responses of grower and finisher broilers to dietary metabolizable energy levels. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, 19 (4):559–566, 2017.

GREINER, R. Phytate-Degrading Enzymes: Regulation of Synthesis in Microorganisms and Plants. **In: Inositol Phosphates: Linking Agriculture and the Environment**, Turner, B.L.; Richardson, A. E.; Mullaney, E. J. Eds., CAB International, 2007. 78–96p.

GREINER, R.; KONIETZNY, U.; JANY, K. D. Purification and characterization of two phytases from *Escherichia coli*. **Archives of Biochemistry Biophysics**, 303 (1), 107-113, 1993

GUINOTTE, F.; GAUTRON, J.; NYS, Y.; SOUMARMON, A. Calcium solubilization and retention in the gastrointestinal tract in chicks (*Gallus domesticus*) as a function of gastric acid secretion inhibition and of calcium carbonate particle size. **British Journal of Nutrition**, 73 (1), 125- 139, 1995.

HA, N. C.; KIM, Y. O.; OH, T. K.; OH, B. H. Preliminary X-ray crystallographic analysis of a novel phytase from a *Bacillus amyloliquefaciens* strain. **Acta Crystallographica Section D**, 55 (Pt 3), 691-693, 1999.

HARTIG, T. Uber das klebermehl. *Botanische Zeitung*. 13:881, 1855.

HEGEMAN, C. E.; GRABAU, E. A. A novel phytase with sequence similarity to purple acid phosphatases is expressed in cotyledons of germinating soybean seedlings. **Plant Physiology**, 126 (4), 1598-1608, 2001.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4 ed. 1 ed digital. São Paulo. 2009, 1020p.

IRVING, G. C.; COSGROVE, D. J. Inositol phosphate phosphatases of microbiological origin: the inositol pentaphosphate products of *Aspergillus ficuum* phytases. **Journal of Bacteriology**, 112 (1), 434-438, 1972.

IUPAC-IUB. Commission on Biochemical Nomenclature. Abbreviations and symbols for the description of the conformation of polypeptide chains. Numbering of atoms in myo-inositol: recommendations 1988. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry. **Biochemical Journal**, 258:1–2, 1989.

JANSMAN, A. J. M.; SCHULZE, H.; VAN LEEUWEN, P.; VERSTEGEN, M. W. A. Effects of protease inhibitors and lectins from soya on the true digestibility and endogenous excretion of crude protein in piglets. **Proceedings**, VI th International Symposium on Digestive Physiology in Pigs W. B. Souffrant, H. Hagemisster (eds). Bad Doberan, Germany. EAAP publ. nr. 80. 1994. 322-324p.

JUANPERE, J.; PÉREZ-VENDRELL, A. M.; ANGULO, E.; BRUFAU, J. Assessment of potential interactions between phytase and glycosidase enzyme supplementation on nutrient digestibility in broilers. **Poultry Science**, 84 (4): 571–580, 2005.

JÚNIOR, J. M. P. Estrutura e função do tecido ósseo. **In:** Fisiologia Aviária Aplicada a Frangos de Corte. FUNEP/UNESP, Jaboticabal, São Paulo, Brasil. 2002. 375p.

KARIMI, A.; COTO, C.; MUSSINI, F.; GOODGAME, S.; LU, C.; YUAN, J.; BEDFORD, M. R.; WALDROUP, P. W. Interactions between phytase and xylanase enzymes in male broiler chicks fed phosphorus-deficient diets from 1 to 18 days of age. **Poultry Science**, 92:1818–1823, 2013.

KIES, A. K.; DE JONGE, L. H.; KEMME, P. A.; JONGBLOED, A. W. Interaction between protein, phytate, and microbial phytase. In Vitro studies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 54 (5): 1753-1758, 2006.

KLASING, K. C. Comparative avian nutrition. 1<sup>th</sup> ed. CAB International: Wallingford, UK. 1998. 352p.

KNOWLTON, K.; RADCLIFFE, J.; NOVAK, C.; EMMERSON, D. Animal management to reduce phosphorus losses to the environment. **Journal of Animal Science**, 82, E173–E195, 2004.

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

KOCHER, A.; CHOCT, M.; ROSS, G.; BROZ, J.; CHUNG, T. K. Effects of enzyme combinations on apparent metabolizable energy of corn-soybean meal-based diets in broilers. **The Journal of Applied Poultry Research**, 12 (3): 275–283, 2003.

KONIETZNY, U.; GREINER, R. Bacterial phytase: Potential application, *in vivo* function and regulation of its synthesis. **Brazilian Journal of Microbiology**, 35 (1-2): 11-18, 2004.

KORNEGAY, E. T. Digestion of phosphorus and other nutrients: the role of phytases and factors influencing their activity. **In:** Enzymes in farm animal nutrition. BEDFORD, M. R.; PARTRIDGE, G.G. 2001. 432p.

KRABBE, E. L.; SUREK, D.; AVILA, V. S.; RUIZ, J. H.; ADER, P. Effect of dietary Natugrain TS enzyme supplementation on broiler diet digestibility. **In:** PSA ANNUAL MEETING, 2014, Corpus Christi, Texas, US. PSA ANNUAL MEETING, 2014.

LEI, X. G.; WEAVER, J. D.; MULLANEY, E.; ULLAH, A. H.; AZAIN, M. J. Phytase, a New Life for an “Old” Enzyme. **Annual Review of Animal Bioscience**, 1:283–309, 2013.

LETOURNEAU-MONTMINY, M. P.; LESCOAT, P.; NARCY, A.; SAUVANT, D.; BERNIER, J. F.; MAGNIN, M.; POMAR, C.; NYS, Y.; JONDREVILLE, C. Effects of reduced dietary calcium and phytase supplementation on calcium and phosphorus utilisation in broilers with modified mineral status. **British Poultry Science**, 49 (6): 705-715, 2008.

LI, X.; ZHANG, D.; BRYDEN, W. L. Calcium and phosphorus metabolism and nutrition of poultry: Are current diets formulated in excess? **Animal Production**

**Science**, 57 (11): 2304–2310, 2017.

LI, X.; ZHANG, D.; YANG, T. Y.; BRYDEN, W. L. Phosphorus bioavailability: A key aspect for conserving this critical animal feed resource with reference to broiler nutrition. **Agriculture**, 6 (2): 1-15, 2016.

LIMA, F. R. Aditivos zootécnicos: enzimas. **In**: PALERMO NETO, J.; SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L. Farmacologia aplicada à avicultura. São Paulo: ROCA; 2005. v 1. Cap 16, 239-248p.

LIU, N.; RU, Y. J.; COWIESON, A. J.; LI, F. D.; CHENG, X. C. H. Effects of phytate and phytase on the performance and immune function of broilers fed nutritionally marginal diets. **Poultry Science**, 87: 1105-1111, 2008a.

LIU, N.; RU, Y. J.; LI, F. D.; COWIESON, A. J. Effect of diet containing phytate and phytase on the activity and messenger ribonucleic acid expression of carbohydrase and transporter transporter in chickens. **Journal of Animal Science**, 86: 3432-3439, 2008b.

LIU, N.; RU, Y. J.; LI, F. D.; WANG, J.; LEI, X. Effect of dietary phytate and phytase on proteolytic digestion and growth regulation of broilers. **Archives of Animal Nutrition**, 63: 292-303, 2009.

LIU, J. B.; CHEN, D. W.; ADEOLA, O. Phosphorus digestibility response of broiler chickens to dietary calcium-to-phosphorus ratios. **Poultry Science**, 92 (6): 1572–1578, 2013.

LOTT, J. N. A.; OCKENDEN, I.; RABOY, V.; BATTEN, G. D. Phytic acid and phosphorus in crop seeds and fruits: a global estimate. **Seed Science Research**, 10 (1): 11-33, 2000.

LU, H.; ADEDOKUN, S. A.; PREYNAT, A.; LEGRAND-DEFRETIN, V.; GERAERT, P. A.; ADEOLA, O.; AJUWON, K. M. Impact of exogenous carbohydrases and phytase on growth performance and nutrient digestibility in broilers. **Canadian Journal of Animal Science**, 93 (2): 243–249, 2013.

LU, L.; DONG LIAO, X.; GANG LUO, X. Nutritional strategies for reducing nitrogen, phosphorus and trace mineral excretions of livestock and poultry. **Journal of Integrative Agriculture**, 16 (12): 2815–2833, 2017.

MAENZ, D. D. 2001. Enzymatic and other characteristics of phytases as they relate to their use in animal feeds. **In**: Enzymes in farm animal nutrition. CABI Publishing, Wallingford, UK. 2001. 61–84p.

MASEY O'NEILL, H. V.; MATHIS, G.; LUMPKINS, B. S.; BEDFORD, M. R. The effect of reduced calorie diets, with and without fat, and the use of xylanase on performance characteristics of broilers between 0 and 42 days. **Poultry Science**, 91:1356–1360, 2012.

MENG, X.; SLOMINSKI, B. A. Nutritive values of corn, soybean meal, canola meal,

and peas for broiler chickens as affected by a multicarbohydrase preparation of cell wall degrading enzymes. **Poultry Science**, 84:1242–1251, 2005.

MENG, X.; B. A. SLOMINSKI, B. A.; NYACHOTI, C. M.; CAMPBELL, L. D.; GUENTER, W. Degradation of cell wall polysaccharides by combinations of carbohydrase enzymes and their effect on nutrient utilization and broiler chicken performance. **Poultry Science**, 84:37–47, 2005.

MIELE, M.; MARTINS, F. M.; SANTOS FILHO, J. I.; SANDI, A. J. Metodologia para o Cálculo do Custo do Produção de Frango de Corte – Versão 2. 2010.23p.

MULLANEY, E. J.; GIBSON, D. M.; ULLAH, A. H. Positive identification of a lambda gt11 clone containing a region of fungal phytase gene by immunoprobe and sequence verification. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 35 (5): 611-614, 1991.

NAVES, L. P. Antinutritional effect of the phytic acid on calcium and use of phytase in broiler diets. **Revista Eletrônica Nutritime**, 11 (03): 3399–3409, 2014.

NEWMAN, K. Phytase: the enzyme its origin e characteristics: impact and potential for increasing phosphorus availability. In: *Biotechnology in feed industry. Proceedings of Alltech's seventh annual symposium.* Edt. T. P. Lyons ed. Alltech Technical publications, Nicholasville, Kentucky. 1991. 169–177p.

OH, B. C.; CHOI, W. C.; PARK, S.; KIM, Y. O.; OH, T. K. Biochemical properties and substrate specificities of alkaline and histidine acid phytases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 63 (4): 362–372, 2004.

OLIVEIRA, D. H de.; NAVES, L. P.; NARDELLI, N. B. S.; ZANGERÔNIMO, M. G.; RODRIGUES, P. B. Ileal digestibility of calcium and phosphorus in broilers fed diets with different phytases and Ca: Available P ratios. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 53 (11): 1222–1229, 2018.

OLUKOSI, O. A.; ADEOLA, O. Whole body nutrient accretion, growth performance and total tract nutrient retention responses of broilers to supplementation of xylanase and phytase individually or in combination in wheat-soybean meal based diets. **The Journal of Poultry Science**, 45 (3):192–198, 2008.

OLUKOSI, O. A.; COWIESON, A. J.; ADEOLA, O. Energy utilization and growth performance of broilers receiving diets supplemented with enzymes containing carbohydrase or phytase activity individually or in combination. **The British Journal of Nutrition**, 99 (3): 682-690, 2008.

ONYANGO, E. M.; ASEM, E. K.; ADEOLA, o. Phytic acid increases mucin and endogenous amino acid losses from the gastrointestinal tract of chickens. **British Journal of Nutrition**, 101: 836-842, 2009.

PASQUALI, G. A. M.; OLIVEIRA, R. F.; AIELLO, P. A. B.; POLYCARPO, G.V.; CRIVELLARI, R.; POLYCARPO, V. C. C. Performance and economic viability of broiler chicken fed diets with multienzyme complexes. **Acta Scientiarum. Animal**

**Science**, 39 (1): 91-96, 2017.

POWELL, S. S.; BIDNER, T. D.; SOUTHERN, L. L. Phytase supplementation improved growth performance and bone characteristics in broilers fed varying levels of dietary calcium. **Poultry Science**, 90 (3): 604-608, 2011.

R CORE TEAM. 2015. R Core Team. R A Lang. Environ. Stat. Comput. R Found. Stat. Comput. , Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>

RAO, D. E. C. S.; RAO, K. V.; REDDY, T. P.; REDDY, V. D. Molecular characterization, physicochemical properties, known and potential applications of phytases: An overview. **Critical Reviews in Biotechnology**, 29 (2):182–198, 2009.

RAVINDRAN, V. Feed enzymes: The science, practice, and metabolic realities. **The Journal of Applied Poultry Research**, 22 (3):628–636, 2013.

RAVINDRAN, V. Nutrition of meat animals. **Encyclopedia of Meat Sciences**, 2:463–470, 2014.

RAVINDRAN, V.; MOREL, P. C. H.; PARTRIDGE, G. G.; HRUBY, M.; SANDS, J. S. Influence of an Escherichia coli-derived phytase on nutrient utilization in broiler starters fed diets containing varying concentrations of phytic acid. **Poultry Science**, 85 (1): 82-89, 2006.

RAVINDRAN, V.; SELLE, P. H.; BRYDEN, W. L. Effects of phytase supplementation, individually and in combination, with glycanase, on the nutritive value of wheat and barley. **Poultry Science**, 78:1588–1595, 1999.

RAZA, A.; BASHIR, S.; TABASSUM, R. An update on carbohydrases: growth performance and intestinal health of poultry. **Heliyon**, 5 (4): e01437, 2019.

REDDY, N. R.; SATHE, S. K.; SALUNKHE, D. K. Phytates in legumes and cereals. **Advances in Food Research**, 28: 1–91, 1982.

RIBEIRO, T. P.; DAL PONT, G. C.; DAHLKE, F.; ROCHA, C da.; SORBARA, J. O. B.; MAIORKA, A. Available phosphorus and calcium reduction in the finisher phase and phytase utilization on broilers. **The Journal of Applied Poultry Research**, 28 (2): 263–270, 2019.

RIOS, H. V.; VIEIRA, S. L.; STEFANELLO, C.; KINDLEIN, L.; SOSTER, P.; P. I. SANTOS, P. I. dos.; TOSCAN, A. B. Energy and nutrient utilisation of maize-soy diet supplemented with a xylanase- $\beta$ -glucanase complex from *Talaromyces versatilis*. **Animal Feed Science and Technology**, 232:80–90, 2017.

RODRIGUEZ, E.; HAN, Y.; LEI, X.G. Cloning, sequencing, and expression of an Escherichia coli acid phosphatase/phytase gene (appa2) isolated from pig colon. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, 257 (1): 117–123, 1999a.

RODRIGUEZ, E.; PORRES, J. M.; HAN, Y.; LEI, X. G. Different sensitivity of

recombinant *Aspergillus niger* phytase (r-PhyA) and *Escherichia coli* pH 2.5 acid phosphatase (r-AppA) to trypsin and pepsin in vitro. **Archives of Biochemistry Biophysics**, 365 (2): 262-267, 1999b.

ROMERO, L. F.; SANDS, J. S.; INDRAKUMAR, S. E.; PLUMSTEAD, P. W.; DALSGAARD, S.; RAVINDRAN, V. Contribution of protein, starch, and fat to the apparent ileal digestible energy of corn- and wheat-based broiler diets in response to exogenous xylanase and amylase without or with protease1. **Poultry Science**, 93 (10): 2501–2513, 2014.

RUCKEBUSCH, J. P.; KNAP, I.; UMAR FARUK, M.; UPTON AUGUSTSSON, E. (2013). How to overcome antinutritional factors by using a range of enzymes. In: Global Feed and Food Congress 2013, South Africa.

RUTHERFURD, S. M.; CHUNG, T. K.; THOMAS, D. V.; ZOU, M. L.; MOUGHAN, P. J. Effect of a novel phytase on growth performance, apparent metabolizable energy, and the availability of minerals and amino acids in a low-phosphorus corn-soybean meal diet for broilers. **Poultry Science**, 91 (5): 1118–1127, 2012.

SAJIDAN, A.; FAROUK, A.; GREINER, R.; JUNGBLUT, P.; MÜLLER, E. C.; BORRISS, R. Molecular and physiological characterisation of a 3-phytase from soil bacterium *Klebsiella* sp. ASR1. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 65 (1): 110-118, 2004.

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

SAUVEUR, B. Phytic phosphorus and phytases in the nutrition of poultry. **INRA Productions Animales**, 2 (5): 343-351, 1989.

SCHRAMM, V. G.; DURAU, J. F.; BARRILLI, L. N. E.; SORBARA, J. O. B.; COWIESON, A. J.; FELIX, A. P.; MAIORKA, A. Interaction between xylanase and phytase on the digestibility of corn and a corn / soy diet for broiler chickens. **Poultry Science**, 2016, (0):1–8.

SELLE, P. H.; COWIESON, A. J.; RAVINDRAN, V. Consequences of calcium interactions with phytate and phytase for poultry and pigs. **Livestock Science**, 124 (1-3): 126-141, 2009

SELLE, P. H.; RAVINDRAN, V. Microbial phytase in poultry nutrition. **Animal Feed Science Technology**, 135 (1-2): 1–41, 2007.

SELLE, P. H.; RAVINDRAN, V.; BRYDEN, W. L.; SCOTT, T. Influence of dietary phytate and exogenous phytase on amino acid digestibility in poultry: A Review. **The Journal of Poultry Science**, 43 (2): 89-103, 2006.

SHELTON, J. L.; SOUTHERN, L. L.; GASTON, A.; FOSTER, A. Evaluation of the nutrient matrix values for phytase in broilers. **The Journal of Applied Poultry Research**, 13:213–221, 2004.

- SINGH, B.; SATYANARAYANA, T. Phytases from thermophilic molds: Their production, characteristics and multifarious applications. **Process Biochemistry**, 46 (7): 1391–1398, 2011.
- SINGH, N. K.; JOSHI, D. K.; GUPTA, R. K. Isolation of phytase producing bacteria and optimization of phytase production parameters. **Jundishapur Journal of Microbiology**, 6(5): e6419, 2013.
- SLOMINSKI, B. A. Recent advances in research on enzymes for poultry diets. **Poultry Science**, 90 (9): 2013–2023, 2011.
- SLOMINSKI, B. A.; GUENTER, W.; CAMPBELL, L. D. New approach to water-soluble carbohydrate determination as a tool for evaluation of plant cell wall degrading enzymes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 41 (12): 2304-2308, 1993.
- STEFANELLO, C.; VIEIRA, S. L.; CARVALHO, P. S.; SORBARA, J. O. B.; COWIESON, A. J. Energy and nutrient utilization of broiler chickens fed corn-soybean meal and corn-based diets supplemented with xylanase. **Poultry Science**, 95 (8): 1881–1887, 2016.
- ŚWIĄTKIEWICZ, S.; ARCZEWSKA-WLOSEK, A. Bone quality characteristics and performance in broiler chickens fed diets supplemented with organic acids. **Czech Journal of Animal Science**, 57 (4): 193–205, 2012.
- TABELAS BRASILEIRAS PARA AVES E SUÍNOS. Composição de alimentos e exigências nutricionais. 4 ed. Viçosa, MG: UFV, Departamento de Zootecnia, 2017. 488p.
- TABELAS BRASILEIRAS PARA AVES E SUÍNOS. Composição de alimentos e exigências nutricionais. 3 ed. Viçosa, MG: UFV, Departamento de Zootecnia, 2011. 252p.
- TAMIM, N. M.; ANGEL, R. Phytate phosphorus hydrolysis as influenced by dietary calcium and micro-mineral source in broiler diets. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51 (16): 4687-4693, 2003.
- THEANDER, O.; WESTERLUND, E.; ÅMAN, P.; GRAHAM, H. Plant cell walls and monogastric diets. **Animal Feed Science and Technology**, 23 (1-2): 205-225, 1989.
- TORRALLARDONA, D.; ADER, P.; COELHO, M. Validation of the extended matrix values for energy and amino acids of a new novel 6-phytase, Natuphos E, in weaned piglets. **Journal of Animal Science**, 95 (2): 117–118, 2017.
- TOTH, J. D.; DOU, Z.; FERGUSON, J. D.; GALLIGAN, D. T.; RAMBERG, C. F. Nitrogen- vs. phosphorus-based dairy manure applications to field crops: nitrate and phosphorus leaching and soil phosphorus accumulation. **Journal of Environmental Quality**, 35 (6): 2302 - 2312, 2006.
- TYE, A.; SIU, F.; LEUNG, T.; LIM, B. Molecular cloning and the biochemical



characterization of two novel phytases from *B. subtilis* 168 and *B. licheniformis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 59 (2-3): 190-197, 2002.

ULLAH, A. H. J.; CUMMINS, B. J.; DISCHINGER, H. C. Cyclohexanedione modification of arginine at the active site of *Aspergillus ficuum* phytase. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, 178 (1): 45-53, 1991.

VAN DER KAAJ, J.; VAN HAASSTERT, P. J. M. Stereospecificity of inositol hexakisphosphate dephosphorylation by *Paramecium* phytase. **Biochemical Journal**, 312 (Pt 3): 907-910, 1995.

VAN ETEN, R. L.; DAVIDSON, R.; STEVIS, P. E.; MACARTHUR, H.; MOORE, D. L. Covalent structure, disulfide bonding, and identification of reactive surface and active site residues of human prostatic acid phosphatase. **The Journal of Biological Chemistry**, 266 (4), 2313-2319, 1991.

VAN HARTINGSVELDT, W.; VAN ZEIJL, C. M. J.; HARTEVELD, G. M.; GOUKA, R. J.; SUYKERBUYK, M. E. G.; LUITEN, R. G. M.; VAN PARIDON, P. A.; SELTEN, G. C. M.; VEENSTRA, A. E.; VAN GORCOM, R. F. M.; VAN DEN HONDEL, C. A. M. J. Cloning, characterization and overexpression of the phytase-encoding gene (*phyA*) of *Aspergillus niger*. **Gene**, 127 (1), 87-94, 1993.

VATS, P.; BANERJEE, U. C. Production studies and catalytic properties of phytases (myo-inositolhexakisphosphate phosphohydrolases): An overview. **Enzyme and Microbial Technology**, 35 (1): 3–14, 2004.

VOHRA, A.; SATYANARAYANA, T. Phytases: microbial sources, production, purification and potential biotechnological applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, 23(1): 29–60, 2003.

WALK, C. L.; BEDFORD, M. R.; MCELROY, A. P. Influence of limestone and phytase on broiler performance, gastrointestinal pH, and apparent ileal nutrient digestibility. **Poultry Science**, 91 (6): 1371-1378, 2012.

WILGUS, H. S. The quantitative requirement of growing chick for calcium and phosphorus. **Poultry Science**, 10: 107–117, 1931.

WILLIAMS, M. P.; KLEIN, J. T.; WYATT, C. L.; YORK, T. W.; LEE, J. T. Evaluation of xylanase in low-energy broiler diets. **The Journal of Applied Poultry Research**, 23 (2): 188–195, 2014.

WILSON, D. B. Processive and nonprocessive cellulases for biofuel production - Lessons from bacterial genomes and structural analysis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 93 (2): 497-502, 2012.

WODZINSKI, R. J.; ULLAH, A. H. J. Phytase. **Advances in Applied Microbiology**, 42: 263-302, 1996.

WOYENGO, T. A.; NYACHOTI, C. M. Review : Supplementation of phytase and carbohydrases to diets for poultry. **Canadian Journal of Animal Science**, 91

(2):177–192, 2011.

WOYENGO, T. A.; NYACHOTI, C. M. Review: Anti-nutritional effects of phytic acid in diets for pigs and poultry current knowledge and directions for future research. **Canadian Journal of Animal Science**, 93: 9-21, 2013.

WOYENGO, T. A.; WILSON, J. Enhancing nutrient utilization in maize for broiler chickens by superdosing phytase. **Animal Feed Science and Technology**, 252:34–40, 2019.

WYSS, M.; BRUGGER, R.; KRONENBERGER, A.; RÉMY, R.; FIMBEL, R.; OESTERHELT, LEHMANN, M.; VAN LOON, A. P. G. M. Biochemical characterization of fungal phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): Catalytic properties. **Applied and Environmental Microbiology**, 65 (2): 367–373, 1999.

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

ZOU, J.; ZHENG, P.; ZHANG, K.; DING, X.; BAI, S. Effects of exogenous enzymes and dietary energy on performance and digestive physiology of broilers. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, 4:(14): 1-9, 2013.