

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

GABRIELA GLAESER SANGALLI

CARBOIDRASES ASSOCIADAS ÀS ALTAS DOSES DE FITASE EM DIETAS PARA
FRANGOS DE CORTE

MARECHAL CÂNDIDO RONDON

2019

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

GABRIELA GLAESER SANGALLI

**CARBOIDRASES ASSOCIADAS ÀS ALTAS DOSES DE FITASE EM DIETAS PARA
FRANGOS DE CORTE**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Nutrição e Produção Animal, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cinthia Eyng
Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Vianna Nunes

MARECHAL CÂNDIDO RONDON

2019

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

Sangalli, Gabriela Glaeser
Carboidrases associadas às altas doses de fitase em dietas para frangos de corte / Gabriela Glaeser Sangalli; orientador(a), Cinthia Eyng; coorientador(a), Ricardo Vianna Nunes, 2020.
64 f.

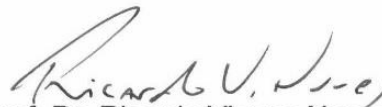
Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus Marechal Cândido Rondon, Centro de Ciências Agrárias, Graduação em Zootecnia Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, 2020.

1. Nutrição animal. 2. Avicultura. 3. Enzimas exógenas. I. Eyng, Cinthia. II. Vianna Nunes, Ricardo. III. Título.

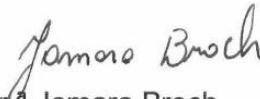
GABRIELA GLAESER SANGALLI

Carboidrases associadas a altas doses de fitase em dietas para frangos de corte

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



Coorientador / Presidente – Prof. Dr. Ricardo Vianna Nunes
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste) - *Campus* de Mal. Cândido Rondon



Membro – Dr.^a Jomara Broch
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste – PNPd/PPZ)
Campus de Mal. Cândido Rondon



Membro – Prof. Dr. Paulo Cesar Pozza
Universidade Estadual de Maringá (UEM)

Marechal Cândido Rondon, 13 de dezembro de 2019.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela presença constante em minha vida, guiando-me sempre por caminhos seguros. Sou grata ainda pela saúde, por sempre ouvir minhas orações, por me confortar em todos os momentos, pela força em persistir e superar os desafios.

Aos meus pais Hélio e Noeli, que não só neste momento, mas em toda vida estiveram ao meu lado, por todo apoio, compreensão e carinho. Aos meus irmãos, Aline, Dariane e Junior, por darem sentido à palavra FAMÍLIA e por estarem sempre presentes quando precisei.

Agradeço também ao meu namorado Alisson, que sempre esteve comigo nos momentos mais felizes da minha vida e por sempre me amparar nos momentos difíceis. Pelo amor, companheirismo, amizade e paciência que tem dedicado a mim.

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

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos concedida.

Aos meus amigos Vaneila, Jomara, Tânia, Cleison e Nilton, que foram essenciais para que eu chegasse até aqui, e aos demais colegas do grupo de pesquisa GEMADA, muito obrigada.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Cinthia Eyng e ao Prof. Dr. Ricardo Vianna Nunes pela oportunidade e por todo conhecimento e orientação, contribuindo para meu crescimento pessoal e profissional.

CARBOIDRASES ASSOCIADAS ÀS ALTAS DOSES DE FITASE EM DIETAS PARA FRANGOS DE CORTE

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar superdoses de fitase associada às carboidrases em dietas com redução nutricional sobre o desempenho, rendimento de carcaça e cortes, peso relativo dos órgãos do trato gastrointestinal, morfometria intestinal, viscosidade da digesta, pH do conteúdo intestinal e cecal, qualidade de cama, parâmetros ósseos e sanguíneos de frangos de corte. Para tanto, foram utilizados 1.540 pintos de corte, machos, de um dia de idade, distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos, 14 repetições com 22 aves por unidade experimental. Os tratamentos consistiram em: controle positivo (CP): ração a base de milho e farelo de soja com inclusão de farinha de carne e farinha de vísceras sem enzimas; controle negativo (CN): ração CP com redução de 100 kcal, 0,15% P, 0,12% Ca, 4% AA e 5% Na; ração CN + carboidrase + fitase (1000, 1500 e 2000 FTU kg⁻¹). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey (P<0,05). As aves que receberam inclusão dietética de enzimas apresentaram ganho de peso (GP) e conversão alimentar (CA) semelhante ao grupo CP no período inicial (1 a 7 dias). De 1 a 21 dias, as aves que receberam enzimas apresentaram maior GP e melhor CA quando comparadas ao grupo CN. Para o período total (1 a 42 dias) as aves que receberam ração com os diferentes níveis de enzima apresentaram CA semelhante às aves do CP e CN. Aos 21 dias, as aves do tratamento CN apresentaram maior peso relativo de pâncreas em relação aos demais tratamentos e maior peso relativo do intestino delgado em relação às aves que receberam suplementação enzimática. Para o pH cecal, aos 21 dias, as aves do CN apresentaram menor valor quando comparadas as aves dos tratamentos com 1500 e 2000 FTU. Aos 42 dias, as aves do CP apresentam menor pH cecal em relação as aves dos tratamentos com 1000 e 1500 FTU. Aves que receberam CN apresentaram menor teor de amônia na cama aos 42 dias em relação aos demais tratamentos. A inclusão de carboidrase associada a diferentes níveis de fitase não alterou os demais parâmetros avaliados. Para os parâmetros ósseos aos 21 e 42 dias não houve diferença (P>0,05) entre os tratamentos quanto à resistência a ruptura, índice de seedor, densidade e placa de crescimento. Para matéria mineral e teores de cálcio e fósforo dos ossos da tíbia aos 21 e 42 dias de idade, não houve diferença (P>0,05) entre os tratamentos. Sobre os parâmetros sanguíneos aos 21 dias, as concentrações de Ca e P no sangue foram maiores nas aves que receberam 1000 FTU kg⁻¹.

Para triglicerídeos as aves da dieta CN e 1000 FTU kg⁻¹ apresentaram maiores concentrações. Para fosfatase alcalina aves que receberam dieta com 1500 FTU kg⁻¹ apresentaram menor concentração ao comparar com o CP. Na glicose e proteína total não se constatou diferença (P>0,05). Aos 42 dias, a concentração de Ca, P e PT foi maior nas aves que receberam a dieta CP. Para glicose, a maior concentração foi nas aves que receberam 2000 FTU kg⁻¹ em comparação aos que receberam 1000 FTU kg⁻¹. Para triglicerídeos a concentração foi menor nas aves que receberam 1000 e 1500 FTU kg⁻¹. Para fosfatase alcalina não houve diferença (P>0,05). A utilização de fitase associada às carboidrases em dietas com redução nutricional manteve o desempenho das aves na fase pré-inicial. Na fase de crescimento o desempenho dessas aves foi superior ao tratamento CN, não se equiparando ao CP. A adição de carboidrases associada a 1000 FTU kg⁻¹ de fitase proporcionou aumento sérico de cálcio, fósforo e proteína total das aves aos 21 dias. Aos 42 dias as aves da dieta CP apresentaram maiores níveis de cálcio e fósforo e a inclusão de enzimas reduziu estes teores, porém, os parâmetros ósseos não foram alterados.

Palavras-chave: xilanase, fitato, saúde intestinal, características ósseas.

CARBOHYDRAS ASSOCIATED WITH HIGH DOSES OF PHYTASE IN DIETS FOR BROILER CHICKENS

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate phytase overdoses associated with carbohydrates in diets with nutritional reduction on performance, carcass and cut yields, relative weight of organs of the gastrointestinal tract, intestinal morphometry, digestion viscosity, pH of intestinal and cecal contents, quality of bedding, bone and blood parameters of broilers. For this purpose, 1,540 male day-old broiler chicks were used, distributed in a completely randomized design with five treatments, 14 repetitions with 22 birds per experimental unit. The treatments consisted of: positive control (CP): ration based on corn and soybean meal with the inclusion of meat meal and offal meal without enzymes; negative control (CN): CP diet with a reduction of 100 kcal, 0.15% P, 0.12% Ca, 4% AA and 5% Na; CN feed + carbohydrase + phytase (1000, 1500 and 2000 FTU kg⁻¹). The data obtained were subjected to analysis of variance and the means compared by the Tukey test ($P < 0.05$). The birds that received dietary inclusion of enzymes showed weight gain (GP) and feed conversion (CA) similar to the CP group in the initial period (1 to 7 days). From 1 to 21 days, the birds that received enzymes showed higher GP and better CA when compared to the CN group. For the total period (1 to 42 days) the birds that received feed with the different levels of enzyme showed similar CA to the birds of CP and CN. At 21 days, the birds in the CN treatment showed a higher relative weight of the pancreas in relation to the other treatments and a higher relative weight of the small intestine in relation to the birds that received enzymatic supplementation. For the cecal pH, at 21 days, the birds of the CN showed lower value when compared to the birds of the treatments with 1500 and 2000 FTU. At 42 days, the birds of the CP have lower pH cecal in relation to the birds of the treatments with 1000 and 1500 FTU. Birds that received CN had lower ammonia content in bed at 42 days compared to other treatments. The inclusion of carbohydrase associated with different levels of phytase did not change the other parameters evaluated. For bone parameters at 21 and 42 days, there was no difference ($P > 0.05$) between treatments regarding rupture resistance, seeder index, density and growth plate. For mineral matter and calcium and phosphorus contents of the tibial bones at 21 and 42 days of age, there was no difference ($P > 0.05$) between treatments. Regarding blood parameters at 21 days, the concentrations of Ca and P in the blood were higher in birds

that received 1000 FTU kg⁻¹. For triglycerides, birds of the CN diet and 1000 FTU kg⁻¹ showed higher concentrations. For alkaline phosphatase birds that received a diet with 1500 FTU kg⁻¹ showed lower concentration when compared to CP. Glucose and total protein showed no difference ($P > 0.05$). At 42 days, the concentration of Ca, P and PT was higher in birds that received the CP diet. For glucose, the highest concentration was in birds that received 2000 FTU kg⁻¹ compared to those that received 1000 FTU kg⁻¹. For triglycerides the concentration was lower in birds that received 1000 and 1500 FTU kg⁻¹. There was no difference for alkaline phosphatase ($P > 0.05$). The use of phytase associated with carbohydrases in diets with nutritional reduction maintained the birds' performance in the pre-initial phase. In the growth phase, the performance of these birds was superior to the CN treatment, not equaling the CP. The addition of carbohydrases associated with 1000 FTU kg⁻¹ phytase provided an increase in serum calcium, phosphorus and total protein of the birds at 21 days. At 42 days, birds on the CP diet showed higher levels of calcium and phosphorus and the inclusion of enzymes reduced these levels, however, the bone parameters were not changed.

Keywords: Xylanase, phytate, intestinal health, bone characteristics.

LISTA DE TABELAS

3. CARBOIDRASES ASSOCIADAS ÀS ALTAS DOSES DE FITASE EM DIETAS PARA FRANGOS DE CORTE.....	25
Tabela 1. Composição percentual e calculada das rações experimentais.....	30
Tabela 2. Desempenho de frangos de corte alimentados com dietas contendo carboidrases e diferentes níveis de fitase.	34
Tabela 3. Peso relativo (% peso vivo) dos órgãos do trato gastrointestinal de frangos de corte, aos 21 dias de idade, alimentados com dietas contendo carboidrases e diferentes níveis de fitase.	36
Tabela 4. Peso relativo (% peso vivo) dos órgãos do trato gastrointestinal de frangos de corte, aos 42 dias de idade, alimentados com dietas contendo carboidrases e diferentes níveis de fitase.	37
Tabela 5. Altura de vilo (μm), profundidade de cripta (μm), relação altura de vilo:profundidade de cripta e área de absorção (μm^2) do segmento jejuno de frangos de corte aos 21 dias de idade, alimentados com dietas contendo carboidrases e diferentes níveis de fitase.	38
Tabela 6. pH do conteúdo da digesta do intestino delgado e conteúdo cecal e viscosidade da digesta de frangos de corte alimentados com dietas contendo carboidrases e diferentes níveis de fitase.....	39
Tabela 7. Rendimento de carcaça (%), rendimento de cortes (%) e porcentagem de gordura abdominal de frangos de corte, aos 42 dias de idade, alimentados com dietas contendo carboidrases e diferentes níveis de fitase.....	40
Tabela 8. Teor de matéria seca, pH e amônia volatilizada da cama de frangos de corte alimentados com dietas contendo carboidrases e diferentes níveis de fitase.	41
4. CARBOIDRASE E SUPERDOSE DE FITASE SOBRE OS PARÂMETROS ÓSSEOS E SANGÜÍNEOS DE FRANGOS DE CORTE	46
Tabela 1. Composição percentual e calculada das rações experimentais.....	51
Tabela 2. Parâmetros ósseos de frangos de corte, aos 21 e 42 dias de idade, alimentados com dietas contendo carboidrases e diferentes níveis de fitase.....	54
Tabela 3. Valores em porcentagem (%) de matéria mineral (MM), cálcio e fósforo de frangos de corte aos 21 e 42 dias de idade, alimentados com dietas contendo carboidrases e diferentes níveis de fitase.	55
Tabela 4. Parâmetros sanguíneos de frangos de corte, aos 21 dias de idade, alimentados com dietas contendo carboidrases e diferentes níveis de fitase.....	57
Tabela 5. Parâmetros sanguíneos de frangos de corte, aos 42 dias de idade, alimentados com dietas contendo carboidrases e diferentes níveis de fitase.....	58

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO	12
2.1 Ácido fítico e fitase	12
2.2 Polissacarídeos não-amiláceos e carboidrases	16
2.3 Associações enzimáticas em dietas para frangos de corte	18
2.4 Referências bibliográficas.....	20
3. CARBOIDRASES ASSOCIADAS ÀS ALTAS DOSES DE FITASE EM DIETAS PARA FRANGOS DE CORTE.....	25
3.1 Introdução	27
3.2 Material e métodos.....	28
3.4 Conclusão.....	42
3.5 Referências bibliográficas.....	43
4. CARBOIDRASES E SUPERDOSE DE FITASE SOBRE OS PARÂMETROS ÓSSEOS E SANGUÍNEOS DE FRANGOS DE CORTE.....	46
4.1 Introdução	48
4.2 Material e Métodos	49
4.3 Resultados e discussão.....	53
4.4 Conclusão.....	60
4.5 Referências bibliográficas.....	61

1. INTRODUÇÃO

A utilização de aditivos não nutricionais nas rações, como as enzimas exógenas, proporcionou melhorias nos índices produtivos dos frangos de corte com consequente redução dos custos de produção. Neste contexto, a adição de enzimas que não são produzidas ou apresentam baixa produção endógena é capaz de complementar a ação das enzimas existentes no trato gastrointestinal e aumentar a digestibilidade dos nutrientes por hidrolisar fatores antinutricionais contidos nos grãos, reduzindo a poluição ambiental causada pela excreção de compostos orgânicos e minerais não digeridos (MUNIR; MAQSOOD, 2013).

Inicialmente, estudos foram conduzidos avaliando a adição de enzimas em rações contendo ingredientes ricos em polissacarídeos não amiláceos, como o trigo, triticales, cevada, centeio, aveia entre outros, devido à maior concentração de compostos antinutricionais, visando o melhor aproveitamento destes alimentos (STRADA et al., 2005). No entanto, a utilização de enzimas, na forma isolada ou em associações, vem sendo estudada a fim de aumentar o valor nutritivo de alimentos comumente utilizados na fabricação de rações, principalmente o milho e o farelo de soja (SLOMINSKI, 2011). A melhor utilização dos nutrientes e da energia liberada pela ação das enzimas está relacionada com o melhor desempenho de frangos de corte (GHAYOUR-NAJAFABADI et al., 2018).

Dentre os compostos antinutricionais, destacam-se o fitato e os polissacarídeos não amiláceos (PNA's), substratos nos quais as enzimas fitase e carboidrases como a xilanase, respectivamente, são capazes de atuar. Em adição, a ação sinérgica destas enzimas pode aumentar a rentabilidade na produção, por proporcionar redução dos níveis nutricionais, mantendo desempenho similar ou superior as aves alimentadas com uma dieta tradicional. Daskovic et al. (2013) e Latham et al. (2016) ao avaliarem dietas para frangos de corte à base de milho e farelo de soja com suplementação enzimática, constataram melhora na disponibilidade de energia e redução dos efeitos negativos causados pelos fatores antinutricionais.

A adição de fitase nas dietas de não ruminantes visa disponibilizar o fósforo (P) que ocorre naturalmente na forma de ácido fítico e, assim, reduzir a quantidade de P inorgânico suplementado na dieta para atender à exigência do animal. As moléculas de ácido fítico podem estruturalmente estarem complexadas com outros nutrientes, sendo usualmente denominadas de fitato e ao serem hidrolisadas, podem disponibilizar além do fósforo, proteínas, minerais, aminoácidos e amido (RAVINDRAN et al., 1999). O uso de altas

dosagens de fitase, doses acima de 1500 FTU kg⁻¹, vem sendo utilizado a fim de reduzir os efeitos antinutricionais do fitato, não se concentrando somente na liberação de fósforo (WALK et al., 2013), mas também por apresentar efeitos extra-fosfóricos, mantendo o desempenho e a porcentagem de cinzas ósseas (WALK et al., 2012), melhorando a utilização de aminoácidos, cálcio e energia (COWIESON et al., 2011). Outro efeito extra-fosfórico é o fornecimento de mio-inositol, absorvido e utilizado em funções biológicas pelas aves, melhorando o desempenho das mesmas (LEE; BEDFORD, 2016).

A inclusão de carboidrases melhora o valor nutritivo das dietas de frangos de corte, além de neutralizar os efeitos negativos causados pelas fibras presentes nos ingredientes, como aumento da viscosidade da digesta decorrente da presença dos PNA's. As xilanases, enzimas carboidrases, disponibilizam mais energia, pois atuam na parede celular vegetal, liberando amido, lipídeos e proteínas (COWIESON, 2005). Já as glucanases, despolimerizam parcialmente os PNA's diminuindo a viscosidade do conteúdo intestinal, melhorando a absorção de nutrientes (CHOCT, 2006).

Diante disso, objetivou-se avaliar a inclusão de alta dose de fitase associada à carboidrases em dietas com redução nutricional sobre os parâmetros produtivos de saúde, sanguíneos e ósseos de frangos de corte.

2. REVISÃO

2.1 Ácido fítico e fitase

A alimentação de frangos de corte é baseada em ingredientes de origem vegetal, em especial o milho e o farelo de soja, que contêm parte do conteúdo de fósforo na forma de ácido fítico, utilizado apenas em pequena quantidade pelas aves (DONATO et al., 2011). O ácido fítico é a forma livre de hexafosfato de mioinositol (IP6) enquanto que o fitato, termo comumente utilizado, refere-se ao sal misto de ácido fítico. A fitina refere-se ao complexo depositado de IP6 com potássio, magnésio e cálcio, como encontrado em plantas (SELLE; RAVINDRAN, 2007).

A molécula de ácido fítico carregada negativamente em pH ácido, neutro e básico, permite a formação de complexos com moléculas de carga positiva, como os minerais, secreções endógenas do trato gastrointestinal, proteína dietética, entre outras, formando o chamado fitato, tornando-o resistente à hidrólise, reduzindo a digestibilidade dos nutrientes e a disponibilidade de energia (WOYENGO; NYACHOTI, 2013).

O fitato dificulta a absorção de nutrientes, pois é uma molécula polianiônica que possui grande capacidade de se ligar a nutrientes carregados positivamente e inibe a ação de enzimas proteolíticas (pepsina, tripsina e quimiotripsina) no trato gastrointestinal (SELLE, 2008). Portanto, os complexos fitato-proteína/aminoácido e fitato-proteína-mineral tornam-se difíceis de digerir e reduzem a utilização de proteínas, especialmente na parte inicial do trato gastrintestinal (DERSJANT-LI et al., 2015).

A formação destes complexos entre o ácido fítico e outras substâncias pode ser influenciada pelo pH. Em pH acima do ponto isoelétrico, ocorre a formação de complexos com proteína na presença de cátions divalentes (Ca, Mg, Zn) (KIES et al., 2006), estes complexos são insolúveis e resistentes a ação enzimática. Em adição, as dietas dos animais contêm elevado nível de cálcio em comparação com outros cátions, ocorrendo uma ligação mais forte do ácido fítico com o cálcio no intestino delgado, o qual tem um pH mais alto e favorece a formação desse complexo. Além disso, o ácido fítico pode aumentar a perda endógena de minerais, como o sódio, prejudicando a atividade da Na-K-ATPase no trato

gastrointestinal de aves, proteína transmembrana envolvida na absorção de nutrientes (DERSJANT-LI et al., 2015).

De fato, a formação do fitato reduz a disponibilidade de fósforo, um nutriente de alto custo e contribui para a poluição ambiental por meio das excretas com grande quantidade desse nutriente, além de reduzir a disponibilidade de outros minerais e proteínas (GUGGENBUHL et al., 2012).

Estima-se que 70% do fósforo presente nos constituintes de origem vegetal é complexado com moléculas de ácido fítico e não está disponível para absorção em não ruminantes. A biodisponibilidade de P no milho é em torno de 33% e no farelo de soja de 42%, segundo o NRC (1994).

Para contornar os efeitos negativos do fitato no trato gastrointestinal, além de possibilitar a redução nos custos de produção, a enzima fitase tem sido adicionada às rações. A fitase (mio-inositol hexafosfato fosfohidrolase; IP6) atua na molécula de fitato em reações sequenciais de desfosforilação (pentafofato-IP5, tetrafofato-IP4, trifosfato-IP3 e possivelmente inositol difosfato-IP2 e monofosfato-IP1) reduzindo em ésteres de fosfato de mio-inositol e ortofosfato (BEDFORD; PARTRIDGE, 2010), liberando cátions, proteínas e amido que podem estar complexados e indisponíveis para absorção intestinal (RAVINDRAN, 1999).

Neste sentido, as fitases são divididas em função do local onde a hidrólise da molécula de fitato é iniciada, sendo, 3-fitase (mio inositol hexaqui-fosfato 3-fosfohidrolase) atuante sobre o 3º carbono do anel de mio-inositol e a 6-fitase (mio inositol hexaqui-fosfato 6-fosfohidrolase) sobre o 6º carbono (BEDFORD; PARTRIDGE, 2010) e, em relação ao pH em que atuam, ácidas (2,5 a 6,0) ou alcalinas (6,0 a 8,0) (VATS; BANERJEE, 2004). Além disso, as enzimas podem ser classificadas como bacterianas ou fúngicas em função do microrganismo usado como doador de genes (SELLE; RAVINDRAN, 2007). Dentre os principais fatores que podem influenciar a ação da enzima, destacam-se: a origem da fitase (bacteriana ou fúngica), local de início da hidrólise (3 ou 6-fitase), os ingredientes da dieta, o que irá influenciar no nível de fitato, fósforo, cálcio e sódio e a espécie animal (sexo e idade) (DERSJANT-LI et al., 2015).

O mecanismo de ação da fitase engloba a transferência do grupo fosfato do substrato para a enzima e da mesma para a água. Segundo Augspurger et al. (2003), a fitase deve atuar eficientemente no trato gastrointestinal superior, principalmente no proventrículo e moela das aves, pois apresentam condições de pH ácido, mantendo a molécula de ácido fítico em estado solúvel. Conforme a digesta é conduzida ao intestino delgado (pH 6-7), a molécula de ácido

fitico se liga a minerais, formando precipitados insolúveis, dificultando a desfosforilação. No intestino delgado, existe a produção de fitase endógena, no entanto, acredita-se que seus efeitos são poucos significativos devido à baixa solubilidade do fitato e à alta concentração de cálcio associados a um pH relativamente alto. Contudo, existe pouca informação na literatura sobre a contribuição endógena na hidrólise do fitato (MORGAN et al., 2015).

Devido ao fato das fitases endógenas possuírem baixa eficiência, vem se buscando fitases que atuem em uma faixa mais ampla de pH, com características que melhorem sua aplicabilidade (SANANGELANTONI et al., 2018). As fitases alcalinas atuam em pH de 6,5 a 8,0 e são candidatas ideais, no entanto, não há até o momento preparação comercial disponível (KUMAR et al., 2017).

Segundo Akter et al. (2017) em frangos de corte, o principal local de atividade da fitase microbiana é o papo, e em seguida, a parte superior do trato digestivo. No entanto, Truong et al. (2017) relataram que o sítio primário de degradação do fitato por fitases de origem bacteriana é a moela. Onyango et al. (2005), ao confrontarem a atividade *in vitro* de fitases bacteriana (*Escherichia coli*) e fúngica (*Peniophora lycii*) relataram que a fitase bacteriana apresentou maior atividade em todos os segmentos do trato gastrointestinal, demonstrando uma melhor resistência. Em outro estudo *in vitro*, Igbasan et al. (2000) ao proporcionarem condições similares ao ambiente gástrico, incluindo pH e presença de pepsina, observaram que as fitases bacterianas foram mais eficientes em resistir ao desafio proposto quando comparadas às fitases de origem fúngica.

A atividade da enzima fitase é expressa em FTU kg⁻¹ e é definida como a quantidade de enzima que libera 1 µmol de fosfato inorgânico por minuto de uma solução a 0,0051 mol/l de fitato de sódio a uma temperatura de 37°C e pH de 5,5 (AOAC, 2000). Inicialmente, a dose recomendada do uso da fitase nas dietas de frangos de corte era de 500 FTU kg⁻¹ (SELLE; RAVIDRAN, 2007), mas devido aos efeitos negativos do fitato, o uso de doses superiores tem apresentado maior interesse (COWIESON et al., 2006).

Além de minimizar os efeitos negativos do fitato, tem sido demonstrado que a inclusão de doses superiores de fitase nas rações melhora a conversão alimentar, o rendimento de carcaça e ganho de peso corporal, em razão da retomada do equilíbrio entre os minerais, redução de perdas endógenas e fornecimento de inositol pela quebra do fitato (COWIESON et al., 2011). Walk et al. (2014) e Li et al. (2017), ao avaliarem a suplementação de altas doses de fitase em dietas para frangos de corte, relataram benefícios como a destruição do fitato e o fornecimento de inositol. Sendo assim, a inclusão de doses de fitase acima das recomendações da indústria pode proporcionar efeitos extra-fosfóricos, como possível melhora no

desempenho, redução de cálcio na ração, aproveitamento de outros nutrientes e deposição de cinzas e fósforo ósseo (BEDFORD, 2012). Respostas como essas não dependem apenas da dosagem utilizada, mas também podem variar de acordo com a fonte da fitase utilizada (MANOBHAVAN et al., 2016).

Além dos efeitos comumente relatados na literatura quando da inclusão de doses de fitase acima da recomendação usual, há que se considerar o efeito sobre os ésteres IP originados durante a hidrólise do fitato. A degradação do fitato gera produtos como o IP5, IP4, IP3 e IP2, que também podem ter efeito antinutricional, formando complexos com minerais e proteínas, prejudicando a digestibilidade (BEESON et al., 2017). Ao utilizar doses de fitase acima de 1500 FTU kg⁻¹, reduz-se os ésteres IP diminuindo os efeitos antinutricionais, como consequência, pode-se melhorar o desempenho dos animais (SHIRLEY; EDWARDS, 2003).

Considerando os benefícios relatados, a fitase exógena é comumente adicionada em rações para frangos de corte, como um meio de reduzir os efeitos antinutricionais do fitato, melhorando a disponibilidade de P na dieta e reduzindo sua excreção no ambiente. Scholey et al. (2018) comprovaram que o uso da enzima permite uma menor inclusão de fontes de fósforo inorgânico nas formulações das dietas.

Além disso, estudos comprovam a eficiência da ação da fitase sobre a disponibilidade de fósforo e outros minerais, mantendo o desempenho de frangos de corte e auxiliando na mineralização e resistência óssea e na metabolizabilidade do cálcio e fósforo pelas aves (LELIS et al., 2010; ALVARENGA et al., 2011; PARRA-MARTÍN et al., 2015).

De acordo com Beeson et al. (2017) e Sommerfeld et al. (2018) a suplementação de fitase em dietas com níveis nutricionais adequados e deficientes de fósforo resultou em maiores concentrações de mio-inositol na digesta da moela, do íleo e nas excretas de frangos de corte. Esses resultados indicam o potencial de degradação completa do ácido fítico com posterior liberação de mio-inositol no trato digestivo. O mio-inositol é sugerido como tendo diversas funções biológicas, desempenhando um papel na sobrevivência e crescimento das células, metabolismo lipídico e sensibilidade à insulina (LEE; BEDFORD, 2016). Quando adicionado em sua forma livre à dieta ou resultante da quebra do ácido fítico, o mio-inositol vem apresentando melhora no desempenho das aves (COWIESON et al., 2015).

Sommerfeld et al. (2018) ao avaliarem a influência da suplementação de fitase ou mio-inositol sobre o desempenho de frangos de corte, relataram que após a desfosforilação completa do IP6, a liberação de mio-inositol é um dos benefícios da adição de fitase,

independentemente dos efeitos sobre a liberação de P ou na melhora da digestibilidade de outros nutrientes.

Cowieson et al. (2013) relataram uma interação entre o mio-inositol e a fitase exógena, uma vez que em dietas com níveis normais ou reduzidos em fósforo, ao adicionar o mio-inositol na forma livre, melhorias quanto a eficiência alimentar somente foram observadas na presença da enzima. Da mesma forma, Farhadi et al. (2017) e Sommerfeld et al. (2018) não encontraram diferença sobre a digestibilidade da dieta com níveis reduzidos de fósforo e a mineralização óssea em aves que receberam suplementação de mio-inositol na forma livre.

Sendo assim, a inclusão de fitase em dietas de frangos de corte minimiza os efeitos antinutricionais contidos nos grãos, promovendo melhora no desempenho das aves e redução do custo com a formulação das rações. A fitase é capaz de disponibilizar, além do fósforo presente nos ingredientes, os demais nutrientes complexados com o ácido fítico. Desta maneira, além dos benefícios nutricionais, a inclusão da enzima ainda reduz a contaminação ambiental, através redução da excreção de minerais, principalmente o fósforo, no ambiente.

2.2 Polissacarídeos não-amiláceos e carboidrases

Alimentos de origem vegetal possuem em sua parede celular macromoléculas de polímeros de açúcares simples, conhecidos por polissacarídeos não-amiláceos ou fibras dietéticas, podendo ser celulose, hemicelulose, dextrina, quitinas, arabinoxilanos, lignina, entre outros carboidratos com ligações betaglicosídicas, que compreendem mais de 90% da parede celular das plantas (SAKOMURA et al., 2014). Esses componentes são resistentes à hidrólise no trato digestivo, devido ao tipo de ligações entre as unidades de açúcares, não sendo digeridos, ou sendo em pequena quantidade, devido à falta de atividade enzimática em não ruminantes (BRITO et al., 2008).

Os PNA's são divididos de acordo com a sua solubilidade em água, sendo solúvel ou insolúvel. A fração solúvel, composta na sua maioria de hemicelulose, tem a capacidade de se ligar à grande quantidade de água, o que aumenta a viscosidade da dieta (CARRÉ et al., 2004). Dessa forma, a digestão e absorção dos nutrientes fica comprometida, por reduzir a atividade das enzimas digestivas, além de prejudicar as funções fisiológicas intestinais (CHOCT et al., 2004). A fração insolúvel, devido à sua natureza indigestível, atua como uma barreira entre a enzima e o nutriente (WYATT et al., 2008). Em dietas à base de milho, o

efeito de barreira é certamente mais importante do que o aumento da viscosidade para a digestibilidade da dieta (KHADEM et al., 2016).

No Brasil, a maioria das rações formuladas para frangos de corte é baseada em milho e farelo de soja. Devido às diferenças de cultivares, fatores genéticos e ambientais (AFTAB, 2012), o teor de PNA's totais varia de 8,10 a 9,70% no milho e 10,3 a 30,3% no farelo de soja (TAVERNARI et al., 2008), sendo que, estima-se que cerca de 400 a 450 kcal/kg⁻¹ de energia pode não ser utilizado pelas aves (COWIESON et al., 2010). Neste contexto, segundo Selle et al. (2010) o milho e o farelo de soja apesar de apresentarem alta porcentagem de metabolizabilidade, podem ter seus efeitos antinutricionais reduzidos com o uso de enzimas exógenas, como as carboidrases, melhorando o desempenho produtivo dos animais.

Nos últimos anos, a suplementação de carboidrases nas dietas para não ruminantes vem sendo muito utilizada nas fábricas de rações. As carboidrases (xilanase, β -glucanase, β -mananase, pectinase e α -galactosidase) visam neutralizar os efeitos antinutricionais dos polissacarídeos não-amiláceos contidos nos alimentos de origem vegetal, promovendo sua hidrólise e tornando os nutrientes disponíveis para absorção (BROCH et al., 2018).

As carboidrases são capazes de melhorar o aproveitamento de alimentos com grande quantidade de PNA's solúveis, reduzindo a viscosidade das dietas (OLUKOSI et al., 2007), pela transformação desses PNA's em unidades menores, fazendo com que percam sua capacidade de retenção de água. Essas enzimas exógenas têm sido utilizadas como uma estratégia de redução de energia e aminoácidos das rações, com o intuito de reduzir o custo com as formulações para frangos de corte.

Com a viscosidade reduzida, o efeito enzimático sobre os conteúdos intestinais torna-se mais eficaz, resultando em uma melhora na capacidade digestiva do nutriente, aumentando a taxa de trânsito intestinal e reduzindo a quantidade de água nas excretas, o que melhora a qualidade da cama (OPALINSKI et al., 2010).

Em rações a base de milho e farelo de soja, a eficiência da inclusão de enzimas específicas para PNA's é dependente de diversos fatores, como a forma de processamento da ração, a qualidade dos ingredientes, o nível de energia e de nutrientes da ração basal, a idade das aves, uso de associações enzimáticas, a dosagem utilizada, dentre outros fatores (AFTAB et al., 2006).

A falta de enzimas pode comprometer o conteúdo de energia dos alimentos, pois mantêm os nutrientes geradores de energia, como carboidratos, lipídeos e proteínas, no interior de suas estruturas (CHOCT et al., 2010). A ação das carboidrases se dá pela hidrólise dos PNA's, minimizando o efeito de encapsulamento causado pelas paredes celulares dos

grãos, permitindo maior acesso das enzimas ao substrato, reduzindo a viscosidade da digesta e melhorando a utilização dos nutrientes (SLOMINSKI, 2011). Cowieson et al. (2010) demonstraram melhoras na digestibilidade do amido, da proteína e da gordura com o uso de enzimas carboidrases através da liberação dos nutrientes encapsulados na parede celular dos vegetais.

Da mesma forma que a fitase, as carboidrases são adicionadas às rações com o intuito de melhorar o desempenho das aves e reduzir custos de produção das dietas, atuando cada qual em seus respectivos substratos. As carboidrases melhoram a qualidade dos ingredientes adicionados, principalmente o milho e o farelo de soja, aumentando sua digestibilidade e proporcionando melhor aproveitamento de energia e outros nutrientes, por sua capacidade de desencapsulamento.

2.3 Associações enzimáticas em dietas para frangos de corte

Na alimentação animal, a adição dietética de enzimas exógenas tem o objetivo de melhorar o valor nutricional das matérias-primas, qualidade do produto final, além de atender às demandas dos consumidores por um produto mais barato, seguro, saudável e não prejudicial ao ambiente (ASPEVIK et al., 2017). O uso dessas enzimas aumenta a liberação de energia, diminuindo a viscosidade da digesta, melhorando o desempenho e reduzindo os custos na produção das rações (STEFANELLO et al., 2016), auxiliando a ação enzimática endógena do animal (BARBOSA et al., 2014).

A suplementação enzimática com carboidrase e fitase vem sendo estudada em dietas com níveis nutricionais reduzidos para frangos de corte. A associação dessas enzimas atua sobre os fatores antinutricionais dos ingredientes, que não são aproveitados pelas aves, devido à sua baixa produção enzimática, que é ineficiente em degradar esses fatores (GERALDO et al., 2014).

A inclusão de enzimas carboidrases pode aumentar a eficiência da fitase, devido à eliminação dos efeitos quelantes do ácido fítico aos PNA's (WOYENGO et al., 2010). De acordo com estudos, a associação entre fitase e carboidrase pode ser considerada como efeito aditivo (SCHRAMM et al., 2017), pois a presença de PNA's na dieta pode reduzir a eficácia da fitase, reduzindo a quantidade de substrato ao qual a fitase teria acesso. Do mesmo modo,

se a fitase for insuficiente, pode restringir a ação das carboidrases sobre os nutrientes aos quais o fitato está complexado (OLUKOSI et al., 2007).

A fitase libera efetivamente uma porção do fósforo ligado ao fitato (OLUKOSI et al., 2008), porém, mesmo fornecendo altas doses de fitase, uma parcela considerável de ácido fítico não é digerida. Esta incompleta disponibilidade pode estar correlacionada ao fato de que algumas moléculas de fitato permanecem no interior das células que estão protegidas pela parede celular, impedindo que a fitase tenha acesso ao substrato. Com isso, associações enzimáticas se apresentam como uma alternativa, ao combinar enzimas que degradam a parede celular das moléculas, como as carboidrases (KARIMI et al., 2013a; ZELLER et al., 2015). Olukosi et al. (2008) afirmam que mesmo em dietas à base de milho e farelo de soja, as carboidrases potencializam o efeito da fitase, pelo aumento da disponibilidade de substrato.

No entanto, os resultados encontrados na literatura são conflitantes com relação ao efeito aditivo das enzimas fitase e carboidrases. De acordo com Lee et al. (2018), a combinação de fitase e xilanase não apresentou benefício adicional no ganho de peso de frangos de corte. Da mesma forma, Karimi et al. (2013b) não encontraram efeitos aditivos da associação de fitase e xilanase em dietas à base de milho e sorgo sobre os parâmetros de desempenho. Contudo, Selle et al. (2009) observaram uma maior resposta de crescimento em frangos de corte alimentados com dietas contendo a combinação de fitase e xilanase em comparação com a fitase individualmente em dietas à base de trigo.

Barbosa et al. (2012) ao avaliarem a eficiência de enzimas (fitase, amilase, xilanase e protease) em dietas com redução de energia metabolizável, cálcio e fósforo para frangos de corte, verificaram que o desempenho dos animais foi similar àqueles que receberam dietas com níveis nutricionais adequados. Dessa forma, a adição de misturas enzimáticas em dietas com níveis nutricionais reduzidos é capaz de manter o desempenho dos animais. Segundo Cowieson e Bedford (2009) o resultado da combinação nutricional das enzimas dependerá de diversos fatores, dentre eles as características das dietas, que podem levar a uma subatividade, aditividade ou sinergia entre as enzimas. Além disso, a atividade das enzimas também é influenciada pelo pH e comprimento do trato gastrointestinal, temperatura corporal do animal, resistência a enzimas endógenas, concentração de substrato e tipo de ingrediente utilizado na dieta (ACAMOVIC; MC CLEARY, 1996).

Dessa forma, a associação de diferentes enzimas vem se mostrando uma opção para melhorar a disponibilidade de nutrientes das rações, ao atuarem em sinergismo. Uma enzima degrada um nutriente gerando um produto, facilitando para que outra enzima possa agir sobre

este produto, levando a benefícios que vão além de nutricionais, pela melhora da absorção de nutrientes, mas também pela redução de custos de produção e problemas ambientais.

2.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACAMOVIC, T.; MC CLEARY, B.V. Optimising the response. **Feed Mix**, v.4, n.4, 14-19, 1996.
- AFTAB, U. Exogenous carbohydrases in corn-soy diets for broilers. **World's Poultry Science Journal**, v.68, 447- 464, 2012.
- AFTAB, U.; ASHRAF, M.; JIANG, Z. Low protein diets for broilers. **World's Poultry Science Journal**, v.62, 688-701, 2006.
- AKTER M.; IJI, P.A.; GRAHAM, H. Increasing zinc levels in phytase-supplemented diets improves the performance and nutrient utilization of broiler chickens. **South African Journal of Animal Science**, v.47, 648–660, 2017.
- ALVARENGA, R.R.; NAGATA, A.K.; RODRIGUES, P.B. et al. Adição de fitase em rações com diferentes níveis de energia metabolizável, proteína bruta e fósforo disponível para frangos de corte de 1 a 21 dias. **Ciência Animal Brasileira**. v.12, n.4, 602-609, 2011.
- ASPEVIK, T.; OTERHALS, A.; RONNING, S.B. et al. Valorização de Proteínas de Co-e Subprodutos da Indústria de Peixe e Carne. **Tópicos em Química Atual**, v.375, n.3, 53, 2017.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY – AOAC. Method 2000.12: Phytase activity in feed: colorimetric enzymatic method. In: **Official methods of analysis of AOAC international**. 17.ed. Arlington: AOAC International, 2000.
- AUGSPURGER, N.R.; WEBEL, D.M.; LEI, X.G. et al. Efficacy of an E. coli phytase expressed in yeast for releasing phytate-bound phosphorus in young chicks and pigs. **Journal Animal Science**, v.81, 474-483, 2003.
- BARBOSA, N.A.A.; BONATO, M.A.; SAKOMURA, N.K. et al. Digestibilidade ileal de frangos de corte alimentados com dietas suplementadas com enzimas exógenas. **Comunicata Scientiae**, v.5, n.4, 361, 2014.
- BARBOSA, N.A.A.; SAKOMURA, N.K.; BONATO, M.A. et al. Enzimas exógenas em dietas de frangos de corte: desempenho. **Ciência Rural**, v.42, n.8, 1497-1502, 2012.
- BEDFORD, M.R. Alternate uses of phytase – Superdosing. **Asian Poultry Magazine**, p.8-11, 2012.
- BEDFORD, M.R.; PARTRIDGE, G.G. **Enzymes in farm animal nutrition**. 2.ed. Massachusetts: Cabi, 2010. 330p.
- BEESON, L.A.; WALK, C.L.; BEDFORD, M.R. et al. Hydrolysis of phytate to its lower esters can influence the growth performance and nutrient utilization of broilers with regular or super doses of phytase. **Poultry Science**, v.96, 2243-2253, 2017.
- BRITO, M.S.; OLIVEIRA, C.F.S.; SILVA, T.R.G. et al. Polissacarídeos não amiláceos na nutrição de monogástricos – Revisão. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.2, n.4, 111-117, 2008.
- BROCH, J.; NUNES, R.V.; SILVA, I.M. et al. Carbohidrases e coproduto da mandioca na alimentação de frangos de corte: revisão. **Agropecuária Catarinense**, v.31, n.2, 82-86, 2018.
- CARRÉ, B. Causes for variation in digestibility of starch among feedstuffs. **Poultry Science**, v.60, 76-89, 2004.
- CHOCT, M. Enzymes for the feed industry: past, present and future. **World's Poultry Science Journal**, v. 62, n.2, 5-15, 2006.

- CHOCT, M.; DERSJANT-LI, Y.; MCLEISH, J. et al. Soy oligosaccharides and soluble non-starch polysaccharides: a review of digestion, nutritive and anti-nutritive effects in pigs and poultry. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v.23, 1386-1398, 2010.
- CHOCT, M.; KOCHER A.; WATERS D.L.E. et al. A comparison of three xylanases on the nutritive value of two wheats for broiler chickens. **British Journal of Nutrition**, v.92, 53–61, 2004.
- COWIESON, A.J. Factors that affect the nutritional value of maize for broilers. **Animal Feed Science and Technology**, v.119, 293–305, 2005.
- COWIESON, A.J.; AURELI, R.; GUGGENBUHL, P. et al. Possible involvement of myo-inositol in the physiological response of broilers to high doses of microbial phytase. **Animal Production Science**, v.55, 710–719, 2015.
- COWIESON, A.J.; ACAMOVIC, T.; BEDFORD, M.R. Using the precision-feeding bioassay to determine the efficacy of exogenous enzymes – A new perspective. **Animal Feed Science and Technology**, v.129, 149-158, 2006.
- 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**, v.65, n.4, 609, 2009.
- COWIESON, A.J.; BEDFORD, M.R.; RAVINDRAN, V. Interactions between xylanase and glucanase in maize-soy-based diets for broilers. **British Poultry Science**, v.51, 246-257, 2010.
- COWIESON, A.J.; PTAK, A.; MACKOWIAK, P. et al. The effect of microbial phytase and myo-inositol on performance and blood biochemistry of broiler chickens fed wheat/corn-based diets. **Poultry Science**, v.92, n.8, 2124–2134, 2013.
- COWIESON, A.J.; WILCOCK, P.; BEDFORD, M.R. Super-dosing effects of phytase in poultry and other monogastrics. **World's Poultry Science Journal**, v.67, 225-35, 2011.
- DERSJANT-LI, Y.; AWATI, A.; SCHULZE, H. et al. 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**, v.95, 878-896, 2015.
- DONATO, D.C.Z.; ALBUQUERQUE, R.; GARCIAL, P.D.S.R. et al. Desempenho de frangos de corte alimentados com rações contendo diferentes níveis de cálcio suplementadas com fitase. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, 2161-2166, 2011.
- DOSKOVIC, V.; BOGOSAVLJEVIĆ-BOSKOVIĆ, S.; PAVLOVSKI, Z. et al. Enzymes in broiler diets with special reference to protease. **Journal World's Poultry Science**, v.69, n.2, 343-359, 2013.
- FARHADI, D.; KARIMI, A.; SADEGHI, G. et al. Effects of a high dose of microbial phytase and myo-inositol supplementation on growth performance, tibia mineralization, nutrient digestibility, litter moisture content, and foot problems in broiler chickens fed phosphorus-deficient diets. **Poultry Science**, v.96, 3664–3675, 2017.
- GERALDO, A.; GOMES, K.R.A.; FASSANI, E.J. et al. Carbohydrase and phytase supplementation in diets for semi-heavy laying hens. **Acta Scientiarum- Animal Sciences**. v.36, n.3, 285-290, 2014.
- GHAYOUR-NAJAFABADI, P.; KHOSRAVINIA, H.; GHEISARI, A. Productive performance, nutrient digestibility and intestinal morphometry in broiler chickens fed corn or wheat-based diets supplemented with bacterial- or fungal-originated xylanase. **Italian Journal Animal Science**, v.17, 165-174, 2018.
- GUGGENBUHL, P.; WACHÉ, Y.; SIMOES NUNES, C. et al. Effects of a 6-phytase on the apparent ileal digestibility of minerals and amino acids in ileorectal anastomosed pigs fed on a corn–soybean meal–barley diet. **American Society of Animal Science**, v.90, 182-184, 2012.

- IGBASAN, F.A.; MANNER, K.; MIKSCH, G. et al. Comparative studies on the in vitro properties of phytases from various microbial origins. **Archiv Für Tierernährung**, v.53, n.4, 353-373, 2000.
- KARIMI, A.; COTO, C.; MUSSINI, F. et al. Interactions between phytase and xylanase enzymes in male broiler chicks fed phosphorus-deficient diets from 1 to 18 days of age. **Poultry Science**, v.92, 1818-1823, 2013b.
- KARIMI, A.; MIN, Y.; LU, C. et al. Assessment of potential enhancing effects of a carbohydrase mixture on phytase efficacy in male broiler chicks fed phosphorus-deficient diets from 1 to 18 days of age. **Poultry Science**, v.92, 192-198, 2013a.
- KHADEM, A.; LOURENCO, M.; DELEZIE, E. et al. Does release of encapsulated nutrients have an important role in the efficacy of xylanase in broilers? **Poultry Science**, v.95, n.5, 1066-1076, 2016.
- KIES, A.K.; DE JONGE, L.H.; KEMME, P.A. et al. Interaction between protein, phytate, and microbial phytase: in vitro studies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, n.5, 1753-1758, 2006.
- KUMAR, V.; YADAV, A.N.; VERMA, P. et al. β -propeller phytases: diversity, catalytic attributes, current developments and potential biotechnological applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.98, 595-609, 2017.
- LATHAM, R.E.; WILLIAMS, M.P.; FLORES, C. et al. Impact of variable corn nutrient content, AME prediction, and xylanase inclusion on growth performance. **Journal of Applied Poultry Research**, v.25, 338-351, 2016.
- LEE, S.A.; BEDFORD, M.R. Inositol - an effective growth promotor? **World's Poultry Science Journal**, v.72, n.4, 743-760, 2016.
- LEE, S.A.; DUNNE, J.; FEBERY, E. et al. Exogenous phytase and xylanase exhibit opposing effects on real-time gizzard pH in broiler chickens. **British Poultry Science**, v.59, n.5, 568-578, 2018.
- LELIS, G.R.; ALBINO, L.F.T.; SILVA, C.R. et al. Suplementação dietética de fitase sobre o metabolismo de nutrientes de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.8, 1768-1773, 2010.
- LI, W.; ANGEL, R.; KIM, S.W. et al. Impacts of dietary calcium, phytate, and phytase on inositol hexakisphosphate degradation and inositol phosphate release in different segments of digestive tract of broilers. **Poultry Science**, v.96, 3626-3637, 2017.
- MANOBHAVAN, M.; ELANGO VAN, AV.; SRIDHAR, M. et al. Effect of super dosing of phytase on growth performance, ileal digestibility and bone characteristics in broilers fed corn-soya-based diets. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v.100, n.1, 93-100, 2016.
- MORGAN, N.K.; WALK, C.L.; BEDFORD, M.R. et al. Contribution of intestinal- and cereal-derived phytase activity on phytate degradation in young broilers. **Poultry Science**, v.94, 1577-1583, 2015.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of poultry**. 9.ed. Washington, D.C.: National Academy of Sciences, 1994. 155p.
- MUNIR, K.; MAQSOOD, S.A. Review on role of exogenous enzyme supplementation in poultry production. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v.25, 66-80, 2013.
- OLUKOSI, O.A.; COWIESON, A.J.; ADEOLA, O. Age-related influence of a cocktail of xylanase, amylase, and protease or phytase individually or in combination in broilers. **Poultry Science**, v.86, n.1, 77-86, 2007.
- 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. **British Journal of Nutrition**, v.99, 682-690, 2008.

- ONYANGO, E.M.; BEDFORD, M.R.; ADEOLA, O. Phytase activity along the digestive tract of the broiler chick: A comparative study of an *Escherichia coli*-derived and *Peniophora lycii* phytase. **Canadian Journal of Animal Science**, v.85, n.1, 61-68, 2005.
- OPALINSKI, M.; MAIORKA, A.; CUNHA, F. et al. Adição de complexo enzimático e da granulometria da soja integral desativada melhora desempenho de frangos de corte. **Ciência Rural**, v.40, n.3, 628-632, 2010.
- PARRA-MARTÍN, J.A.; ALBINO, L.F.T.; ROSTAGNO, H.S. et al. Redução da exigência de fósforo disponível em dietas com adição de fitase para frangos de corte machos de oito aos 21 dias de idade. **Spei Domus**, v.11, n.22, 9-16, 2015.
- RAVINDRAN, V.; CABAHUG, S.; RAVINDRAN, G. et al. Influence of microbial phytase on apparent ileal amino acid digestibility of feedstuffs for broiler. **Poultry Science**, v.78, 699-706, 1999.
- SAKOMURA, V.K.; SILVA, J.H.V.; COSTA, F.G.P. et al. **Nutrição de não ruminantes**. 1.ed. Jaboticabal: Funep, 2014. 678p.
- SANANGELANTONI, A.M.; MALATRASI, M.; TRIVELLONI, E. et al. A novel β -propeller phytase from the dioxin-degrading bacterium *Sphingomonas wittichii* RW-1. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.102, n.19, 8351-8358, 2018.
- SCHOLEY, D.V.; MORGAN, N.K.; RIEMENSPERGER, A. et al. Effect of supplementation of phytase to diets low in inorganic phosphorus on growth performance and mineralization of broilers. **Poultry Science**, v.97, n.7, 2435–2440, 2018.
- SCHRAMM, V.G.; DURAU, J.F.; BARRILLI, L.N.E. et al. Interaction between xylanase and phytase on the digestibility of corn and a corn/soy diet for broiler chickens. **Poultry Science**, v.96, 1204-1211, 2017.
- SELLE, P. New insights into phytase inclusion in broiler diets: phytase added to the feed increases digestibility of amino acids, protein and energy. **Poultry International**, 16-19, 2008.
- SELLE, P.H.; CADOGAN, D.J.; RU, Y.J. et al. Impact of exogenous enzymes in sorghum – or wheat – based broiler diets on nutrient utilization and growth performance. **Journal of Poultry Science**, v.1, n.9, 53-58, 2010.
- SELLE, P.H.; COWIESON, A.J.; RAVINDRAN, V. Consequences of calcium interactions with phytate and phytase for poultry and pigs. **Livestock Science**, v.124, 126–141, 2009.
- SELLE, P.H.; RAVINDRAN, V. Microbial phytase in poultry nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, v.135, 1-41, 2007.
- SHIRLEY, R.B.; EDWARDS, H.M., JR. Graded levels of phytase past industry standards improves broiler performance. **Poultry Science**, v.82, 671-680, 2003.
- SLOMINSKI, B.A. Recent advances in research on enzymes for poultry diets. **Poultry Science**, v.90, 2013-2023, 2011.
- SOMMERFELD, V.; SCHOLLENBERGER, M.; KÜHN, I. et al. Interactive effects of phosphorus, calcium, and phytase supplements on products of phytate degradation in the digestive tract of broiler chickens. **Poultry Science**, v.97, n.4, 1177-1188, 2018.
- STEFANELLO, C.; VIEIRA, S.L.; RIOS, H.V. et al. Energy and nutrient utilisation of broilers fed soybean meal from two different Brazilian production areas with an exogenous protease. **Animal Feed Science and Technology**, v.221, 267-273, 2016.
- STRADA, E.S.O.; ABREU, R.D.; OLIVEIRA, G.J.C. et al. Uso de enzimas na alimentação de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.6, 2369-2375, 2005.
- TAVERNARI, F.C.; CARVALHO, T.A.; ASSIS, A.P. et al. Polissacarídeos não-amiláceo solúvel na dieta de suínos e aves. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.5, n.5, 673-689, 2008.

- TRUONG, H.H.; MOSS, A.F.; LIU, S.Y. et al. Pre- and post-pellet whole grain inclusions enhance feed conversion efficiency, energy utilisation and gut integrity in broiler chickens offered wheat-based diets. **Animal Feed Science and Technology**, v.224, 115–123, 2017.
- VATS, P.; BANERJEE, U.C. Production studies and catalytic properties of phytases (*myoinositolhexakisphosphate phosphohydrolases*): An overview. **Enzyme and Microbial Technology**, v.35, n.1, 3-14, 2004.
- 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**, v.91, n.6, 1371-1378, 2012.
- WALK, C.L.; BEDFORD, M.R.; SANTOS, T.T. et al. Extra-phosphoric effects of superdoses of a novel microbial phytase. **Poultry Science**, v.92, n.3, 719-25, 2013.
- WALK, C.L.; SANTOS, T.T.; BEDFORD, M.R. Influence of superdoses of a novel microbial phytase on growth performance, tibia ash, and gizzard phytate and inositol in young broilers. **Poultry Science**, v.93, n.5, 1172-1177, 2014.
- 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**, v.93, n.1, 9-21, 2013.
- WOYENGO, T.A.; SLOMINSKI, B.A.; JONES, R.O. Growth performance and nutrient utilization of broiler chickens fed diets supplemented with phytase alone or in combination with citric acid and multicarbohydrase. **Poultry Science**, v.89, n.10, 2221-2229, 2010.
- WYATT, C.L.; PARR, T.; BEDFORD, M. [2008]. Mechanisms of action for supplemental NSP and phytase enzymes in poultry diets. In: **CAROLINA POULTRY NUTRITION CONFERENCE**, 35., 2008, Carolina do Norte. Disponível em: <<http://www.thepoultrysite.com/articles/1387/mechanisms-of-action-for-supplemental-nsp-and-phytase-enzymes-in-poultry-diets/>> Acesso em: 18/12/2018.
- ZELLER, E.; SCHOLLENBERGER, M.; KÜHN, I. et al. Effect of diets containing enzyme supplements and microwave-treated or untreated wheat on inositol phosphates in the small intestine of broilers. **Animal Feed Science and Technology**, v.204, 42-51, 2015.

3. CARBOIDRASES ASSOCIADAS ÀS ALTAS DOSES DE FITASE EM DIETAS PARA FRANGOS DE CORTE

Resumo – Este trabalho objetivou avaliar a superdose de fitase associada à carboidrase em dietas com redução nutricional sobre o desempenho, peso relativo dos órgãos do trato gastrointestinal, morfometria intestinal, viscosidade da digesta, pH do conteúdo intestinal e cecal, rendimento de carcaça e cortes e qualidade de cama de frangos de corte. Para tanto, foram utilizados 1.540 pintos de corte, machos, de um dia de idade, distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos, 14 repetições com 22 aves por unidade experimental. Os tratamentos consistiram em: controle positivo (CP): ração a base de milho e farelo de soja com inclusão de farinha de carne e farinha de vísceras, sem enzimas; controle negativo (CN): ração CP com redução de 100 kcal, 0,15% P, 0,12% Ca, 4% AA e 5% Na; ração CN + carboidrase + fitase (1000, 1500 e 2000 FTU kg⁻¹). A enzima carboidrase era composta por endo-1,4- β -xilanase (2600 DNS) e endo-1,3(4)- β -glucanase (1800 DNS). Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey (P<0,05). As aves que receberam inclusão dietética de enzimas apresentaram ganho de peso (GP) e conversão alimentar (CA) semelhante ao grupo CP no período inicial (1 a 7 dias). De 1 a 21 dias, as aves que receberam enzimas apresentaram maior GP e melhor CA quando comparadas ao grupo CN. Para o período total (1 a 42 dias) as aves que receberam ração com os diferentes níveis de enzima apresentaram CA semelhante às aves do CP e CN. Aos 21 dias, as aves do tratamento CN apresentaram maior peso relativo de pâncreas em relação aos demais tratamentos e maior peso relativo do intestino delgado em relação às aves que receberam suplementação enzimática. Para o pH cecal, aos 21 dias, as aves do CN apresentaram menor valor quando comparadas às aves dos tratamentos com 1500 e 2000 FTU. Aos 42 dias, as aves do CP apresentam menor pH cecal em relação às aves dos tratamentos com 1000 e 1500 FTU. Aves que receberam CN apresentaram menor teor de amônia na cama aos 42 dias em relação aos demais tratamentos. A inclusão de carboidrase associada a diferentes níveis de fitase não alterou os demais parâmetros avaliados. A utilização de fitase associada às carboidrases em dietas com redução nutricional manteve o desempenho das aves na fase pré-inicial. Na fase de crescimento o desempenho dessas aves foi superior ao tratamento CN, não se equiparando ao CP. A ação da enzima é substrato-dependente, o que pode ter limitado a ação enzimática, não demonstrando melhorias nos demais parâmetros de desempenho, intestinais, rendimento e de qualidade de cama.

Palavras-chave: fitato, polissacarídeos não amiláceos, xilanase, β -glucanase.

CARBOHYDRASES ASSOCIATED WITH HIGH DOSES OF PHYTASE IN DIETS FOR BROILER CHICKENS

Abstract – study aimed to evaluate overdose of phytase associated with carbohydrase in diets with nutritional reduction on performance, relative weight of the organs of the gastrointestinal tract, intestinal morphometry, digestion viscosity, pH of intestinal and cecal contents, carcass yield and cuts and quality broiler bedding. For this purpose, 1,540 male day-old broiler chicks were used, distributed in a completely randomized design with five treatments, 14 repetitions with 22 birds per experimental unit. The treatments consisted of: positive control (CP): ration based on corn and soy meal with the inclusion of meat meal and offal meal, without enzymes; negative control (CN): CP diet with a reduction of 100 kcal, 0.15% P, 0.12% Ca, 4% AA and 5% Na; CN feed + carbohydrase + phytase (1000, 1500 and 2000 FTU kg⁻¹). The carbohydrase enzyme was composed of endo-1,4- β -xylanase (2600 DNS) and endo-1,3 (4) - β -glucanase (1800 DNS). The data were submitted to analysis of variance and the means compared by the Tukey test ($P < 0.05$). The birds that received dietary inclusion of enzymes showed weight gain (GP) and feed conversion (CA) similar to the CP group in the initial period (1 to 7 days). From 1 to 21 days, the birds that received enzymes showed higher GP and better CA when compared to the CN group. For the total period (1 to 42 days) the birds that received feed with the different levels of enzyme showed similar CA to the birds of CP and CN. At 21 days, the birds in the CN treatment showed a higher relative weight of the pancreas in relation to the other treatments and a higher relative weight of the small intestine in relation to the birds that received enzymatic supplementation. For the cecal pH, at 21 days, the birds of the CN showed lower value when compared to the birds of the treatments with 1500 and 2000 FTU. At 42 days, the birds of the CP have lower pH cecal in relation to the birds of the treatments with 1000 and 1500 FTU. Birds that received CN had lower ammonia content in bed at 42 days compared to other treatments. The inclusion of carbohydrase associated with different levels of phytase did not change the other parameters evaluated. The use of phytase associated with carbohydrases in diets with nutritional reduction maintained the birds' performance in the pre-initial phase. In the growth phase, the performance of these birds was superior to the CN treatment, not equaling the CP. The action of the enzyme is substrate-dependent, which may have limited the enzymatic action, showing no improvement in the other parameters of performance, intestinal, yield and bed quality.

Keywords: phytate, non-starch polysaccharides, xylanase, β -glucanase.

3.1 Introdução

Os aditivos nas dietas avícolas compõem um dos avanços tecnológicos utilizados no âmbito da nutrição, buscando otimizar o desempenho dos animais (DALOLIO et al., 2016). Dentre os aditivos comercialmente disponíveis, a inclusão de enzimas exógenas nas rações tem sido realizada em larga escala, visto que promove maior aproveitamento dos nutrientes, possibilita a utilização de matérias primas variadas, além de diminuir o custo de produção (VARGAS et al., 2017).

Nas rações a base de milho e farelo de soja, os principais substratos para atuação das enzimas são os considerados fatores antinutricionais, como o ácido fítico e os polissacarídeos não amiláceos (PNA's). Neste contexto, grande parte do fósforo contido nos alimentos de origem vegetal é indisponível para os não-ruminantes, pois se encontra combinado com o mio-inositol formando moléculas de ácido fítico, que apresentam alto potencial de quelação, formando complexos chamados de fitato, impedindo a ação de enzimas endógenas e diminuindo a biodisponibilidade de minerais e aminoácidos (SNOW et al., 2002).

Em adição, a presença dos PNA's, principalmente os solúveis em água, aumentam a viscosidade do alimento dificultando a atuação das enzimas endógenas, reduzindo a digestão e absorção de aminoácidos, carboidratos, minerais e outros nutrientes (SMITH e ANNISON, 1996).

Com o intuito de melhorar a disponibilidade de nutrientes e reduzir os fatores antinutricionais dos ingredientes, a adição de fitase e carboidrases vem sendo utilizada nas dietas a nível comercial de frangos de corte (AVILA et al., 2012). A fitase atua na hidrólise dos complexos de fitato, liberando fósforo, minerais, proteína, aminoácidos e amido, tornando-os disponíveis para absorção (RAVINDRAN et al., 1999). Já as carboidrases quebram os carboidratos da parede celular vegetal, desencapsulando amido e lipídeos (COWIEESON, 2005) ou outros nutrientes englobados pela viscosidade dos PNA's durante a passagem no intestino, permitindo uma atuação mais eficiente das enzimas endógenas sobre os nutrientes que se tornaram disponíveis através da ação das enzimas exógenas (FRANCESCH; GERAERT, 2009).

Devido aos efeitos positivos das enzimas exógenas nas dietas das aves, tem se pesquisado sua inclusão na forma isolada ou em associações. Schramm et al. (2017) relataram que a associação de fitase e carboidrases possuem ação aditiva potencializando seus efeitos, de forma que a eficiência da fitase pode ser melhorada pelo acesso ao substrato liberado pela

quebra dos PNA's (PIRGOZLIEV et al., 2008). Do mesmo modo, a falta de fitase pode reduzir a ação das carboidrases, em razão dos nutrientes que podem ficar complexados à molécula de fitato (OLUKOSI et al., 2007).

Além do interesse sobre os complexos multienzimáticos, a adição de altas doses de fitase vem sendo pesquisada. O aumento da dose justifica-se não apenas pela capacidade da enzima em reduzir os efeitos antinutricionais contidos nos ingredientes, mas também pelos efeitos extra fosfóricos, como aumento no ganho de peso, consumo de ração, retenção de fósforo, eficiência alimentar (SELLE; RAVINDRAN, 2007), além de melhorar o desempenho através do uso do mio-inositol em funções biológicas (LEE; BEDFORD, 2016).

O uso da associação de diferentes enzimas pode reduzir os custos de produção das rações e minimizar a excreção de compostos prejudiciais ao ambiente, mas principalmente deve-se atentar às respostas da utilização de altas doses de fitase e a relação com a carboidrase sobre os índices zootécnicos dessas aves. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar altas doses de fitase associadas à carboidrase sobre o desempenho, peso relativo dos órgãos do trato gastrointestinal, morfometria intestinal, viscosidade da digesta e pH do conteúdo intestinal e cecal, rendimento de carcaça e cortes e qualidade de cama de frangos de corte.

3.2 Material e métodos

Esse trabalho foi conduzido no Centro de Pesquisa em Avicultura da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Unioeste, *Campus* de Marechal Cândido Rondon/PR. Os procedimentos adotados durante a realização do experimento foram realizados em conformidade com a Resolução Normativa nº 37 de 15 de fevereiro de 2018 do CONCEA, que estabelece as Diretrizes da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Os procedimentos adotados foram previamente aprovados pelo comitê de ética e biossegurança da Universidade.

O aviário experimental utilizado foi construído em alvenaria com 35 metros de comprimento e 13 metros de largura, dividido em boxes de 1,95m². Cada box (unidade experimental – UE) dispunha de um comedouro tubular, bebedouro tipo nipple, fonte para aquecimento (resistência 250 watts) e piso de concreto, o qual foi recoberto com maravalha de pinus de primeiro lote.

Ao todo foram utilizados 1.540 pintos de corte, machos, de um dia de idade, da linhagem Cobb 500, provenientes de matrizes entre 40 a 50 semanas de idade. As aves foram

distribuídas em um delineamento inteiramente casualizado, constituído por cinco tratamentos e 14 repetições com 22 aves por UE.

As dietas experimentais foram formuladas de acordo com a composição dos alimentos e exigências nutricionais recomendadas por Rostagno et al. (2017), para as fases de 1 a 7, 8 a 21 e 22 a 42 dias de idade para frangos de corte de desempenho médio-regular (Tabela 1). Os tratamentos consistiram em: controle positivo (CP), ração a base de milho e farelo de soja com inclusão de farinha de carne, farinha de vísceras e farinha de penas, sem enzimas e atendendo as exigências nutricionais para cada fase; controle negativo (CN) - ração CP com redução de 100 kcal, 0,15% P, 0,12% Ca, 4% AA e 5% Na; ração CN + carboidrase + fitase (1000 FTU kg⁻¹); ração CN + carboidrase + fitase (1500 FTU kg⁻¹); e ração CN + carboidrase + fitase (2000 FTU kg⁻¹). A fitase utilizada foi a Aextra® PHY, Danisco Animal Nutrition, uma 6-fitase (fitase, EC 3.1.3.26) bacteriana proveniente da espécie *Buttiauxella* e expressa em um fungo (*Trichoderma reesei*), com atividade de fitase de 10.000 unidades de fitase (FTU kg⁻¹) por grama. A enzima carboidrase era composta por endo-1,4-β-xilanase (2600 DNS) e endo-1,3(4)-β-glucanase (1800 DNS).

Os animais receberam ração e água *ad libitum* e o programa de luz utilizado foi o recomendado pelo manual da linhagem. O peso e o consumo de ração foram registrados aos sete, 21 e 42 dias de idade, para avaliação do desempenho das aves (ganho de peso, consumo médio de ração e conversão alimentar). A mortalidade foi observada diariamente para a realização das correções no consumo de ração e conversão alimentar, segundo Sakomura e Rostagno (2016).

Aos 21 e 42 dias de idade, uma ave por UE (n=70), com peso representativo (média ±5%), foi pesada individualmente e abatida por eletronarcose, para determinação do peso relativo (% do peso vivo) dos órgãos do trato gastrointestinal, colheita de fragmentos do jejuno para análise da morfometria intestinal por microscopia de luz, determinação do pH do conteúdo intestinal e cecal e viscosidade da digesta.

Para a determinação do peso relativo dos órgãos, o proventrículo, moela, fígado, pâncreas, intestino delgado e intestino grosso foram pesados e posteriormente foi determinado o peso relativo dos mesmos em função do peso da ave viva.

Tabela 1. Composição percentual e calculada das rações experimentais

Ingredientes (%)	1 a 7 dias		8 a 21 dias		22 a 42 dias	
	CP	CN	CP	CN	CP	CN
Milho	50,546	58,403	53,677	62,578	65,661	70,687
Soja farelo (46%)	35,428	31,350	30,700	26,500	18,860	16,769
Farinha de vísceras	3,000	3,000	3,000	3,000	4,516	5,000
Farinha carne e ossos (45%)	3,000	2,700	5,000	2,500	3,600	2,600
Farinha pena					1,500	1,500
Óleo de soja	5,157	2,122	6,100	3,100	4,391	1,928
Calcário	0,595	0,700	0,141	0,708	0,206	0,278
Fosfato monocálcico	0,600					
Sal comum	0,393	0,365	0,288	0,299	0,288	0,273
L-Lisina sulfato (50,7%)	0,384	0,467	0,290	0,461	0,380	0,398
DL-Metionina (99%)	0,390	0,337	0,331	0,298	0,232	0,180
L-Treonina (98%)	0,099	0,079	0,076	0,085	0,062	0,033
Cloreto de colina (75%)	0,058	0,069	0,047	0,063	0,054	0,046
Suplemento mineral e vitamínico ¹	0,250	0,250	0,250	0,250	0,250	0,250
Adsorvente de Micotoxinas ²	0,100	0,100	0,100	0,100		
Inerte ³		0,058		0,058		0,058
Total	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000
Composição calculada						
EM (MJ kg ⁻¹)	13,05	12,63	13,52	13,10	13,79	13,37
Proteína Bruta (g/kg)	239,8	225,9	228,0	205,3	197,7	189,9
Cálcio (g/kg)	9,56	8,36	9,23	8,03	8,03	7,14
Fósforo disponível (g/kg)	4,75	3,25	4,61	3,11	4,02	3,52
Lisina digestível (g/kg)	13,30	12,77	12,00	11,52	10,17	9,77
Metionina + cistina (g/kg)	7,06	6,40	6,34	5,79	4,99	4,43
Treonina digestível (g/kg)	8,61	7,93	7,92	7,29	6,75	6,24
Triptofano digestível (g/kg)	2,39	2,21	2,18	1,96	1,70	1,61
Sódio (g/kg)	2,30	2,18	2,00	1,90	2,00	1,90

¹Premix mineral e vitamínico (1 – 21 dias), níveis/kg ração: Ácido Fólico (min) 400 mg; Ácido Pantotênico (min) 500 mg; BHT (min) 60 g; Biotina (min) 32 mg; Cobre (min) 3200 mg; Enramicina 4000 mg; Ferro (min) 18 g; Iodo (min) 480 mg; Manganês (min) 32 g; Narazina 20 g; Niacina (min) 16,80 g; Nicarbazina 20 g; Selênio (min) 120 mg; Vitamina A (min) 4000000 UI; Vitamina B1 (min) 800 mg; Vitamina B12 (min) 7200 Mcg; Vitamina B2 (min) 2600 mg; Vitamina B6 (min) 1120 mg; Vitamina D3 (min) 1600000 UI; Vitamina E (min) 10000 UI; Vitamina K3 (min) 960 mg; Zinco (min) 44 g. Premix mineral e vitamínico (22 – 42 dias), níveis por kg de produto: Ácido Fólico (min) 360 mg; Ácido Pantotênico (min) 4280 mg; BHT (min) 60 g; Biotina (min) 26 mg; Cobre (min) 3200 mg; Enramicina 4000 mg; Ferro (min) 18 g; Iodo (min) 480 mg; Manganês (min) 32 g; Niacina (min) 14 g; Salinomicina 24 g; Selênio (min) 120 mg; Vitamina A (min) 3200000 UI; Vitamina B1 (min) 720 mg; Vitamina B12 (min) 6000 Mcg; Vitamina B2 (min) 2200 mg; Vitamina B6 (min) 1000 mg; Vitamina D3 (min) 1200000 UI; Vitamina E (min) 8000 UI; Vitamina K3 (min) 840 mg; Zinco (min) 44 g; ²Alumínio silicato; ³A inclusão da enzima fitase (1000; 1500 e 2000 FTU kg⁻¹) e da enzima carboidrase (endo-1,4- β -xilanase (2600 DNS) e endo-1,3(4)- β -glucanase (1800 DNS)) foi realizada em substituição ao inerte (caulim).

A morfometria do jejuno (altura de vilo, profundidade de cripta, relação vilo:cripta e área de absorção) foi avaliada aos 21 dias de idade das aves. Para amostragem, considerou-se o jejuno, desde a porção distal da alça duodenal até o divertículo de Meckel. Fragmentos de dois cm do segmento foram abertos longitudinalmente, lavados com solução salina, fixados em solução de formalina tamponada (10%) e em seguida desidratados em uma série de concentrações crescentes de alcoóis, diafanizados em xilol e incluídos em parafina (LUNA, 1968). Após a microtomia semisseriada (cortes de sete μm), os cortes foram corados pela técnica de hematoxilina e eosina.

As análises morfométricas foram realizadas utilizando o sistema de imagens PROPLUS IMAGE 4.1. Para cada lâmina, foram mensurados o comprimento e a largura de 30 vilos e profundidade e largura de 30 criptas. Estas medidas morfométricas foram utilizadas para o cálculo da área da superfície de absorção da mucosa intestinal, através da fórmula proposta por Kisielinski et al. (2002). Em adição, foi calculado a relação altura de vilo:profundidade de cripta, dividindo-se o valor da altura do vilo pelo valor de profundidade de cripta.

Para determinação do pH, o intestino delgado e os cecos coletados foram seccionados e o conteúdo colhido homogeneizado. Dois gramas de material foram diluídos em 20 mL de água destilada, agitados por um minuto e determinado o pH, com o auxílio do peagâmetro digital (NISBET et al., 1993). Para mensuração da viscosidade, o conteúdo retirado do intestino delgado foi homogeneizado, centrifugado a 4.000 g durante 10 min e o sobrenadante foi transferido para tubos e armazenados em freezer (-18°C) até o momento da análise. As amostras foram analisadas em triplicata utilizando-se um viscosímetro Brookfield DV-III, com adaptador de baixa viscosidade (SC418) (Brookfield Engineering Laboratories, Inc, Stoughton, MA, EUA), mantendo a amostra a uma temperatura de 40°C a uma taxa de cisalhamento de 79/1/sec.

Aos 21 e aos 42 dias, foram coletadas amostras de cama em três pontos diferentes de cada UE, evitando áreas próximas e embaixo dos comedouros e bebedouros. Após a coleta, as amostras foram homogeneizadas e acondicionadas em recipientes individuais para determinação da matéria seca, pH e amônia volatilizada. A matéria seca foi determinada pelo método 967.03 proposto pela AOAC (1990). Para a determinação do pH da cama, utilizou-se 10 gramas da amostra *in natura* diluída em 100 mL de água deionizada, homogeneizada em agitador por cinco minutos e após 30 minutos em repouso o pH foi mensurado através de peagâmetro digital (FREITAS et al., 2011). Para a determinação da amônia volatilizada foram acondicionadas 100 gramas da amostra em recipientes plásticos com tampa, onde foi colocado um coletor universal (50 mL) contendo 10 mL de ácido bórico 2%, cuja função foi captar a

amônia volatilizada dentro do recipiente. As amostras da cama foram mantidas dentro do recipiente por 24 horas em temperatura ambiente. Posteriormente, o ácido bórico foi titulado com ácido sulfúrico 0,05N e a quantidade de amônia volatilizada foi determinada pela equação $A = V \times 0,05 \times 17$, sendo A= amônia volatilizada (mg 100g⁻¹ de amostra); V= volume de ácido sulfúrico utilizado na titulação (mL); 0,05= normalidade do ácido sulfúrico e 17= peso molecular da amônia (SAMPAIO et al., 1999; FREITAS et al., 2011).

Ao final do período experimental (42 dias de idade), foram abatidas 28 aves representando a média de peso do tratamento (média $\pm 5\%$), sangradas, depenadas e evisceradas. Para o rendimento de carcaça utilizou-se o peso da carcaça eviscerada sem cabeça, pescoço, pés e gordura abdominal, em relação ao peso da ave viva e para o rendimento dos cortes de peito, pernas e asas, foi considerado o peso da carcaça eviscerada. Para a determinação da porcentagem de gordura abdominal, foi pesado o tecido adiposo presente ao redor da cloaca, moela, proventrículo e dos músculos abdominais adjacentes e foi determinada a porcentagem em relação ao peso da ave viva.

Como procedimento estatístico, os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância por intermédio do software estatístico SAS® University Edition (2017) (SAS Inst. Inc., Cary, NC, EUA). Os dados foram verificados quanto à presença de valores discrepantes/outliers (teste de Kruskal Wallis), sendo realizado a ANOVA e para comparação de resultados entre os tratamentos foi utilizado o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.3. Resultados e discussão

Para o período de 1 a 7 dias de idade, as aves alimentadas com ração com restrição de nutrientes contendo carbohidrase e 2000 FTU kg⁻¹ de fitase apresentaram maior ($P < 0,05$) consumo médio de ração (CMR) quando comparadas às aves que receberam ração controle positivo (CP), proporcionando ganho de peso (GP) e conversão alimentar (CA) semelhante entre estes grupos. Em adição, as aves que receberam ração controle negativo (CN) apresentaram a maior ($P < 0,05$) CA para este período, em relação às aves do CP e as que receberam a dieta com 2000 FTU kg⁻¹. De 1 a 21 dias, as aves que receberam ração contendo as enzimas, independentemente do nível de inclusão de fitase, apresentaram maior ($P < 0,05$) GP e melhor CA quando comparadas à ração CN sem a adição de enzimas. No entanto, não conseguiram equiparar ($P > 0,05$) ao desempenho das aves que receberam a ração CP. Considerando o período total (1 a 42 dias), as dietas não alteraram o GP e CMR. No entanto,

as aves que receberam a dieta CP apresentaram a melhor CA em relação ao CN, já as aves que não receberam suplementação enzimática não diferiram do CP e CN (Tabela 2).

A eficiência da associação entre fitase e carboidrases depende de diversos fatores, tais como o tipo de carboidrase utilizada, nível de PNA's, concentração de cátions que afetam a solubilidade do ácido fítico, nível dietético de fósforo disponível e atividade de fitase endógena na dieta basal (WOYENGO; NYACHOTI, 2011). De fato, ainda é bastante contraditória a existência de ações conjuntas de associações enzimáticas (WU et al., 2004; MENEGHETTI et al., 2011; LEE et al., 2018) podendo indicar modos de ação das enzimas independentes entre si (KARIMI et al., 2013).

O ácido fítico, substrato da enzima fitase, forma complexos com minerais, secreções endógenas, proteína dietética, dentre outros, formando o fitato, que é resistente a hidrólise, acarretando em redução da digestibilidade dos nutrientes e disponibilidade de energia (WOYENGO; NYACHOTI, 2013). Desta forma, a fitase atua na quebra desses complexos, disponibilizando minerais como fósforo, cálcio, magnésio, além de aminoácidos e energia (RAVINDRAN et al., 1999; DERSJANT-LI et al., 2014). Segundo Barbosa et al. (2012), a inclusão de enzimas na dieta não melhora somente a absorção de nutrientes, mas também a qualidade da microbiota intestinal, devido à redução de resíduos que não são digeridos no intestino delgado e podem sofrer fermentação no intestino grosso, inibindo o desenvolvimento de bactérias patogênicas.

Tabela 2. Desempenho de frangos de corte alimentados com dietas contendo carboidrases e diferentes níveis de fitase.

Tratamento	GP1-7	CMR1-7	CA1-7	GP1-21	CMR1-21	CA1-21	GP1-42	CMR 1-42	CA-1-42
CP	142,45abc	159,11b	1,117b	958,20a	1193,34ab	1,245c	2999,11	4570,18	1,524b
CN	138,22c	165,99ab	1,202 ^a	862,14c	1175,01b	1,363a	2874,70	4505,90	1,568a
CN+CHO+1000FTU	141,82bc	163,73ab	1,155ab	903,25b	1193,54ab	1,322b	2918,15	4513,24	1,547ab
CN+CHO+1500FTU	144,79ab	166,71ab	1,148ab	918,38b	1222,02a	1,331b	2957,46	4584,76	1,550ab
CN+CHO+2000FTU	148,18a	168,71a	1,137b	918,07b	1218,20a	1,327b	2970,22	4597,39	1.548ab
EPM	5,396	6,609	0,047	20,653	29,217	0,019	131,173	174,053	0,022
CV (%)	3,76	4,00	4,12	2,26	2,43	1,45	4,45	3,82	1,48
p ANOVA	0,0005	0,0096	0,0018	<0,0001	0,0008	<0,0001	0,1964	0,5643	0,0017

Ganho de peso (GP), consumo médio de ração (CMR), conversão alimentar (CA). Médias com letras distintas na mesma coluna indicam diferenças ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey. CP – Controle Positivo - Ração basal (níveis normais) sem enzimas; CN – Controle Negativo - Ração basal menos 100 kcal, 0,15% P, 0,12% Ca, - 4% AA, 5% Na; Carboidrases - endo-1,4- β -xilanase (2600 DNS) e endo-1,3(4)- β -glucanase (1800 DNS).

A diferença observada nas variáveis de desempenho quanto à eficiência da enzima fitase nas fases analisadas pode estar correlacionada ao nível de substrato presente nas dietas para atuação da enzima. Neste contexto, de acordo com os teores calculados de ácido fítico das dietas, observou-se uma redução na porcentagem de acordo com as fases pré-inicial (0,225%), inicial (0,212%) e crescimento (0,196%), demonstrando que a atuação da enzima fitase pode ter sido limitada devido à redução do substrato nas dietas.

Segundo Schramm et al. (2017) a atuação das enzimas pode ser influenciada pela concentração de substrato disponível. É importante considerar que o substrato presente nos ingredientes é muito variável e dependente da localização na matriz do ingrediente, além da presença de outros fatores antinutricionais e da solubilidade da enzima (OLUKOSI, 2013), fazendo com que a relação enzima:substrato atue diretamente na eficiência da enzima. Morgan et al. (2016) observaram desempenho superior de aves que receberam dietas contendo alta concentração de fitato com adição de fitase quando comparadas àquelas que receberam dietas com baixa concentração de fitato na dieta, demonstrando a importância do substrato para a boa eficiência da enzima. Neste contexto, a atuação das enzimas pode ter sido prejudicada nas fases posteriores pela redução na porcentagem de substrato disponível.

Outro fator que pode interferir na eficiência da enzima é a concentração de fósforo disponível na dieta. A atividade catalítica da fitase é inibida pelo fósforo inorgânico (GREINER et al., 1993), indicando que maiores concentrações de fósforo disponível na dieta podem reduzir a quebra do fitato pela fitase (WOYENGO; NYACHOTI, 2011). Segundo esses autores, a eficiência da fitase pode ser melhorada associando-a a carboidratos se o fósforo disponível for reduzido a um nível menor do que normalmente se utiliza quando a fitase é adicionada a dieta de forma isolada (0,23 a 0,30%), podendo ser reduzida a 0,14% sem prejudicar o desempenho e absorção de nutrientes. Yan e Waldroup (2006) concluíram que a resposta da fitase depende do nível de fósforo disponível na dieta, tendo maior efeito em dietas com baixo fósforo (menos de 0,25%) e irrelevante em dietas com maior porcentagem de fósforo (0,30% ou mais). Neste trabalho, a porcentagem de fósforo disponível foi superior a 0,30%, podendo ter sido um fator limitante à ação da enzima.

Além do nível de substrato presente nas dietas, o efeito benéfico das enzimas pode ser maior na fase inicial, devido ao fato das aves apresentarem trato digestório imaturo e baixa produção enzimática endógena (SAKOMURA et al., 2014; FERNANDES et al., 2015), proporcionando melhor desempenho dos animais. Costa et al. (2007) ao avaliarem o uso de fitase na fase pré-inicial, relataram que o aumento no ganho de peso pode ser devido à

diminuição da viscosidade intestinal das aves, ocasionando melhora na digestão e absorção de nutrientes.

Quanto ao peso relativo dos órgãos do trato gastrointestinal, aos 21 dias, observou-se interferência apenas para o pâncreas e intestino delgado. As aves que receberam a ração CN apresentaram maior ($P<0,005$) peso relativo de pâncreas quando comparado com as aves do CP e com as que receberam a ração com restrição nutricional com suplementação enzimática. Para o peso relativo de intestino delgado, houve um maior ($P<0,001$) peso para as aves que receberam ração CN quando comparado com aquelas que receberam ração contendo enzimas (Tabela 3).

Tabela 3. Peso relativo (% peso vivo) dos órgãos do trato gastrointestinal de frangos de corte, aos 21 dias de idade, alimentados com dietas contendo carboidrases e diferentes níveis de fitase.

Tratamento	Fígado	Moela	Proventrículo	Pâncreas	Int. Delgado	Int. Grosso
CP	2,72	1,77	0,47	0,32b	3,67ab	0,61
CN	2,85	1,88	0,49	0,37 ^a	3,72 ^a	0,64
CN+CHO+1000 FTU kg ⁻¹	2,86	1,82	0,45	0,31b	3,39bc	0,62
CN+CHO+1500 FTU kg ⁻¹	2,65	1,78	0,48	0,30b	3,35c	0,61
CN+CHO+2000 FTU kg ⁻¹	2,87	1,68	0,49	0,31b	3,21c	0,61
EPM	0,255	0,211	0,085	0,042	0,027	0,104
CV (%)	9,16	11,85	17,89	13,10	7,88	16,94
p ANOVA	0,110	0,221	0,610	0,002	<0,0001	0,914

Médias com letras distintas na mesma coluna indicam diferenças ($P<0,05$) pelo teste de Tukey. CP – Controle Positivo - Ração basal (níveis normais) sem enzimas; CN – Controle Negativo - Ração basal menos 100 kcal, 0,15% P, 0,12% Ca, - 4% AA, 5% Na; CHO - carboidrases - endo-1,4- β -xilanase (2600 DNS) e endo-1,3(4)- β -glucanase (1800 DNS).

Aos 42 dias, não foi observado influência ($P>0,05$) da inclusão de carboidrases associada à fitase nas dietas sobre o peso relativo dos órgãos do trato gastrointestinal (Tabela 4).

Tabela 4. Peso relativo (% peso vivo) dos órgãos do trato gastrointestinal de frangos de corte, aos 42 dias de idade, alimentados com dietas contendo carboidrases e diferentes níveis de fitase.

Tratamento	Fígado	Moela	Proventrículo	Pâncreas	Int. Delgado	Int. Grosso
CP	2,00	1,01	0,23	0,17	1,74	0,47
CN	2,03	1,03	0,25	0,16	1,82	0,44
CN+CHO+1000 FTU kg ⁻¹	2,07	1,01	0,24	0,16	1,65	0,47
CN+CHO+1500 FTU kg ⁻¹	2,04	1,08	0,25	0,16	1,72	0,43
CN+CHO+2000 FTU kg ⁻¹	2,04	1,04	0,27	0,15	1,69	0,44
EPM	0,248	0,136	0,042	0,022	0,031	0,003
CV (%)	12,20	13,17	16,84	13,93	14,67	15,86
p ANOVA	0,9648	0,6505	0,3508	0,3164	0,1444	0,6350

CP – Controle Positivo - Ração basal (níveis normais) sem enzimas; CN – Controle Negativo - Ração basal menos 100 kcal, 0,15% P, 0,12% Ca, - 4% AA, 5% Na; CHO - carboidrases - endo-1,4-β-xilanase (2600 DNS) e endo-1,3(4)-β-glucanase (1800 DNS).

O peso relativo dos órgãos do trato gastrointestinal é uma medida indireta para avaliar a influência de fatores nutricionais sobre seu desenvolvimento. Ainda são controversos os efeitos da inclusão dietética de enzimas sobre o peso relativo dos órgãos, sendo tanto atribuído um maior peso relativo de pâncreas em função de maior estímulo do órgão com maior degradação dos nutrientes e um menor peso resultado da atuação eficaz das enzimas sobre os fatores antinutricionais contidos nos ingredientes, reduzindo a função secretora do órgão (WANG et al., 2005; FERNANDES et al., 2017).

Além dos efeitos mencionados, visto que o peso relativo é uma medida indireta, alguns autores não constataram efeito da inclusão das enzimas exógenas sobre o peso relativo do proventrículo, moela, fígado e pâncreas (SANTOS et al., 2006; HAJATI; REZAEI, 2010; ANDRADE et al., 2017). O resultado de maior peso relativo de pâncreas e intestino delgado das aves que receberam o a dieta CN pode estar relacionado a uma tentativa do organismo em readequar os processos digestivos para maximizar o aproveitamento dos nutrientes.

A inclusão de carboidrases associada a diferentes níveis de fitase não alterou ($P>0,05$) os valores de altura de vilo, profundidade de cripta, relação altura de vilo:profundidade de cripta bem como a área de absorção do segmento jejuno dos animais aos 21 dias de idade (Tabela 5).

A presença de fatores antinutricionais contidos nos ingredientes pode influenciar na qualidade intestinal. Segundo Oliveira et al. (2008) uma maior proliferação bacteriana pode ocorrer no intestino devido à maior quantidade de substrato disponível, podendo causar danos à mucosa intestinal, prejudicando a capacidade absorptiva. De fato, a presença de

PNA's ou microrganismos patogênicos causa inflamações na parede intestinal, reduzindo a quantidade de enterócitos nos vilos e ocasionando hiperplasia da cripta, acarretando em uma menor relação vilo:cripta (LESER; MOLBAK, 2009), reduzindo a área de absorção. A utilização de enzimas nas dietas possibilita a hidrólise destes substratos permitindo um melhor desenvolvimento dos vilos e criptas, melhorando a saúde intestinal.

Tabela 5. Altura de vilo (μm), profundidade de cripta (μm), relação altura de vilo:profundidade de cripta e área de absorção (μm^2) do segmento jejuno de frangos de corte aos 21 dias de idade, alimentados com dietas contendo carboidrases e diferentes níveis de fitase.

Tratamento	Alt. Vilo	Prof. Cripta	Vilo:Cripta	Área absorção
CP	761,822	84,741	9,116	12,179
CN	657,046	74,156	9,082	10,602
CN+CHO+1000 FTU kg^{-1}	747,407	86,227	8,080	11,571
CN+CHO+1500 FTU kg^{-1}	716,213	90,066	7,940	11,197
CN+CHO+2000 FTU kg^{-1}	657,614	70,433	8,829	10,783
EPM	21,251	3,136	0,245	0,435
CV (%)	15,65	19,92	1,448	20,15
p ANOVA	0,360	0,243	0,409	0,808

CP – Controle Positivo - Ração basal (níveis normais) sem enzimas; CN – Controle Negativo - Ração basal menos 100 kcal, 0,15% P, 0,12% Ca, - 4% AA, 5% Na; CHO - carboidrases - endo-1,4- β -xilanase (2600 DNS) e endo-1,3(4)- β -glucanase (1800 DNS).

Os resultados encontrados neste trabalho podem estar relacionados ao tipo de ingrediente utilizado nas rações. O milho e o farelo de soja apresentam alta metabolizabilidade e uma quantidade reduzida de fatores antinutricionais, tornando as dietas pouco agressivas a mucosa intestinal, não sendo observado efeito das enzimas. Da mesma forma, Fernandes et al. (2017) não encontraram alterações na morfometria intestinal utilizando um complexo enzimático contendo xilanase, amilase e protease em dietas a base de milho e farelo de soja. Roofchaei et al. (2017) observaram aumento da altura dos vilos em dietas a base de trigo contendo carboidrases associadas à fitase, demonstrando ação enzimática diferencial em dietas contendo ingredientes com maior porcentagem de fatores antinutricionais.

Aos 21 dias, as aves do tratamento CN apresentaram menor valor ($P < 0,05$) de pH do conteúdo cecal quando comparadas às aves que receberam os maiores níveis de fitase na dieta (1500 e 2000 FTU kg^{-1}). Aos 42 dias, as aves que receberam ração CP apresentaram um pH mais ácido do conteúdo cecal ($P < 0,05$) que as aves que receberam rações com 1000 e 1500 FTU kg^{-1} . Não foi observado diferença ($P > 0,05$) para o pH do conteúdo do intestino delgado

para ambas as idades. A viscosidade do conteúdo do intestino delgado não foi influenciada pela inclusão da associação de carboidrase com os diferentes níveis de fitase aos 21 e 42 dias (Tabela 6).

Tabela 6. pH do conteúdo da digesta do intestino delgado e conteúdo cecal e viscosidade da digesta de frangos de corte alimentados com dietas contendo carboidrases e diferentes níveis de fitase.

Tratamento	21 dias			42 dias		
	pH intestino delgado	pH cecal	Viscosidade (cPs)	pH intestino delgado	pH cecal	Viscosidade (cPs)
CP	6,57	6,99ab	1,425	6,41	7,06b	1,685
CN	6,57	6,84b	1,436	6,09	7,19ab	1,636
CN+CHO+1000 FTU kg ⁻¹	6,56	7,27ab	1,443	6,14	7,36a	1,562
CN+CHO+1500 FTU kg ⁻¹	6,91	7,44a	1,518	6,31	7,41a	1,668
CN+CHO+2000 FTU kg ⁻¹	6,69	7,38a	1,439	6,06	7,26ab	1,604
EPM	0,391	0,445	0,019	0,459	0,257	0,022
CV (%)	5,87	6,20	10,82	7,39	3,54	11,28
p ANOVA	0,1067	0,0027	0,631	0,2294	0,0059	0,441

Médias com letras distintas na mesma coluna indicam diferenças ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey. CP – Controle Positivo - Ração basal (níveis normais) sem enzimas; CN – Controle Negativo - Ração basal menos 100 kcal, 0,15% P, 0,12% Ca, - 4% AA, 5% Na; CHO - carboidrases - endo-1,4- β -xilanase (2600 DNS) e endo-1,3(4)- β -glucanase (1800 DNS).

O pH da digesta é um dos principais fatores que influenciam na disponibilidade de nutrientes (PANG; APPLEGATE, 2007) e na microbiota intestinal (HAJATI; REZAEI, 2010). A inclusão de enzimas na dieta auxilia na modulação da microbiota, proporcionando melhora na saúde intestinal. De fato, xilanase e β -glucanase são enzimas que promovem o crescimento de bactérias ácido láticas, essas bactérias se aderem ao epitélio intestinal competindo com bactérias patogênicas, limitando sua atuação e reduzindo a viscosidade (RODRÍGUEZ et al., 2012; PAN; YU, 2014).

Além da influência das enzimas sobre a composição microbiana do trato gastrointestinal, o pH pode ser alterado pela concentração de Ca e P na dieta. Segundo Shafey et al. (1991) altos níveis de Ca afetam o pH ao longo do trato digestivo. Ao adicionar fitase às dietas, espera-se que esta facilite as limitações da digestão gástrica, reduzindo a produção de HCl e pepsina sem comprometer a digestão, aumentando desta forma o pH (WALK et al., 2016), isso reduziria os íons de H da digesta provenientes da moela, permitindo uma digestão

mais completa. Smulikowska et al. (2010) fornecendo 1000 FTU kg⁻¹ em dietas com níveis de fósforo disponível abaixo do recomendado, observaram aumento no pH da digesta do jejuno, já o pH dos cecos não foram afetados pela inclusão da enzima.

Apesar das enzimas carboidrases atuarem na degradação dos componentes da parede celular, liberando nutrientes encapsulados e reduzindo a viscosidade da digesta (CHOCT, 2006) não foi observado diferença quanto a este parâmetro. A falta de resposta da suplementação enzimática pode ser explicada devido ao fato de dietas a base de milho apresentarem baixa viscosidade (AMERAH et al., 2013). Neste sentido, Moftakharzadeh et al. (2017) não observaram interferência da adição de carboidrases sobre a viscosidade da digesta de frangos alimentados com dietas a base de milho. No entanto, ao utilizarem dietas a base de cevada com inclusão de carboidrases, observaram redução da viscosidade da digesta, demonstrando a ação diferenciada da enzima em função do substrato disponível.

De acordo com os dados obtidos para rendimento de carcaça e cortes e porcentagem de gordura abdominal, não foi observado diferença ($P>0,05$) quando da inclusão dietética de carboidrases associadas a níveis de fitase (Tabela 7).

Tabela 7. Rendimento de carcaça (%), rendimento de cortes (%) e porcentagem de gordura abdominal de frangos de corte, aos 42 dias de idade, alimentados com dietas contendo carboidrases e diferentes níveis de fitase.

Tratamento	Carcaça	Pernas	Asas	Peito	Gordura abdominal
CP	70,14	32,62	10,14	41,51	1,68
CN	69,07	33,34	10,34	40,48	1,56
CN+CHO+1000 FTU kg ⁻¹	69,65	33,01	10,30	40,85	1,91
CN+CHO+1500 FTU kg ⁻¹	69,66	33,03	10,29	40,99	1,88
CN+CHO+2000 FTU kg ⁻¹	69,46	33,08	10,44	40,54	1,87
EPM	1,529	1,174	0,364	1,650	0,481
CV (%)	2,20	3,55	3,54	4,04	27,01
p ANOVA	0,4917	0,6342	0,3321	0,4983	0,2604

CP – Controle Positivo - Ração basal (níveis normais) sem enzimas; CN – Controle Negativo - Ração basal menos 100 kcal, 0,15% P, 0,12% Ca, - 4% AA, 5% Na; CHO - carboidrases - endo-1,4- β -xilanase (2600 DNS) e endo-1,3(4)- β -glucanase (1800 DNS).

A adição de enzimas exógenas nas dietas pode promover melhor aproveitamento dos nutrientes, sendo revertido em maior rendimento de carcaça (ALLOUCHE et al., 2015). No entanto, considerando os resultados de desempenho observados, o efeito das enzimas pode ter sido reduzido em função da menor disponibilidade de substrato, refletindo em características de carcaça semelhantes entre os tratamentos. Da mesma forma, trabalhos encontrados na

literatura não observaram interferência da utilização de enzimas sobre o rendimento de carcaça e cortes (CARDOSO et al., 2011; NETO et al., 2012; ANDRADE et al., 2018).

Para as variáveis relacionadas à qualidade de cama, somente o teor de amônia aos 42 dias apresentou variação ($P < 0,05$) entre os tratamentos, no qual as aves que receberam a ração CN apresentaram menor teor equiparando-se ao teor apresentado pela cama proveniente de aves que receberam o menor nível de inclusão de fitase (Tabela 8).

Tabela 8. Teor de matéria seca (MS), pH e amônia volatilizada da cama de frangos de corte alimentados com dietas contendo carboidrases e diferentes níveis de fitase.

Tratamento	MS 21dias	MS 42 dias	Amônia 42 dias	pH 42 dias
CP	62,79	63,30	7,66b	8,18
CN	63,87	58,27	5,25a	8,16
CN+CHO+1000 FTU kg ⁻¹	65,41	55,60	6,35ab	8,17
CN+CHO+1500 FTU kg ⁻¹	66,92	61,39	7,11b	8,10
CN+CHO+2000 FTU kg ⁻¹	66,63	57,48	7,49b	8,07
EPM	0,702	1,371	0,228	0,032
p ANOVA	0,278	0,402	0,003	0,778
CV	9,02	19,37	27,20	3,30

Médias com letras distintas na mesma coluna indicam diferenças ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey. CP – Controle Positivo - Ração basal (níveis normais) sem enzimas; CN – Controle Negativo - Ração basal menos 100 kcal, 0,15% P, 0,12% Ca, - 4% AA, 5% Na; CHO - carboidrases - endo-1,4- β -xilanase (2600 DNS) e endo-1,3(4)- β -glucanase (1800 DNS).

O teor de umidade das excretas está relacionado à eficiência digestiva, dessa forma, a capacidade do fitato em diminuir a digestibilidade dos nutrientes pode interferir diretamente na qualidade da cama (FARHADI et al., 2017). Os tratamentos não influenciaram a viscosidade da digesta e de forma relacionada não houve diferença sobre a umidade da cama. A amônia volatilizada é proveniente da decomposição do ácido úrico presente nas excretas das aves (WEAVER; MEIJERHOF, 1991). A menor concentração de amônia volatilizada encontrada para as aves que receberam dietas controle negativo pode estar correlacionada ao fato destes animais terem excretado menor quantidade de substrato passível de fermentação, visto que o nitrogênio contido na excreta é o precursor primário da amônia volatilizada.

3.4. Conclusão

A utilização de altas doses de fitase associadas às carboidrases em dietas com redução nutricional manteve o desempenho das aves na fase pré-inicial. Na fase de crescimento, as aves que receberam as enzimas apresentaram desempenho superior às que receberam dietas com redução nutricional e isentas de aditivos, não se equiparando às que receberam as dietas atendendo as exigências nutricionais. A ação da enzima é substrato-dependente, o que pode ter limitado a ação enzimática, não demonstrando melhorias nos demais parâmetros de desempenho, rendimento, intestinais e de qualidade de cama.

3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLOUCHE, L.; MADANI, T.; HAMOUDA, A. et al. Effect of addition of exogenous enzymes in hypocaloric diet in broiler chicken on performance, biochemical parameters and meat characteristics. **Biotechnology in Animal Husbandry**, v.31, n.4, p.551-565, 2015.
- AMERAH, A.M.; QUILS, A.; MEDEL, P. et al. Effect of pelleting temperature and probiotic supplementation on growth performance and immune function of broilers fed maize/soy-based diets. **Animal Feed Science and Technology**, v.180, n.1, p.55–63, 2013.
- ANDRADE, T.S.; NUNES, R.V.; SILVA, I.M. et al. Desempenho e parâmetros fisiológicos de frangos de corte alimentados com diferentes programas de enzimas. **Semina**, v.38, n.4, p.2765-2774, 2017.
- ANDRADE, T.S.; NUNES, R.V.; WACHHOLZ, L. et al. The effect of exogenous enzymes on the performance and digestibility of nutrients in broiler. **Semina: Ciencias Agrárias**, v.39, n.2, p.711-718, 2018.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 15 ed., Arlington: Virginia, 1990.
- AVILA, E.; ARCE, J.; SOTO, C. et al. Evaluation of an enzyme complex containing nonstarch polysaccharide enzymes and phytase on the performance of broilers fed a sorghum and soybean meal diet. **Journal of Applied Poultry Research**, v.21, n.2, p.279-286, 2012.
- BARBOSA, N.A.A.; SAKOMURA, N.K.; BONATO, M.A. et al. Enzimas exógenas em dietas de frangos de corte: desempenho. **Ciência Rural**, v.42, n.8, p.1497-1502, 2012.
- CARDOSO, D. M.; MACIEL, M. P.; PASSOS, D. P.; SILVA, F. V.; REIS, S. T.; AIURA, F. S. Efeito do uso de complexo enzimático em rações para frangos de corte. **Archivos de Zootecnia**, v.60, n.232, p.1053-1064, 2011.
- CHOCT, M. Enzymes for the feed industry: past, present and future. **World's Poultry Science Journal**, v.62, n.1, p.5–15, 2006.
- COSTA, F.G.P.; BRANDÃO, P.A.; BRANDÃO, J.S. et al. Efeito da enzima fitase nas rações de frangos de corte, durante as fases pré-inicial e inicial. **Ciência e Agrotecnologia**, v.31, n.3, p.865-870, 2007.
- COWIESON, A.J.; ADEOLA, O. Carbohydrases, protease and phytase have an additive beneficial effect in nutritionally marginal diets for broiler chicks. **Poultry Science**, v.84, n.12, p.1860-1867, 2005.
- DALÓLIO, F.S.; MOREIRA, J.; VALADARES, L.R. et al. Aditivos alternativos ao uso de antimicrobianos na alimentação de frangos de corte. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v.5, n.1, p.86-94, 2015.
- DERSJANT-LI, Y.; AWATI, A.; SCHULZE, H. et al. 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**, v.95, n.5, p.878-896, 2015.
- FARHADI, D.; KARIMI, A.; SADEGHI, G. et al. Effects of a high dose of microbial phytase and myo-inositol supplementation on growth performance, tibia mineralization, nutrient digestibility, litter moisture content, and foot problems in broiler chickens fed phosphorus-deficient diets. **Poultry Science**, v.96, n.10, p.3664–3675, 2017.
- FERNANDES, J.I.M.; CONTINI, J.P.; PROKOSKI, K. et al. Desempenho produtivo de frangos de corte e utilização de energia e nutrientes de dietas iniciais com milho

- classificado ou não e suplementadas com complexo enzimático. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.69, n.1, p.181-190, 2017.
- FERNANDES, J.I.M.; KOSMANN, R.C.; GAZOLA, A. et al. Effect of Dietary Arginine Supplementation after Hatching on the Intestinal Morphometry and Integrity of Chicks Housed under Health Challenge Conditions. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 43, p. 1281, 2015.
- FRANCESCH, M.; GERAERT, P.A. Enzyme complex containing carbohydrases and phytase improves growth performance and bone mineralization of broilers fed reduced nutrient corn-soybeanbased diets. **Poultry Science**, v.88, n.9, p.1915–1924, 2009.
- FREITAS, L.W.; GARCIA, R.G.; NAAS, I.A. et al. Volatilização de amônia em diferentes tipos de cama para frangos de corte. **Revista Brasileira de Engenharia de Biosistemas**, v.5, n.3, p.142-151, 2011.
- GREINER, R.; KONIETZNY, U.; JANY, K.D. Purification and characterization of two phytases from *Escherichia coli*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.303, n.1, p.107-113, 1993.
- HAJATI, H.; REZAEI, M. The application of prebiotics in poultry production. **International Journal of Poultry Science**, v.9, n.3, p.298-304, 2010.
- KARIMI, A.; COTO, C.; MUSSINI, F. et al. Interactions between phytase and xylanase enzymes in male broiler chicks fed phosphorus-deficient diets from 1 to 18 days of age. **Poultry Science**, v.92, n.7, p.1818-1823, 2013.
- KISIELINSKI, K.; WILLIS, S.; PRESCHER, A. et al. A simple new method to calculate small intestine absorptive surface in the rat. **Clinical and Experimental Medicine**, v.2, n.3, p.131-135, 2002.
- LEE, S.A.; BEDFORD, M.R. Inositol - an effective growth promotor? **World's Poultry Science Journal**, v.72, n.4, p.743–760, 2016.
- LEE, S.A.; DUNNE, J.; FEBERY, E. et al. Exogenous phytase and xylanase exhibit opposing effects on real-time gizzard pH in broiler chickens. **British Poultry Science**, v.59, n.5, p.568-578, 2018.
- LESER TD and MOLBAK L. Better living through microbial action: the benefits of the mammalian gastrointestinal microbiota on the host. **Environmental Microbiology**, v.11, n.9, p.2194-2206, 2009.
- LUNA, G.C. **Manual of histologic staining methods of the armed forces**. Institute of pathology. 3.ed. New York: Mc Graw-Hill, 1968, 285p.
- MENEGHETTI, C.; BERTECHINI, A.G.; RODRIGUES, P.B. et al. Altos níveis de fitase em rações para frangos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.3, p.624-632, 2011.
- MOFTAKHARZADEH, S.A.; MORAVEJ, H.; SHIVAZAD, M. Effect of using the Matrix Values for NSP-degrading enzymes on performance, water intake, litter moisture and jejunal digesta viscosity of broilers fed barley-based diet. **Acta Scientiarum**. v.39, n.1, p.65-72, 2017.
- MORGAN, N.K.; WALK, A.L.; BEDFORD, M.R. et al. Effect of feeding broilers diets differing in susceptible phytate content. **Animal Nutrition**, v.2, n.1, p.33-39, 2016.
- NETO, R.M.; CECCANTINI, M.L.; FERNANDES, J.I. Productive performance, intestinal morphology and carcass yield of broilers fed conventional and alternative diets containing commercial enzymatic complex. **Poultry Science**. v.11, n.8, p.505-516, 2012.
- NISBET, D.J.; CORRIER, D.E.; DELOACH, J.R. Effect of mixed cecal microflora maintained in continuous culture and of dietary lactose on *Salmonella typhimurium* colonization in broiler chicks. **Avian Disease**, v.37, n.2, o.528-535, 1993.

- OLIVEIRA, M.C.; RODRIGUES, E.A.; MARQUES, R.H. et al. Performance and morphology of intestinal mucosa of broilers fed mannan-oligosaccharides and enzymes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.2, p.442-448, 2008.
- OLUKOSI, O.A. Biochemistry of phytate and phytases: Applications in monogastric nutrition. **Journal of the Nigerian Society for Experimental Biology**, v.24, n.2, p.58-63, 2013.
- OLUKOSI, O.A., COWIESON, A.J. AND ADEOLA, O. Age-related influence of a cocktail of xylanase, amylase, and protease or phytase individually or in combination in broilers. **Poultry Science**, v.86, n.1, p.77-86, 2007.
- PAN, D.; YU, Z. Intestinal microbiome of poultry and its interaction with host and diet. **Gut Microbes**, v.5, n.1, p.108-119, 2014.
- PANG, Y.; APPLGATE, T.J. Effects of dietary copper supplementation and copper source on digesta pH, calcium, zinc, and copper complex size in the gastrointestinal tract of the broiler chicken. **Poultry Science**, v.86, n.3, p.531-537, 2007.
- PIRGOZLIEV, V.; ODUGUWA, O.; ACAMOVIC, T. et al. Effects of dietary phytase on performance and nutrient metabolism in chickens. **British Poultry Science**, v.49, n.2, p.144-154, 2008.
- RAVINDRAN, V.; CABAUGH, S.; RAVINDRAN, G. et al. Influence of microbial phytase on apparent ileal amino acid digestibility of feedstuffs for broiler. **Poultry Science**, v.78, n.5, p.699- 706, 1999.
- RODRIGUEZ, M.L.; REBOLÉ, A.; VELASCO, S. et al. Wheat- and barley-based diets with or without additives influence broiler chicken performance, nutrient digestibility and intestinal microflora **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.92, n.1, p. 184-190, 2012.
- ROOFCHAEI A.; REZAEIPOURA, V.; VATANDOURA, S. et al. Influence of dietary carbohydrases, individually or in combination with phytase or anacidifier, on performance, gut morphology and microbial population in broiler chickens fed a wheat-based diet, **Animal Nutrition**, v.5, n.1, p.63-67, 2017.
- ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; HANNAS, M.I. et al. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. 4a edição. Viçosa, MG: Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, 2017. 488p.
- SAKOMURA, N.K.; ROSTAGNO, H.S. **Métodos de pesquisa em nutrição de monogástricos**. 2.ed. Jaboticabal: Funep, 2016, 262p.
- SAKOMURA, N.K.; SILVA, J.H.V.; COSTA, F.G.P. et al. **Nutrição de não ruminantes**. 1.ed. Jaboticabal: Funep, 2014. 678p.
- SAMPAIO, M.A.P.M.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; SAMPAIO, A.A.M. et al. Estudo da população microbiana e da liberação de amônia da cama de frangos tratada com gesso agrícola. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.51, n.6, p.559-564, 1999.
- SANTOS, M. S. V. ESPÍNDOLA, G.B.; FUENTES, M.F.F. et al. Utilização de complexo enzimático em dietas à base de sorgo-soja para frangos de corte, **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.3, p.811-817, 2006.
- SAS Institute., 2017. **SAS User's Guide: Statistics. Version 9.3 Edition** (Cary, NC, SAS Inst.Inc.).
- SCHRAMM, V.G.; DURAU, J.F.; BARRILLI, L.N.E. et al. Interaction between xylanase and phytase on the digestibility of corn and a corn/soy diet for broiler chickens. **Poultry Science**, v.96, n.5, p.1204-1211, 2017.
- SELLE, P.H.; RAVINDRAN, V. Microbial phytase in poultry nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, v.135, n.1-2, p.1-41, 2007.

- SHAFEY, T.M.; MCDONALD, M.W.; DINGLE, J.G. Effects of dietary Ca and available phosphorus on digesta pH and on the availability of Ca, iron, magnesium and zinc from the intestinal contents of meat chicken. **British Poultry Science**, v.32, n.1, p. 185-194, 1991.
- SMITH, C.H.M.; ANNISON, G. Non-starch plant polysaccharides in broiler nutrition towards a physiologically valid approach to their determination. **World Poultry Science Journal**. v.52, n.2, p.203–221, 1996.
- SMULIKOWSKA, S.; CZERWIŃSKI, J.; MIECZKOWSKA, A. Effect of an organic acid blend and phytase added to a rapeseed cake-containing diet on performance, intestinal morphology, caecal microflora activity and thyroid status of broiler chickens. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v.94, n.1, p.15–23, 2010.
- SNOW, J.L.; DOUGLAS, J.L.S.M.W.; PARSONS, C.M. Phytase Effects on Amino Acid Digestibility in Molted Laying Hens. **Poultry Science**, Champaign, v.82, n.3, p.474-477, 2003.
- VARGAS, R.C.; GERALDO, A.; ROCHA, T.C. et al. Complexo multienzimático em dietas de poedeiras comerciais. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v.16, n.1, p.61-69, 2017.
- WALK, C.L.; KÜHN, I.; STEIN, H-H. et al. Phytate destruction - Consequences for precision animal nutrition. **Wageningen Academic Publishers**, 2016. 266 p.
- WANG, Z.R.; QIAO, S.Y.; LU, W.Q. et al. Effects of enzyme supplementation on performance, nutrient digestibility, gastrointestinal morphology, and volatile fatty acid profiles in the hindgut of broilers fed wheat-based diets. **Poultry Science**, v.84, n.6, p.875–881, 2005.
- WEAVER, W.D.; MEIJERHOF, R. The effect of different levels of relative humidity and air movement on litter conditions, ammonia levels, growth and carcass quality for broiler chickens. **Poultry Science**, v.70, n.4, p.746-755, 1991.
- 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**, v.93, n.1, p.9-21, 2013.
- WOYENGO, T.A.; NYACHOTI, C.M. Review: Supplementation of phytase and carbohydrases to diets for poultry. **Canadian Journal of Animal Science**, v.91, n.1, p.177-192, 2011.
- WU, Y.B.; RAVINDRAN, V.; THOMAS, D.G. et al. Influence of phytase and xylanase, individually or in combination, on performance, apparent metabolisable energy, digestive tract measurements and gut morphology in broilers fed wheat-based diets containing adequate level of phosphorus. **British Poultry Science**, v.45, n.1, p.76–84, 2004.
- YAN, F; WALDROUP, P. Nonphytate phosphorus requirement and phosphorus excretion of broiler chicks fed diets composed of normal or high available phosphate corn as influenced by phytase supplementation and vitamin D source. **International Journal of Poultry Science**, v.5, n.3, p.219–228, 2006.

4. CARBOIDRASES E SUPERDOSE DE FITASE SOBRE OS PARÂMETROS ÓSSEOS E SANGUÍNEOS DE FRANGOS DE CORTE

Resumo – Este trabalho buscou avaliar a adição de superdose de fitase associada às carboidrases em dietas com redução nutricional sobre os parâmetros ósseos e sanguíneos de frangos de corte. Para tanto, foram utilizados 1.540 pintos de corte, machos, de um dia de idade, distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado, com cinco tratamentos, 14 repetições com 22 aves por unidade experimental. Os tratamentos consistiram em: controle positivo (CP): ração a base de milho e farelo de soja com inclusão de farinha de carne e farinha de vísceras sem enzimas; controle negativo (CN): ração CP com redução de 100 kcal, 0,15% P, 0,12% Ca, 4% AA e 5% Na; ração CN + carboidrase + fitase (1000, 1500 e 2000 FTU kg⁻¹). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey (P<0,05). Aos 21 e 42 dias de idade não houve diferença (P>0,05) entre os tratamentos quanto à resistência a ruptura, índice de Seedor, densidade óssea, placa de crescimento e para matéria mineral e teores de cálcio e fósforo dos ossos da tíbia. Sobre os parâmetros sanguíneos aos 21 dias, as concentrações de Ca e P no sangue foram maiores nas aves que receberam 1000 FTU kg⁻¹. Para triglicerídeos, as aves que receberam a dieta CN e 1000 FTU kg⁻¹ apresentaram maiores concentrações. Para fosfatase alcalina, as aves que receberam dieta com 1500 FTU kg⁻¹ apresentaram menor concentração ao comparar com o CP. Para glicose e proteína total, não foi observado diferença (P>0,05). Aos 42 dias, a concentração de cálcio, fósforo e proteína total foi maior nas aves que receberam a dieta CP. Para glicose, a maior concentração foi nas aves que receberam 2000 FTU kg⁻¹, em comparação às que receberam 1000 FTU kg⁻¹. Para triglicerídeos, a concentração foi menor nas aves que receberam 1000 e 1500 FTU kg⁻¹ de fitase. Para fosfatase alcalina, não houve diferença (P>0,05). A adição de carboidrases associadas a 1000 FTU kg⁻¹ de fitase proporcionou aumento sérico de cálcio, fósforo e proteína total das aves aos 21 dias. Aos 42 dias as aves da dieta CP apresentaram maiores níveis de cálcio e fósforo e a inclusão de enzimas reduziu estes teores, porém, os parâmetros ósseos não foram alterados.

Palavras-chave: resistência óssea, fitato, fósforo, mineralização óssea.

CARBOHYDRASES AND HIGH DOSES OF PHYTASE ON THE BONE AND BLOOD PARAMETERS OF BROILERS CHICKEN

Abstract – This work sought to evaluate the addition of phytase overdose associated with carbohydrates in diets with nutritional reduction on bone and blood parameters of broilers. For this purpose, 1,540 male day-old broiler chicks were used, distributed in a completely randomized design, with five treatments, 14 repetitions with 22 birds per experimental unit. The treatments consisted of: positive control (CP): ration based on corn and soybean meal with the inclusion of meat meal and offal meal without enzymes; negative control (CN): CP diet with a reduction of 100 kcal, 0.15% P, 0.12% Ca, 4% AA and 5% Na; CN feed + carbohydrase + phytase (1000, 1500 and 2000 FTU kg⁻¹). The data obtained were subjected to analysis of variance and the means compared by the Tukey test ($P < 0.05$). At 21 and 42 days of age, there was no difference ($P > 0.05$) between treatments for resistance to rupture, Seedor index, bone density, growth plate and for mineral matter and calcium and phosphorus contents of tibial bones. Regarding blood parameters at 21 days, the concentrations of Ca and P in the blood were higher in birds that received 1000 FTU kg⁻¹. For triglycerides, the birds that received the CN diet and 1000 FTU kg⁻¹ showed higher concentrations. For alkaline phosphatase, birds that received a diet with 1500 FTU kg⁻¹ showed lower concentration when compared to CP. For glucose and total protein, no difference was observed ($P > 0.05$). At 42 days, the concentration of calcium, phosphorus and total protein was higher in birds that received the CP diet. For glucose, the highest concentration was in birds that received 2000 FTU kg⁻¹ compared to those that received 1000 FTU kg⁻¹. For triglycerides, the concentration was lower in birds that received 1000 and 1500 FTU kg⁻¹ of phytase. There was no difference for alkaline phosphatase ($P > 0.05$). The addition of carbohydrases associated with 1000 FTU kg⁻¹ phytase provided an increase in serum calcium, phosphorus and total protein of the birds at 21 days. At 42 days, birds on the CP diet showed higher levels of calcium and phosphorus and the inclusion of enzymes reduced these levels, however, the bone parameters were not changed.

Keywords: bone strength, phytate, phosphorus, bone mineralization.

4.1 Introdução

A metabolizabilidade dos nutrientes de dietas a base de milho e farelo de soja vem sendo maximizada nos últimos anos, melhorando o desempenho de frangos de corte, através do uso de enzimas exógenas que degradam substratos específicos. As fitases e as carboidrases atuam sobre o ácido fítico e os polissacarídeos não amiláceos (PNA's), respectivamente (SCHRAMM et al., 2017), os quais são considerados os principais fatores antinutricionais contidos nos grãos dos ingredientes de origem vegetal utilizados em rações para aves (TAVERNARI et al., 2008).

Segundo Carvalho Filho et al. (2014) 66% do fósforo armazenado nos ingredientes de origem vegetal está na forma de ácido fítico, podendo formar complexos insolúveis com cátions multivalentes, aminoácidos, carboidratos e proteínas, reduzindo a digestibilidade das dietas (FUKAYAMA et al., 2008). O fósforo desempenha funções importantes nos processos fisiológicos e enzimáticos (SANTOS et al., 2011) e é fundamental na manutenção, desenvolvimento e reparo de tecidos, além de atuar na mineralização óssea juntamente com o cálcio (PARRA-MARTÍN et al., 2015).

A adição de fitase promove benefícios sobre o desempenho das aves através da hidrólise do fitato, melhorando a eficiência alimentar e a utilização de energia e também atua sobre a retenção de minerais proporcionando um melhor desenvolvimento ósseo (KHAN et al. 2013). Neste contexto, a disponibilização do fósforo contido na molécula de fitato pode minimizar os problemas locomotores e reduzir a suplementação inorgânica de fósforo, diminuindo os custos das rações e os impactos ambientais causados pela liberação deste mineral (DERSJANT-LI et al., 2015).

Alterações no metabolismo ósseo podem proporcionar perdas econômicas nos abatedouros, pela incidência de fraturas relacionadas à mineralização deficiente, além de afetar diretamente o desempenho e o bem-estar das aves (FERNANDES et al. 2019). Altas doses de fitase permitem a redução de cálcio, fósforo e aminoácidos na dieta (WALK; RAMA RAO, 2018) e podem proporcionar efeitos extra-fosfóricos (WALK et al., 2014; LEE et al., 2017). Um desses efeitos é o fornecimento de mio-inositol, o qual desempenha um papel importante na sobrevivência e crescimento das células e em outras funções biológicas (LEE; BEDFORD, 2016).

Os PNA's podem atuar como barreira física e limitar o acesso de enzimas endógenas, reduzindo a disponibilidade de nutrientes (CONTE et al., 2003). As carboidrases hidrolisam a

matriz da parede celular, principalmente os componentes insolúveis, facilitando a liberação de nutrientes encapsulados, proporcionando acesso das enzimas digestivas ao substrato (COWIESON, 2005; CHOCT, 2006). Essas enzimas também atuam reduzindo a viscosidade da digesta e melhorando a utilização dos nutrientes (SLOMINSKI, 2011).

Fitase e carboidrase podem agir de forma aditiva ou sinérgica. As carboidrases hidrolisam os PNA's presentes nas paredes celulares dos grãos, permitindo o acesso da fitase ao fitato que está encapsulado dentro da célula, além de degradar PNA's para monossacarídeos, de fácil digestão no intestino delgado (BEDFORD; SCHUZLE, 1998).

Diante disso, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar os efeitos da combinação de altas doses de fitase e carboidrases sobre os parâmetros ósseos e sanguíneos de frangos de corte.

4.2 Material e Métodos

Esse trabalho foi conduzido no Centro de Pesquisa em Avicultura da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Unioeste, *Campus* de Marechal Cândido Rondon/PR. Os procedimentos adotados durante a realização do experimento foram realizados em conformidade com a Resolução Normativa nº 37 de 15 de fevereiro de 2018 do CONCEA, que estabelece as Diretrizes da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. As aves foram manuseadas com cuidado para evitar desconforto desnecessário e todos os procedimentos experimentais foram previamente aprovados pelo comitê de ética e biossegurança da Universidade.

O aviário experimental utilizado foi construído em alvenaria com 35 metros de comprimento e 13 metros de largura, dividido em boxes de 1,95m². Cada box (unidade experimental – UE) dispunha de um comedouro tubular, bebedouro tipo nipple, fonte para aquecimento (resistência 250 watts) e piso de concreto, o qual foi recoberto com maravalha de pinus de primeiro lote.

Ao todo, foram utilizados 1.540 pintos de corte, machos, de um dia de idade, da linhagem Cobb 500, provenientes de matrizes entre 40 a 50 semanas de idade. As aves foram distribuídas em um delineamento inteiramente casualizado, constituído por cinco tratamentos e 14 repetições com 22 aves por UE.

As dietas experimentais foram formuladas de acordo com a composição dos alimentos e exigências nutricionais recomendadas por Rostagno et al. (2017), para as fases de 1 a 7, 8 a 21

e 22 a 42 dias de idade para frangos de corte de desempenho médio-regular (Tabela 1). Os animais receberam ração e água *ad libitum* durante todo o período experimental.

Os tratamentos consistiram em: 1) controle positivo (CP), ração a base de milho e farelo de soja com inclusão de farinha de carne, farinha de vísceras e farinha de penas, sem enzimas e atendendo as exigências nutricionais para cada fase; 2) controle negativo (CN) - ração CP com redução de 100 kcal, 0,15% P, 0,12% Ca, 4% AA e 5% Na; 3) ração CN + carboidrase + fitase (1000 FTU kg⁻¹); 4) ração CN + carboidrase + fitase (1500 FTU kg⁻¹); e 5) ração CN + carboidrase + fitase (2000 FTU kg⁻¹). A fitase utilizada foi a Aextra® PHY, Danisco Animal Nutrition, uma 6-fitase (fitase, EC 3.1.3.26) de origem bacteriana proveniente da espécie *Buttiauxella* e expressa em um fungo *Trichoderma reesei*, com atividade de fitase de 10.000 unidades de fitase (FTU) por grama. A enzima carboidrase foi composta por endo-1,4- β -xilanase (2600 DNS) e endo-1,3(4)- β -glucanase (1800 DNS).

Aos 21 e 42 dias de idade, uma ave por UE (n=70), escolhida ao acaso, foi mantida em jejum por seis horas, para colheita de sangue via punção braquial. Após este processo, o sangue foi centrifugado por 10 minutos a 2.500 rotações por minuto (1050g) e o soro separado e congelado para as análises de cálcio, fósforo, triglicerídeos, glicose, proteínas totais e fosfatase alcalina. As leituras foram realizadas com a utilização de “kits” comerciais, Elitech, utilizando espectrofotômetro, com calibração automática e leitura de alta performance (Analisador Bioquímico Flexor EL 200).

Para avaliação dos parâmetros ósseos, foram coletadas as duas pernas de uma ave por UE (n=70) aos 21 e 42 dias de idade, desossadas para obtenção das tíbias, sendo congeladas a -20° C até o início das análises. Posteriormente, a tíbia esquerda foi pesada em balança analítica (g $\pm$ 0,0001) e o comprimento mensurado usando paquímetro eletrônico digital (mm). O índice de Seedor foi calculado ao dividir o peso do osso por seu comprimento (SEEDOR et al., 1991).

Para a determinação da resistência à ruptura óssea, os ossos foram descongelados à temperatura ambiente. As tíbias foram apoiadas individualmente nas regiões das epífises, sendo aplicada uma carga de força de 200 kgf na velocidade de 5 mm s⁻¹ na região central de cada osso utilizando uma sonda TA-TPB e um Texturômetro (CT3 Texture Analyzer, Brookfield).

Tabela 1. Composição percentual e calculada das rações experimentais

Ingredientes (%)	1 a 7 dias		8 a 21 dias		22 a 42 dias	
	CP	CN	CP	CN	CP	CN
Milho	50,546	58,403	53,677	62,578	65,661	70,687
Soja farelo (46%)	35,428	31,350	30,700	26,500	18,860	16,769
Farinha de vísceras	3,000	3,000	3,000	3,000	4,516	5,000
Farinha carne e ossos (45%)	3,000	2,700	5,000	2,500	3,600	2,600
Farinha pena					1,500	1,500
Óleo de soja	5,157	2,122	6,100	3,100	4,391	1,928
Calcário	0,595	0,700	0,141	0,708	0,206	0,278
Fosfato monocálcico	0,600					
Sal comum	0,393	0,365	0,288	0,299	0,288	0,273
L-Lisina sulfato (50,7%)	0,384	0,467	0,290	0,461	0,380	0,398
DL-Metionina (99%)	0,390	0,337	0,331	0,298	0,232	0,180
L-Treonina (98%)	0,099	0,079	0,076	0,085	0,062	0,033
Cloreto de colina (75%)	0,058	0,069	0,047	0,063	0,054	0,046
Suplemento mineral e vitamínico ¹	0,250	0,250	0,250	0,250	0,250	0,250
Adsorvente de Micotoxinas ²	0,100	0,100	0,100	0,100		
Inerte ³		0,058		0,058		0,058
Total	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000
Composição calculada						
EM (MJ kg ⁻¹)	13,05	12,63	13,52	13,10	13,79	13,37
Proteína Bruta (g/kg)	239,8	225,9	228,0	205,3	197,7	189,9
Cálcio (g/kg)	9,56	8,36	9,23	8,03	8,03	7,14
Fósforo disponível (g/kg)	4,75	3,25	4,61	3,11	4,02	3,52
Lisina digestível (g/kg)	13,30	12,77	12,00	11,52	10,17	9,77
Metionina + cistina (g/kg)	7,06	6,40	6,34	5,79	4,99	4,43
Treonina digestível (g/kg)	8,61	7,93	7,92	7,29	6,75	6,24
Triptofano digestível (g/kg)	2,39	2,21	2,18	1,96	1,70	1,61
Sódio (g/kg)	2,30	2,18	2,00	1,90	2,00	1,90

¹Premix mineral e vitamínico (1 – 21 dias), níveis por kg de produto: Ácido Fólico (min) 400 mg; Ácido Pantotênico (min) 500 mg; BHT (min) 60 g; Biotina (min) 32 mg; Cobre (min) 3200 mg; Enramicina 4000 mg; Ferro (min) 18 g; Iodo (min) 480 mg; Manganês (min) 32 g; Narazina 20 g; Niacina (min) 16,80 g; Nicarbazina 20 g; Selênio (min) 120 mg; Vitamina A (min) 4000000 UI; Vitamina B1 (min) 800 mg; Vitamina B12 (min) 7200 Mcg; Vitamina B2 (min) 2600 mg; Vitamina B6 (min) 1120 mg; Vitamina D3 (min) 1600000 UI; Vitamina E (min) 10000 UI; Vitamina K3 (min) 960 mg; Zinco (min) 44 g. Premix mineral e vitamínico (22 – 42 dias), níveis por kg de produto: Ácido Fólico (min) 360 mg; Ácido Pantotênico (min) 4280 mg; BHT (min) 60 g; Biotina (min) 26 mg; Cobre (min) 3200 mg; Enramicina 4000 mg; Ferro (min) 18 g; Iodo (min) 480 mg; Manganês (min) 32 g; Niacina (min) 14 g; Salinomicina 24 g; Selênio (min) 120 mg; Vitamina A (min) 3200000 UI; Vitamina B1 (min) 720 mg; Vitamina B12 (min) 6000 Mcg; Vitamina B2 (min) 2200 mg; Vitamina B6 (min) 1000 mg; Vitamina D3 (min) 1200000 UI; Vitamina E (min) 8000 UI; Vitamina K3 (min) 840 mg; Zinco (min) 44 g; ²Alumínio silicato; ³A inclusão da enzima fitase (1000; 1500 e 2000 FTU) e da enzima carboidrase (endo-1,4-β-xilanase (2600 DNS) e endo-1,3(4)-β-glucanase (1800 DNS)) foi realizada em substituição ao inerte (caulim).

Após a mensuração da resistência óssea, os ossos foram preparados para a determinação do teor de minerais. Para tanto, os ossos foram desengordurados em éter de petróleo, secos e pesados em balança analítica (0,001g). Posteriormente, foram secos em estufa a 105°C por 24 horas, pesados após resfriamento e calcinados em mufla a 600° C, para obtenção das cinzas. O teor de cálcio e fósforo no osso foi determinado de acordo com a metodologia descrita por Silva e Queiróz (2004), sendo as cinzas colocadas em um banho de areia (250°C) em uma solução de HCl (6 M) para solubilizar os minerais. As concentrações de cálcio e fósforo foram determinadas por espectrofotometria e absorção atômica, segundo metodologia proposta por Sarruge e Haag (1974).

Para avaliar a incidência de discondroplasia tibial, a tíbia da perna direita foi descalcificada com ácido fórmico 50% e citrato de sódio 20% (FERNANDES et al., 2007). Após a descalcificação, o osso foi incluído em parafina (BEÇAK; PAULETE, 1976). Os cortes foram feitos com micrótomo a 5 µm de espessura e corados com hematoxilina e eosina, para observação da área do disco epifisário e medidas das áreas para caracterizar a incidência de discondroplasia tibial. Para análise das lâminas da cartilagem epifisária tibial, foram consideradas as medidas da placa de crescimento. As imagens foram medidas com auxílio de um software para análises de imagens (PROPLUS IMAGE 4.1).

As tíbias esquerdas foram utilizadas para determinar a densitometria óssea radiográfica (densidade mineral óssea), realizada na Clínica Odontológica do Hospital Universitário de Cascavel. O tibiotarso foi utilizado para determinar a densitometria óptica em imagens radiográficas em comparação a uma escala de alumínio com 10 degraus de 1 mm (penetrômetro). Os ossos foram radiografados com uma máquina de raios-X odontológica (Orthopantomograph OP 300) a 85 kVp, 6,3 mA e 10 segundos de tempo de exposição. As imagens digitais foram analisadas usando o Adobe Photoshop CS6. Foram analisadas cinco áreas (degraus) do penetrômetro (1 a 5 mm) e seis áreas de cada osso, e o valor obtido foi aplicado na equação para determinar o valor da densidade mineral óssea expressa em milímetros de alumínio (mmAl). Valores maiores indicam maior radioatividade e maior densidade óssea.

Os dados foram verificados quanto à presença de valores discrepantes/ outliers (teste de Kruskal Wallis), os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância por intermédio do software estatístico SAS® University Edition (2017) (SAS Inst. Inc., Cary, NC, EUA) e para comparação de resultados entre os tratamentos foi utilizado o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.3 Resultados e discussão

Aos 21 e 42 dias de idade, não foram observadas diferenças ($P>0,05$) entre os tratamentos quanto à resistência a ruptura, índice de Seedor, densidade e placa de crescimento (Tabela 2).

Os ossos são constituídos por uma fração inorgânica, compostos formados por fosfato de cálcio e carbonato de cálcio que determinam a densidade e resistência óssea, e de uma fração orgânica, constituída por proteínas colagenosas e não colagenosas e proteoglicanos, que garantem a elasticidade (RATH et al., 2000). Com base nos resultados obtidos, pode-se considerar que os diferentes tratamentos não interferiram na matriz inorgânica dos ossos, diretamente relacionada à quantidade de cálcio e fósforo, proporcionando resultados de resistência e densidade óssea semelhantes. O mesmo ocorreu com o índice de Seedor em ambas as idades, sendo esse parâmetro relacionado à densidade óssea.

Diferentemente desses resultados, Chung et al. (2013) ao utilizarem fitases microbianas (fúngica e bacterina) observaram melhora na densidade óssea. Já Junqueira et al. (2011) observaram que os melhores resultados de densidade óssea foram nas aves que receberam dieta sem adição de fitase. Onyango et al. (2004) ao avaliarem a inclusão de fitase em dietas a base de milho e farelo de soja com menor teor de fósforo, observaram que houve uma influência positiva da suplementação de fitase sobre os parâmetros de densidade e resistência óssea.

Tabela 2 – Parâmetros ósseos de frangos de corte, aos 21 e 42 dias de idade, alimentados com dietas contendo carboidrases e diferentes níveis de fitase.

Tratamento	21 dias				42 dias			
	R (kgf mm ⁻¹)	IS	D (mmA)	PC (mm ²)	R (kgf mm ⁻¹)	IS	D (mmA)	PC (mm ²)
CP	21,45	69,86	2,44	17,48	41,13	130,49	2,38	20,39
CN	17,69	65,19	2,64	17,88	41,68	145,57	2,52	18,72
CN+CHO+1000FTU	19,36	68,76	2,61	18,13	39,52	142,56	2,76	20,41
CN+CHO+1500FTU	22,56	69,76	2,66	19,05	32,88	135,65	2,61	17,58
CN+CHO+2000FTU	20,70	69,97	2,51	18,34	37,90	145,98	2,66	19,22
EPM	0,64	0,88	0,03	0,55	1,09	4,57	0,07	0,67
CV (%)	18,68	7,43	7,61	17,44	14,44	19,32	15,17	19,78
p ANOVA	0,134	0,436	0,193	0,935	0,062	0,803	0,440	0,692

R= Resistência, E= Elasticidade, IS= Índice de Seedor, D= Densidade, PC= Placa de crescimento. Médias com letras distintas na mesma coluna indicam diferenças (P<0,05) pelo teste de Tukey. CP – Controle Positivo - Ração basal (níveis normais) sem enzimas; CN – Controle Negativo - Ração basal menos 100 kcal, 0,15% P, 0,12% Ca, - 4% AA, 5% Na; CHO - carboidrases (endo-1,4-β-xilanase (2600 DNS) e endo-1,3(4)-β-glucanase (1800 DNS)).

A fim de identificar a incidência de discondroplasia tibial em frangos de corte, tem-se utilizado a zona de placa de crescimento como parâmetro (MURAKAMI et al., 2001; OVIEDO-RONDÓN et al., 2001). A discondroplasia tibial se caracteriza por uma camada de cartilagem não calcificada, opaca e avascular, originada na indiferenciação dos condrócitos na placa de crescimento, resultando no acúmulo de condrócitos pré-hipertróficos imaturos (PRAUL et al., 2000). Conforme os resultados encontrados, os diferentes tratamentos não interferiram na formação da placa de crescimento, identificando ausência de discondroplasia tibial.

Analisando os valores de matéria mineral e teores de cálcio e fósforo dos ossos da tíbia de frangos de corte aos 21 e 42 dias de idade, não se constatou diferença ($P>0,05$) entre os tratamentos (Tabela 3).

Tabela 3 – Valores em porcentagem (%) de matéria mineral (MM), cálcio e fósforo de frangos de corte aos 21 e 42 dias de idade, alimentados com dietas contendo carboidrases e diferentes níveis de fitase.

Tratamento	21 dias			42 dias		
	MM	Cálcio	Fósforo	MM	Cálcio	Fósforo
CP	48,533	20,80	9,35	44,634	15,59	8,03
CN	46,171	19,30	8,39	44,822	16,34	8,53
CN+CHO+1000FTU	47,931	20,66	9,90	45,930	15,74	8,98
CN+CHO+1500FTU	47,799	20,60	9,49	43,596	14,98	8,29
CN+CHO+2000FTU	48,442	21,06	9,56	43,777	15,94	8,70
EPM	0,349	1,238	1,056	0,408	1,197	0,875
CV (%)	4,19	6,05	11,31	5,18	7,61	10,26
p ANOVA	0,185	0,0995	0,1202	0,369	0,3996	0,3642

CP – Controle Positivo - Ração basal (níveis normais) sem enzimas; CN – Controle Negativo - Ração basal menos 100 kcal, 0,15% P, 0,12% Ca, - 4% AA, 5% Na; CHO - carboidrases - endo-1,4- β -xilanase (2600 DNS) e endo-1,3(4)- β -glucanase (1800 DNS).

Segundo Francesch e Geraert (2009) a redução de níveis nutricionais diminuiu teores de matéria mineral, cálcio e fósforo de ossos de frangos de corte, quando comparados a uma dieta basal. No entanto, com a suplementação de enzimas (xilanase, glucanase e fitase) os autores observaram uma melhora na mineralização óssea aos 21 dias, mantendo-se semelhante às aves que receberam dieta com níveis nutricionais adequados. Walk et al. (2014) encontraram aumento na porcentagem de cinzas nas tíbias de aves que receberam ração com restrição nutricional e suplementação de fitase em até 1500 FTU kg⁻¹.

Entretanto, no presente estudo não foi observado diferença na mineralização óssea entre os tratamentos. Resultados estes que corroboram com os encontrados por Fernandes et

al. (2019), que ao avaliarem a suplementação de altas doses de fitase, não observaram diferenças para deposição de Ca, P e porcentagem de matéria mineral em tíbias de frangos de corte aos 21 dias.

O fósforo é um mineral de extrema importância na garantia da qualidade óssea, porém é um componente de alto custo na formulação de rações para frangos de corte, além de proporcionar impactos ambientais negativos (SCHOLEY et al., 2018). Apesar de não ter sido observado diferença entre os tratamentos neste trabalho, Fernandes et al. (2019) afirmam que o uso de dietas com redução de fósforo inorgânico e suplementação de fitase proporciona menor custo das rações, minimiza a liberação do excesso do P pelas excretas e o esgotamento de recursos naturais não renováveis.

A falta de resposta das enzimas pode estar relacionada à falta de substrato na fase de crescimento nas dietas controle negativo com suplementação enzimática, impedindo a fitase de atuar de forma eficiente. Segundo Amerah et al. (2014) existe muita variação à resposta da fitase, devido a fatores como a concentração de substrato disponível, nível de inclusão e fonte da fitase. No âmbito da nutrição, os minerais são de grande importância, tanto o excesso como a deficiência podem interferir no desempenho das aves, impedindo que expressem todo seu potencial na fase de crescimento (MUNIZ et al., 2007).

A inclusão de enzimas carboidrases pode aumentar a eficiência da fitase, pois a presença de PNA's na dieta pode reduzir a eficácia da fitase, reduzindo a quantidade de substrato ao qual a fitase teria acesso. A fitase libera efetivamente uma porção do fósforo ligado ao fitato (OLUKOSI et al., 2008), porém, mesmo fornecendo altas doses de fitase, uma parcela considerável de ácido fítico pode não ser digerida. Esta incompleta disponibilidade pode estar correlacionada ao fato de que algumas moléculas de fitato permanecem no interior das células que estão protegidas pela parede celular. Conte et al. (2003) não observaram interação significativa entre fitase e xilanase, sobre a porcentagem de cinzas e de fósforo.

Sobre os parâmetros sanguíneos aos 21 dias de idade, as aves que receberam dietas com a inclusão de 1000 FTU kg⁻¹ apresentaram maior concentração de cálcio e fósforo no sangue quando comparadas às aves dos demais tratamentos, apesar do mecanismo de homeostase de cálcio e fósforo das aves ser muito eficiente. O nível de triglicerídeos no sangue das aves que receberam a dieta CN e 1000 FTU kg⁻¹ apresentaram as maiores concentrações, e o nível de 1000 FTU kg⁻¹ foi semelhante ao de 1500 FTU kg⁻¹. Já para fosfatase alcalina as aves que receberam dieta com 1500 FTU kg⁻¹ de fitase apresentaram

menor valor quando comparadas ao CP. Para glicose e proteína total não foi constatada diferença ($P>0,05$) entre os tratamentos (Tabela 4).

Tabela 4 – Parâmetros sanguíneos de frangos de corte, aos 21 dias de idade, alimentados com dietas contendo carboidrases e diferentes níveis de fitase.

Tratamento	Ca	P	GLI	PT	TRI	FA
CP	4,38 ^b	3,79 ^b	245,14	25,21	23,71 ^d	24592,86 ^a
CN	5,31 ^b	3,88 ^b	244,43	27,53	41,50 ^a	18160,00 ^{ab}
CN+CHO+1000FTU	6,87 ^a	4,87 ^a	250,21	28,15	35,14 ^{ab}	18088,57 ^{ab}
CN+CHO+1500FTU	4,91 ^b	4,16 ^b	250,50	26,48	31,93 ^{bc}	14189,23 ^b
CN+CHO+2000FTU	4,07 ^b	3,82 ^b	240,07	25,13	25,79 ^{cd}	16628,57 ^{ab}
EPM	0,18	0,08	1,88	0,38	1,06	1030,05
CV (%)	29,48	16,61	6,39	12,06	28,14	46,52
p ANOVA	0,0001	0,0001	0,380	0,034	0,0001	0,021

Ca= Cálcio (mg dl⁻¹), P= Fósforo (mg dl⁻¹), Gli= Glicose (mg dl⁻¹), PT= Proteína total (g dl⁻¹), Tri= Triglicerídeos (mg dl⁻¹), FA= Fosfatase alcalina (U l⁻¹). Médias com letras distintas na mesma coluna indicam diferenças ($P<0,05$) pelo teste de Tukey. CP – Controle Positivo - Ração basal (níveis normais) sem enzimas; CN – Controle Negativo - Ração basal menos 100 kcal, 0,15% P, 0,12% Ca, - 4% AA, 5% Na; CHO - carboidrases (endo-1,4- β -xilanase (2600 DNS) e endo-1,3(4)- β -glucanase (1800 DNS)).

Segundo Broch et al. (2018) o aumento da concentração de P no sangue pode estar relacionado a um crescimento ósseo dinâmico, quando o crescimento ósseo diminui, reduz-se a transferência de P para os ossos, aumentando a concentração de P sanguíneo. A utilização de fitase nas dietas eleva as concentrações de P e reduz os níveis de Ca plasmático, mantendo esses minerais em equilíbrio homeostático (SHIRLEY; EDWARDS, 2013).

A fosfatase alcalina é uma enzima que aumenta a concentração de fosfato inorgânico e ativa fibras de colágeno para deposição de sais de cálcio na matriz óssea, de modo que o nível sérico desta enzima é considerado um indicador da velocidade da formação óssea (MINAFRA et al., 2008). A inclusão de fitase proporcionou redução da atividade da fosfatase alcalina no soro sugerindo que o nível de fósforo pode regular a produção desta enzima.

Os resultados observados para os níveis séricos de fósforo, cálcio e proteína, demonstram que estes parâmetros responderam à suplementação de fitase. A adição de fitase ao nível de 1000 FTU kg⁻¹ aumentou os teores sanguíneos de fósforo e cálcio das aves, evidenciando a eficiência desta enzima em hidrolisar o complexo ácido fítico – mineral, disponibilizando estes nutrientes para absorção. A fitase atua na quebra dos complexos de fitato liberando minerais, proteínas, aminoácidos e amido, disponibilizando-os para a absorção (RAVINDRAN et al., 1999). Neste contexto, estes minerais passíveis de serem

absorvidos podem ser utilizados pelas aves nos processos de mineralização da matriz óssea, visto que o cálcio e o fósforo são os principais formadores da matriz mineral (LELIS et al., 2009). Apesar do aumento dos níveis séricos, a maior disponibilidade desses minerais não refletiu em uma maior mineralização óssea.

Aos 42 dias, as aves alimentadas com dieta CP apresentaram maior concentração de cálcio no sangue quando comparadas às aves dos tratamentos que receberam suplementação enzimática. Aves alimentadas com tratamento CP apresentaram uma maior concentração de fósforo e proteína total no sangue em relação às aves dos tratamentos com 1000 e 1500 FTU kg^{-1} de fitase. Em relação à glicose, maior concentração foi observada nas aves que receberam 2000 FTU kg^{-1} de fitase em comparação as aves que receberam 1000 FTU kg^{-1} , mas não diferiram do CP e CN. A concentração de triglicerídeos no sangue foi menor nas aves que receberam 1500 FTU kg^{-1} de fitase, mantendo-se semelhante apenas com as aves que receberam 1000 FTU kg^{-1} . Para o parâmetro de fosfatase alcalina não houve diferença entre os tratamentos (Tabela 5).

Tabela 5 – Parâmetros sanguíneos de frangos de corte, aos 42 dias de idade, alimentados com dietas contendo carboidrases e diferentes níveis de fitase.

Tratamento	Ca	P	GLI	PT	TRI	FA
CP	8,05 ^a	4,78 ^a	234,29 ^{ab}	32,23 ^a	48,23 ^{ab}	4406,15
CN	7,34 ^{ab}	4,26 ^{ab}	229,14 ^{ab}	30,09 ^{ab}	51,36 ^a	4660,00
CN+CHO+1000FTU	5,78 ^c	3,80 ^b	221,07 ^b	28,25 ^b	40,93 ^{bc}	3570,77
CN+CHO+1500FTU	5,71 ^c	4,03 ^b	227,71 ^{ab}	28,27 ^b	38,71 ^c	3328,57
CN+CHO+2000FTU	5,95 ^{bc}	4,19 ^{ab}	237,15 ^a	30,03 ^{ab}	48,54 ^{ab}	3947,14
EPM	0,19	0,08	1,82	0,43	1,11	259,74
CV (%)	24,46	15,07	6,57	11,96	20,11	53,00
p ANOVA	0,0001	0,0004	0,049	0,014	0,0002	0,482

Ca= Cálcio (mg dl^{-1}), P= Fósforo (mg dl^{-1}), Gli= Glicose (mg dl^{-1}), PT= Proteína total (g dl^{-1}), Tri= Triglicerídeos (mg dl^{-1}), FA= Fosfatase alcalina (U l^{-1}). Médias com letras distintas na mesma coluna indicam diferenças ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey. CP – Controle Positivo - Ração basal (níveis normais) sem enzimas; CN – Controle Negativo - Ração basal menos 100 kcal, 0,15% P, 0,12% Ca, - 4% AA, 5% Na; CHO - carboidrases (endo-1,4- β -xilanase (2600 DNS) e endo-1,3(4)- β -glucanase (1800 DNS)).

Segundo Yari et al. (2014) os parâmetros sanguíneos refletem as condições de sanidade e metabolismo das aves, e estes, podem ser influenciados por fatores internos e externos, como idade, sexo, composição das dietas, ambiência e demais fatores.

Aos 42 dias, a suplementação enzimática não aumentou os níveis séricos de cálcio e fósforo. Diferentemente dos resultados encontrados, Cowieson et al. (2013) observaram

aumento nas concentrações de glicose nas aves que receberam dieta controle negativo suplementada com fitase quando comparado à dieta controle positivo. Segundo os autores, o efeito da fitase sobre a glicose pode estar relacionado a mecanismos de transporte dependentes de sódio. Ahmed et al. (2018) ao suplementarem dietas de galinhas poedeiras com fitase, não observaram diferenças entre os tratamentos para cálcio e fósforo. Da mesma forma, Islam et al. (2014) e Nourmohammadi et al. (2011) ao trabalharem com frangos de corte não observaram diferenças sobre os parâmetros sanguíneos.

Os resultados encontrados podem estar relacionados à falta de substrato nas dietas com redução nutricional. De acordo com os teores calculados de ácido fítico das dietas, observou-se uma redução na porcentagem de acordo com as fases, pré-inicial (0,225%), inicial (0,212%) e crescimento (0,196%), demonstrando que a atuação da enzima fitase pode ter sido limitada devido à redução do substrato nas dietas, sendo evidenciada a eficiência da enzima aos 21 dias nas aves que receberam inclusão de 1000 FTU kg⁻¹ de fitase, mas não sendo observado efeito da inclusão aos 42 dias. A relação substrato vs enzima está diretamente relacionada com a eficiência enzimática, a presença de substrato nos ingredientes é variável e depende da sua localização na matriz do ingrediente, presença de outros fatores antinutricionais e do tipo de enzima utilizada (OLUKOSI, 2013).

4.4 Conclusão

A adição de carboidrases associada a 1000 FTU kg⁻¹ de fitase em dietas com níveis nutricionais reduzidos proporcionou aumento sérico de cálcio, fósforo e proteína total das aves aos 21 dias. Aos 42 dias, as aves que receberam dieta atendendo as exigências nutricionais apresentaram maiores níveis de cálcio e fósforo e a inclusão de enzimas reduziu estes teores, porém, essas modificações não alteraram as características ósseas dos frangos de corte.

4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, H.; ABDEL-LATIF, M.A.; GHORABA, A.A. et al. Comparative Effect of Microbial Phytase Supplementation on Layer Chickens Fed Diets with Required or Reduced Phosphorous Level. **International Journal of Research**, v.5, n.4, p.437- 449, 2018.
- AMERAH, A.M.; PLUMSTEAD, P.W.; BARNARD, L.P. et al. Effect of calcium level and phytase addition on ileal phytate degradation and amino acid digestibility of broilers fed corn-based diets. **Poultry Science**, v.93, n.4, p.906-915, 2014.
- BEÇAK, W., PAULETE, J. **Técnicas de citologia e histologia**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos. 305p, 1976.
- BEDFORD, M. R., AND H. SCHUZLE. Exogenous enzymes for pigs and poultry. **Nutrition Research Reviews**. v.11, n.1, 91–114, 1998.
- BROCH, J.; NUNES, R.V.; EYNG, C. et al. High levels of dietary phytase improves broiler performance. **Animal Feed Science and Technology**. v. 244, p. 56-65, 2018.
- CARVALHO FILHO, D.U.; FIGUEIREDO, A.V.; LOPES, J.B. et al. Fitase em dietas para frangos de corte de 1 a 21 dias alojados em ambientes com diferentes sistemas de climatização. **Revista Brasileira de Sanidade e Produção Animal**. V.15, n.4, 957-969, 2014.
- CHOCT, M. Enzymes for the feed industry: past, present and future. **World's Poultry Science Journal**, v. 62, n.2, 5-15, 2006.
- CHUNG, TK.; RUHTERFURD, S.M.; THOMAS, S.V. et al. Effect of two microbial on mineral availability and retention and bone mineral availability and retention and bone mineral density in low-phosphorus diets for broilers. **British Poultry Science**. v.54, n.3, 362-373, 2013.
- CONTE, A.J.; TEIXEIRA, A.S.; FIALHO, E.T. et al. Efeito da Fitase e Xilanasase sobre o Desempenho e as Características Ósseas de Frangos de Corte Alimentados com Dietas Contendo Farelo de Arroz. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.32, n.5, 1147-1156, 2003.
- COWIESON, A.J. Factors that affect the nutritional value of maize for broilers. **Animal Feed Science and Technology**, v.119, p.293–305, 2005.
- COWIESON, A.J.; PTAK, A.; MACKOWIAK, P. et al. The effect of microbial phytase and myo-inositol on performance and blood biochemistry of broiler chickens fed wheat/corn-based diets. **Poultry Science**, v.92, n.8, p.2124–2134, 2013.
- DERSJANT-LI, Y.; AWATI, A.; SCHULZE, H. et al. 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**, v.95, n.5, p.878-896, 2015.
- FERNANDES, J.I.M.; HORN, D.; RONCONI, E.J. et al. Effects of Phytase Superdosing on Digestibility and Bone Integrity of Broilers. **The Journal of Applied Poultry Research**. v.28, n.2, p.390–398, 2019.
- FERNANDES, M.I.; GAIO, J.E.; ROSING, K.C. et al. Microscopic qualitative evaluation of fixation time and decalcification media in rat maxillary periodontium. **Brazilian Oral Research**. v.21, n.2, 134-139, 2007.
- FRANCESCH, M.; GERAERT, P.A. Enzyme complex containing carbohydrases and phytase improves growth performance and bone mineralization of broilers fed reduced nutrient corn-soybean based diets. **Poultry Science**, v.88, n.9, 1915–1924, 2009.

- FUKAYAMA, E.H.; SAKOMURA, N.K.; DOURADO, L.R.B. et al. Efeito da suplementação de fitase e a digestibilidade dos nutrientes em frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**.v.37, n.4, 629-635, 2008.
- ISLAM, R.A.; IDERIS, A.; KASIM, A. et al. Effects of locally produced bacterial phytase on humoral immunity, live body weight and blood characteristics in broilers vaccinated against Newcastle disease. **Jurnal Veterinar Malaysia**. v.26, n.1, 8-16, 2014.
- JUNQUEIRA, O. M.; DUARTE, K. F.; ASSUENA, V. et al. Effect of phytase supplementation on performance, bone densitometry and carcass yield in broilers chicks. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 33, n. 3, p. 301-307, 2011.
- KHAN, S. A.; CHAUDHRY, H. R.; MUSTAFA, Y. S. et al. The effect of phytase enzyme on the performance of broilers (review). **Biologia (Pakistan)**. v.59, n.1, p.99-106, 2013.
- LEE, S.A.; BEDFORD, M.R. Inositol - an effective growth promotor? **World's Poultry Science Journal**, v.72, n.4, 743-760, 2016.
- LEE, S.A.D.; NAGALAKSHMI, M.V.L.N.; RAJU, S.V. et al. Effect of phytase superdosing, myoinositol and available phosphorus concentrations on performance and bone mineralisation in broilers. **Animal Nutrition**. v.3, n.3, 247-251, 2017.
- LELIS, G.R.; ALBINO, L.F.T.; TAVERNARI, F.C. et al. Suplementação dietética de fitase em dietas para frangos de corte. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.6, n.2, 875-889, 2009.
- MINAFRA, C.S.; MORAES, G.H.K. de; RODRIGUES, A.C.P. et al. Perfil bioquímico e nutricional do ácido glutâmico e da vitamina K no soro e no fígado de frangos de corte de 1 a 21 dias de idade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.11, 1973-1977, 2008.
- MUNIZ, E. B.; ARRUDA, A. M. V.; FASSANI, E. J. et al. Evaluation of calcium sources to the broiler chickens. **Revista Caatinga** v.20, n.1, 05-14, 2007.
- MURAKAMI, A.E.; OVIEDO-RONDÓN, E.O.; MARTINS, E.M. et al. Sodium and chloride requirements of growing broiler chickens (twenty-one to forty-two days of age) fed cornsoybean diets. **Poultry Science**, v.80 n.3 , 289-294, 2001.
- NOURMOHAMMADI, R.; HOSSEINI, S.M.; FARHANGFAR, H. Effect of citric acid and microbial phytase on serum enzyme activities and plasma minerals retention in broiler chicks. **African Journal of Biotechnology**. v.10, n.62, 13640-13650, 2011.
- OLUKOSI, O.A. Biochemistry of phytate and phytases: Applications in monogastric nutrition. **Journal of the Nigerian Society for Experimental Biology**, v.24, n.2, p.58-63, 2013.
- 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. **British Journal of Nutrition**, v.99, 682-690, 2008.
- ONYANGO, E. M.; BEDFORD, M. R.; ADEOLA, O. The yeast production system in which *Escherichia coli* phytase is expressed may affect growth performance, bone ash, and nutrient use in broiler chicks. **Poultry Science**, v. 83, n. 3, p. 421-427, 2004.
- OVIEDO-RONDÓN, E.O.; MURAKAMI, A.E., FURLAN, A.C. et al. Sodium and chloride requirements of young broiler chickens fed corn-soybean diets (one to twenty-one days of age). **Poultry Science**. v.80, n.5, 592-598, 2001.
- PARRA-MARTÍN, J.A.; ALBINO, L.F.T.; ROSTAGNO, H.S. et al. Redução da exigência de fósforo disponível em dietas com adição de fitase para frangos de corte machos de oito aos 21 dias de idade. **Spei Domus**, v.11, n.22, p.9-16, 2015.
- PRAUL, C.A.; FORD, B.C.; GAY, C.V. et al. Gene Expression and Tibial Dyschondroplasia. **Poultry Science**, v.79, n.7, p.1009-1013, 2000.

- RATH N, HUFF G, HUFF W, et al. Factors regulating bone maturity and strength in poultry. **Poultry Science**. v.79, n.7, 1024–1032, 2000.
- RAVINDRAN, V.; CABAHUG, S.; RAVINDRAN, G. et al. Influence of microbial phytase on apparent ileal amino acid digestibility of feedstuffs for broiler. **Poultry Science**, v.78, n.5, p.699- 706, 1999.
- ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; HANNAS, M.I. et al. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. 4a edição. Viçosa, MG: Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, 2017. 488p.
- SANTOS, L.M.; RODRIGUES, P.B.; ALVARENGA, R.R. et al. Níveis de fósforo disponível e cálcio em rações suplementadas com fitase para frangos de corte nas fases de crescimento e final. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.40, n.11, 2486-2495, 2011.
- SARRUGE, J. R.; HAAG, H.P. **Análises químicas em plantas**. Piracicaba, ESALQ, 56p. 1974.
- SAS Institute., 2017. **SAS User's Guide: Statistics. Version 9.3 Edition** (Cary, NC, SAS Inst.Inc.).
- SCHOLEY, D.V.; MORGAN, N.K.; RIEMENSPERGER, A. et al. Effect of supplementation of phytase to diets low in inorganic phosphorus on growth performance and mineralization of broilers. **Poultry Science**, v.97, n.7, 2435–2440, 2018.
- SCHRAMM, V.G.; DURAU, J.F.; BARRILLI, L.N.E. et al. Interaction between xylanase and phytase on the digestibility of corn and a corn/soy diet for broiler chickens. **Poultry Science**, v.96, n.5, 1204-1211, 2017.
- SEEDOR, J.G.; QUARRACCIO, H.H.; THOMPSON, D.D. The biophosphonate alendronate (MK-217) inhibits bone loss due to ovariectomy in rats. **Journal of Bone and Mineral Research**. v.6, n.4, 339- 346, 1991.
- SHIRLEY, R.B., EDWARDS JR., H.M. Graded levels of phytase past industry standards improves broiler performance. **Poultry Science**. v.82, n.671–680, 2003.
- SILVA, D.J., QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentosw (métodos químicos e biológicos)**. Viçosa: UFV, 235p. 2002.
- SLOMINSKI, B.A. Recent advances in research on enzymes for poultry diets. **Poultry Science**, v.90, n.9, 2013-2023, 2011.
- TAVERNARI, F.C.; CARVALHO, T.A.; ASSIS, A.P. et al. Polissacarídeos não-amiláceo solúvel na dieta de suínos e aves. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.5, n.5, p.673-689, 2008.
- WALK, C.L.; RAMA RAO, S.V. High doses of phytase on growth performance and apparent ileal amino acid digestibility of broilers fed diets with graded concentrations of digestible sulfur amino acids. **Poultry Science**. v.97, n.10, p.3610-3621, 2018.
- WALK, C.L.; SANTOS, T.T.; BEDFORD, M.R. Influence of superdoses of a novel microbial phytase on growth performance, tibia ash, and gizzard phytate and inositol in young broilers. **Poultry Science**, v.93, n.5, p.1172-1177, 2014.
- YARI, P.; YAGHOB FAR, A.; AGHDAM SHAHRYAR, H. et al. Productive and serum biological responses of broiler chicks to use of different patterns of diet formulation. **International Journal Plant, Animal and Environmental Science**. v.4, n.3, p.459-464, 2014.