

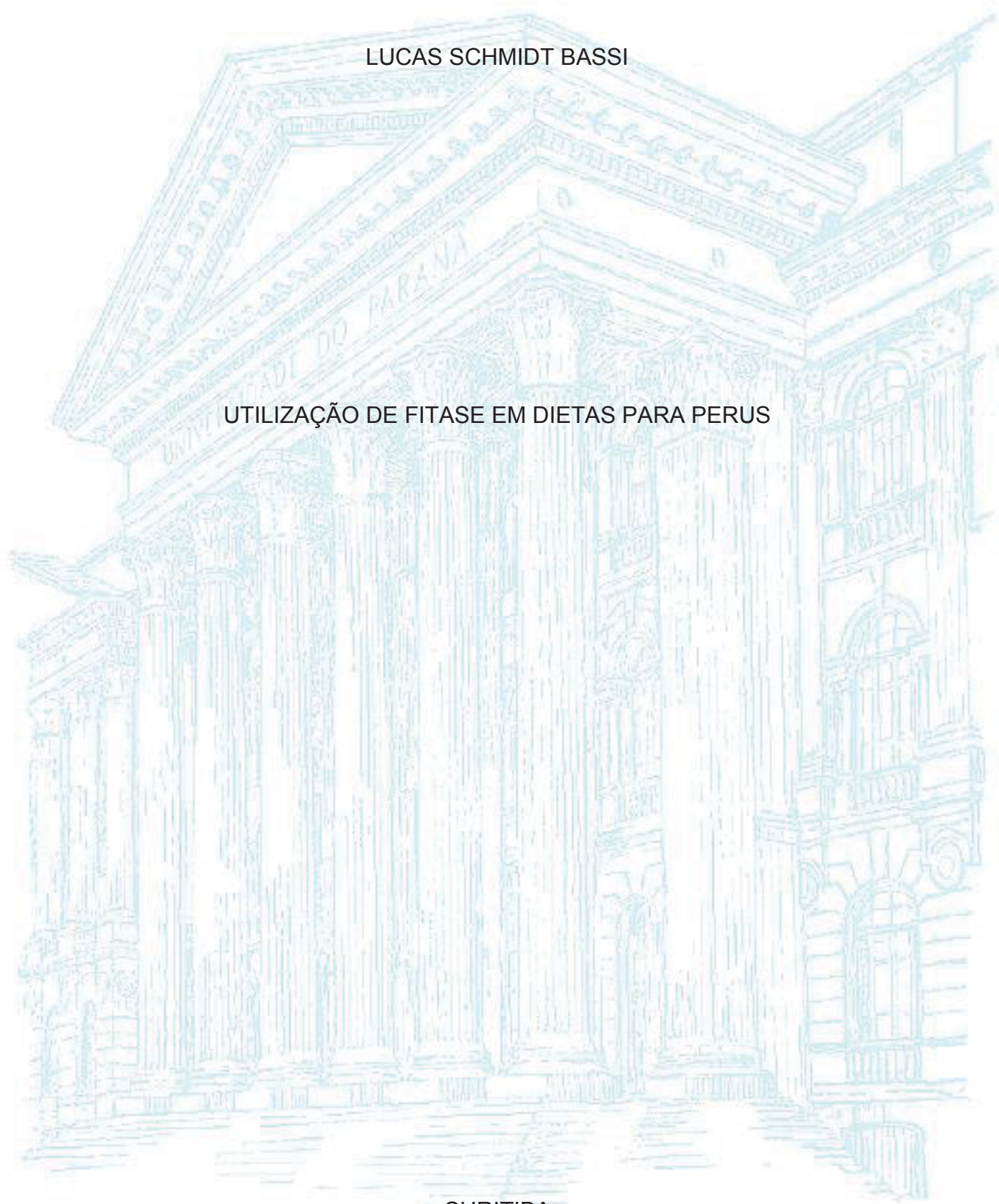
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LUCAS SCHMIDT BASSI

UTILIZAÇÃO DE FITASE EM DIETAS PARA PERUS

CURITIBA

2020



LUCAS SCHMIDT BASSI

UTILIZAÇÃO DE FITASE EM DIETAS PARA PERUS

Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito para a obtenção do Título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Alex Maiorka

CURITIBA

2020

Bassi, Lucas Schmidt

Utilização de fitase em dietas para perus / Lucas Schmidt Bassi. - Curitiba, 2020.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinárias. Orientador: Alex Maiorka.

1. Enzimas - Metabolismo. 2. Nutrientes – Metabolismo. 3. Aves de corte - Alimentação. I. Maiorka, Alex. II. Título. III. Universidade Federal do Paraná.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS - 40001016023P3

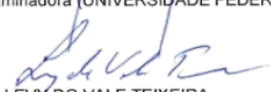
TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS VETERINÁRIAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **LUCAS SCHMIDT BASSI** intitulada: **UTILIZAÇÃO DE FITASE EM DIETAS PARA PERUS**, sob orientação do Prof. Dr. ALEX MAIORKA, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua *aprovação* no rito de defesa. A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

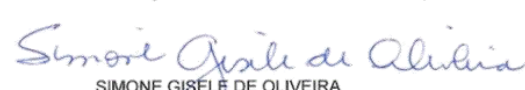
CURITIBA, 20 de Fevereiro de 2020.


ALEX MAIORKA

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)


LEVY DO VALE TEIXEIRA

Avaliador Externo (DSM - NUTRITIONAL PRODUCTS)


SIMONE GISELE DE OLIVEIRA

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

AGRADECIMENTOS

A Bárbara, por todo o amor e carinho, por sempre estar ao meu lado, me apoiar em todos os momentos e me incentivar a sempre me tornar uma pessoa melhor.

A minha família, Levino, Nádia, Arthur, Fabíola e Fabiano pelo amor, apoio e pelas oportunidades e lições que trilharam meu caminho e me trouxeram até onde estou. Também aos membros caninos da família, Lady e Sally, pela alegria e amor que trazem à nossa casa.

Ao meu orientador e professor, Alex Maiorka, pela amizade, paciência, oportunidades e ensinamentos ao longo de tantos anos de estudo.

Aos amigos e colegas do LEPNAN, Jean, Leopoldo, Josiane, Vitor, Katiúcia, por sempre me ajudarem nos momentos de trabalho e esforço desde os tempos de graduação, e pelo forte companheirismo dentro e fora da Universidade.

Aos amigos e colegas da DSM, Levy e Rafael, pelas oportunidades oferecidas e pelo auxílio indispensável na condução e realização deste trabalho.

Aos demais professores do LEPNAN, colegas do LNA e ao senhor Ismael por toda a ajuda.

A CAPES pela concessão da bolsa durante o mestrado.

Obrigado a todos!

“ Nunca aceite um não como resposta e nunca pense que algo é impossível. Divirta-se sempre. Faça o que deseja por paixão verdadeira! ”

Bruce Dickinson.

RESUMO

Foram realizados dois experimentos para avaliar os efeitos de utilização de fitase exógena na dieta de perus de corte. No experimento 1, 320 perus de um dia de idade foram distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado com 4 tratamentos e 8 repetições de 10 aves cada. Os tratamentos consistiram em uma dieta controle positivo (CP), controle negativo (CN, -0,15% P disponível e -0,18% Ca), CN + 2000 FYT/kg, CN + 4000 FYT/kg. Foram avaliados consumo de ração (CR), ganho de peso (GP) e conversão alimentar (CA) de 1-28 dias; Digestibilidade ileal e metabolizabilidade aparente da dieta; Energia digestível (EDA) e metabolizável (EMA) aparentes; Resíduo mineral, Ca, P e Índice de Seedor na tibia e concentração de inositol no plasma. A adição de fitase aumentou CR e GP em comparação a dieta CN ($P < 0,05$). A digestibilidade ileal de P e metabolizabilidade da dieta foram melhoradas linearmente com fitase, assim como valores de EDA e EMA ($P < 0,05$), resultando em aumento linear do teor de P nas tibias e concentração plasmática de inositol. No experimento 2, 420 perus de um dia foram distribuídos em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 3x2: 3 doses de fitase (0, 1000 e 2500 FYT/kg) e 2 pH da água (5,5 e 8,2), com 6 tratamentos e 7 repetições de 10 aves cada. Foram avaliados CR, GP, CA e ingestão de água (IA) de 1-21 dias de idade; Digestibilidade e metabolizabilidade aparente da dieta; EDA e EMA; Resíduo mineral, Ca, P e Índice de Seedor na tibia; pH da moela e concentração plasmática de inositol. A fitase melhorou o GPM e CA em comparação a dieta sem enzima ($P < 0,05$). Não houve efeito de pH da água sobre desempenho ($P > 0,05$) e a IA e pH da moela não foram afetados pelos tratamentos ($P > 0,05$). O uso de fitase melhorou a digestibilidade, metabolizabilidade e valores de EDA e EMA da dieta ($P < 0,05$) independente do pH. O teor de minerais nas tibias e de inositol no plasma foi maior com adição de fitase ($P < 0,05$), sem influência do pH da água ($P > 0,05$). A digestibilidade de Ca e P foi maior em pH 8,2 e a dose de 1000 FYT/kg foi mais eficaz em pH 8,2 para EDA e EMA, enquanto o aproveitamento de matéria seca e proteína foram maiores em pH 5,5. Contudo ao aumentar a dose para 2500 FYT/kg as variáveis de utilização da dieta foram semelhantes em ambos os valores de pH. Os resultados permitem concluir que doses altas de fitase podem ser usadas para otimizar o aproveitamento da dieta de perus e melhorar o desempenho, mineralização óssea e disponibilização de inositol.

Palavras-chave: Enzimas. Fitase. Fitato. Inositol. Perus.

ABSTRACT

Two experiments were conducted to assess the effects of adding exogenous phytase on turkey diets. In experiment 1, 320 one-d-old turkeys were distributed in a completely randomized design with 4 treatments and 8 repetitions of 10 birds each. Treatments consisted of a positive control diet, negative control (NC, -0.15% available P and -0.18% Ca), NC + 2000 FYT/kg, NC + 4000 FYT/kg. Evaluated variables were: feed intake (FI), weight gain (WG) and feed conversion (FC) from 1-28 days; Dietary apparent ileal digestibility and metabolizability; Digestible and metabolizable energy (ADE, AME); Mineral residue, Ca, P and Seedor Index in the tibia and plasmatic inositol. Phytase addition increased FI and WG compared to CN diet ($P < 0.05$). Ileal P digestibility and diet metabolizability were linearly improved with phytase, as well as ADE and AME values ($P < 0.05$), resulting in a linear increase of P bone content and plasmatic concentration of inositol. In experiment 2, 420 one-d-old turkeys were distributed in a completely randomized design in a 3x2 factorial scheme: 3 phytase doses (0, 1000 and 2500 FYT/kg) and 2 water pH levels (5.5 and 8.2), with 6 treatments and 7 replicates of 10 birds. Analyzed variables were: FI, WG, FC and water ingestion (WI) from 1-21 days; apparent digestibility and metabolizability of the diet; ADE and AME; Mineral residue, Ca, P and Seedor Index in the tibia; Plasmatic inositol concentration and gizzard pH. Fitase improved WG and FC compared to unsupplemented diet ($P < 0.05$). Water pH did not affect performance and no difference between treatments were observed for WI and gizzard pH ($P > 0.05$). Phytase inclusion improved dietary digestibility and metabolizability, as well as AME and ADE independently of water pH ($P < 0.05$). Mineral content in tibia and plasmatic inositol were higher with phytase ($P < 0.05$), and were not affected by water pH ($P > 0.05$). Ca and P digestibility were higher in 8.2 water pH, and 1000 FYT/kg dose was more effective on 8.2 pH for ADE and AME, whereas protein and dry matter utilization were higher in 5.5 pH. When increasing the dose to 2500 FYT/kg, however, phytase equally improved diet utilization on both water pH levels. It is concluded that high doses of phytase can be used to optimize diet utilization on turkeys and improve performance, bone mineralization and inositol provision.

Key-words: Enzymes. Inositol. Phytase. Phytate. Turkeys.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. COMPLEXAÇÃO DE NUTRIENTES NA MOLÉCULA DO ÁCIDO FÍTICO.....	19
FIGURA 2. ATIVIDADE DE FITASES DE DIFERENTES ORIGENS EM FUNÇÃO DO PH.	26
FIGURA 3. COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDADE ILEAL DO FÓSFORO COM DOSES CRESCENTES DE FITASE	45
FIGURA 4. COEFICIENTE DE METABOLIZABILIDADE APARENTE DA MATÉRIA SECA (A) E RESÍDUO MINERAL (B) COM DOSES CRESCENTES DE FITASE.....	46
FIGURA 5. COEFICIENTE DE METABOLIZABILIDADE APARENTE DA PROTEÍNA BRUTA (A) E SÓDIO (B) COM DOSES CRESCENTES DE FITASE.	47
FIGURA 6. COEFICIENTE DE METABOLIZABILIDADE APARENTE DE CÁLCIO (A) E FÓSFORO (B) COM DOSES CRESCENTES DE FITASE.	47
FIGURA 7. ENERGIA METABOLIZÁVEL (EMA) COM DOSES CRESCENTES DE FITASE.	47
FIGURA 8. TEOR DE FÓSFORO NA TIBIA COM DOSES CRESCENTES DE FITASE.	48
FIGURA 9. NÍVEIS DE INOSITOL NO PLASMA COM DOSES CRESCENTES DE FITASE.	49
FIGURA 10. DIGESTIBILIDADE ILEAL APARENTE DA MATÉRIA SECA COM DOSES CRESCENTES DE FITASE E DOIS PH DA ÁGUA.	69
FIGURA 11. DIGESTIBILIDADE ILEAL APARENTE DO CÁLCIO COM DOSES CRESCENTES DE FITASE E DOIS PH DA ÁGUA.....	70
FIGURA 12. ENERGIA DIGESTÍVEL APARENTE COM DOSES CRESCENTES DE FITASE E DOIS PH DA ÁGUA.	70
FIGURA 13. COEFICIENTE DE METABOLIZABILIDADE APARENTE DO RESÍDUO MINERAL COM DOSES CRESCENTES DE FITASE E DOIS PH DA ÁGUA.	72

FIGURA 14. COEFICIENTE DE METABOLIZABILIDADE APARENTE DO FÓSFORO COM DOSES CRESCENTES DE FITASE E DOIS PH DA ÁGUA.....	73
FIGURA 15. ENERGIA METABOLIZÁVEL APARENTE COM DOSES CRESCENTES DE FITASE E DOIS PH DA ÁGUA.....	73

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. TEOR DE FÓSFORO (P) TOTAL E FÍTICO NA COMPOSIÇÃO DE INGREDIENTES VEGETAIS	18
TABELA 2. INGREDIENTES E NÍVEIS NUTRICIONAIS DAS DIETAS.....	43
TABELA 3. ANÁLISE DE RECUPERAÇÃO DE FITASE DAS DIETAS EXPERIMENTAIS.....	44
TABELA 4. CONSUMO DE RAÇÃO (CR), GANHO DE PESO (GP) E CONVERSÃO ALIMENTAR DE 1 A 28 DIAS.....	44
TABELA 5. COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDADE ILEAL APARENTE (%) DA MATÉRIA SECA (MS), RESÍDUO MINERAL (RM), PROTEÍNA BRUTA (PB), CÁLCIO, FÓSFORO E ENERGIA DIGESTÍVEL APARENTE (EDA) AOS 28 DIAS.....	45
TABELA 6. COEFICIENTE DE METABOLIZABILIDADE APARENTE (%) DA MATÉRIA SECA (MS), RESÍDUO MINERAL (RM), PRÓTEÍNA BRUTA (PB), CÁLCIO, FÓSFORO, SÓDIO E ENERGIA METABOLIZÁVEL APARENTE (EMA) AOS 28 DIAS DE IDADE.	46
TABELA 7. TEOR DE RESÍDUO MINERAL (RM), CÁLCIO E FÓSFORO NA TÍBIA E ÍNDICE DE SEEDOR	48
TABELA 8. CONCENTRAÇÃO DE INOSITOL NO PLASMA AOS 28 DIAS	49
TABELA 9. INGREDIENTES E NÍVEIS NUTRICIONAIS DAS DIETAS.....	66
TABELA 10. RECUPERAÇÃO DE FITASE NAS DIETAS EXPERIMENTAIS.	67
TABELA 11. CONSUMO DE RAÇÃO (CR), GANHO DE PESO (GP), CONVERSÃO ALIMENTAR (CA) E INGESTÃO DE ÁGUA (IA) DE 1 A 21 DIAS.....	67
TABELA 12. DIGESTIBILIDADE ILEAL APARENTE DO RESÍDUO MINERAL (RM), PROTEÍNA BRUTA (PB) E FÓSFORO.....	68
TABELA 13. DESDOBRAMENTO DA INTERAÇÃO - DIGESTIBILIDADE ILEAL APARENTE DA MATÉRIA SECA (MS), CÁLCIO E ENERGIA DIGESTÍVEL APARENTE.	69
TABELA 14. METABOLIZABILIDADE APARENTE DA MATÉRIA SECA (MS), PROTEÍNA BRUTA (PB) E CÁLCIO.	71

TABELA 15. DESDOBRAMENTO DA INTERAÇÃO - METABOLIZABILIDADE APARENTE DO RESÍDUO MINERAL (RM), FÓSFORO E ENERGIA METABOLIZÁVEL APARENTE (EMA).....	72
TABELA 16. TEOR DE RESÍDUO MINERAL (RM), CÁLCIO E FÓSFORO NA TÍBIA E ÍNDICE DE SEEDOR.....	74
TABELA 17. CONCENTRAÇÃO DE INOSITOL PLASMÁTICO E PH DA MOELA DE PERUS.	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

® - Registrado

°C - Graus celcius

% - Percentagem

AOAC - *Association of Official Analytical Chemists*

Ca – Cálcio

CA – Conversão alimentar

CIA – Cinzas insolúveis em ácido

CDIA – Coeficiente de digestibilidade ileal aparente

CMA – Coeficiente de metabolizabilidade aparente

CN – Controle negativo

CP – Controle positivo

CR – Consumo de ração

CV – Coeficiente de variação

EB – Energia bruta

EDA – Energia digestível aparente

EMA – Energia metabolizável aparente

Fe – Ferro

FI – Fator de indigestibilidade

FTU e FYT – Unidades de medida de atividade de fitase

g – Grama

GP – Ganho de peso

HCl – Ácido clorídrico

IA – Ingestão de água

IP⁶ – Fitato

IP⁵-IP¹ – Ésteres de fitato

IS – Índice de Seedor

Kcal – Quilocalorias

Kg – Quilogramas

KNU – Unidades de medida de atividade de amilase

l – Litro

mg - miligrama

Mg – Magnésio

mm - Milímetro

Mn – Manganês

MS – Matéria seca

Na – Sódio

NaHCO³ – Bicarbonato de sódio

NaOH – Hidróxido de sódio

NRC – *National Research Council*

P – Fósforo

PB – Proteína bruta

pKa – Constante de dissociação da molécula

PROT – Unidades de medida de atividade de protease

RM – Resíduo mineral

K – Potássio

TM – *Trademark*

UI – Unidades internacionais

Zn – Zinco

μmol – Micromol

μL - Microlitro

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO GERAL.....	16
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	EFEITOS DO FITATO	18
2.2	ENZIMA FITASE.....	21
2.3	ATIVIDADE DE FITASE E PH	24
2.4	EFEITOS DA FITASE NA DIETA DE PERUS	28
	REFERÊNCIAS	31
3.	DIFERENTES DOSES DE FITASE SOBRE O DESEMPENHO, APROVEITAMENTO DA DIETA, MINERALIZAÇÃO ÓSSEA E INOSITOL CIRCULANTE EM PERUS	36
3.1	INTRODUÇÃO.....	38
3.2	MATERIAL E MÉTODOS	40
3.3	RESULTADOS.....	44
3.4	DISCUSSÃO.....	50
3.5	CONCLUSÕES.....	54
	REFERÊNCIAS	55
4.	DIFERENTES DOSES DE FITASE E PH DE ÁGUA SOBRE DESEMPENHO, APROVEITAMENTO DA DIETA, MINERALIZAÇÃO ÓSSEA E INOSITOL CIRCULANTE EM PERUS	59
4.1	INTRODUÇÃO.....	61
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	63
4.3	RESULTADOS.....	67
4.4	DISCUSSÃO.....	76
4.5	CONCLUSÕES.....	80
	REFERÊNCIAS	81
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	85
	REFERÊNCIAS FINAIS.....	87

1. INTRODUÇÃO GERAL

Segundo dados da Associação Brasileira de Proteína Animal, em 2016 o Brasil se posicionou como o terceiro maior produtor de carne de peru no mundo, com pouco mais de 367 mil toneladas produzidas. Um valor muito abaixo quando comparado ao produzido pelos Estados Unidos e União Européia, que ocupam a primeira e segunda posição respectivamente no ranking de maiores produtores, juntos somando mais de quatro milhões de toneladas de carne de peru no mesmo ano. Contudo, de toda a produção brasileira de carne de peru, cerca de 70% é destinada para abastecimento do mercado interno, sendo o restante da produção nacional exportado, principalmente na forma de cortes e produtos industrializados, tornando o Brasil o segundo maior exportador de carne de peru no mundo, atrás apenas dos Estados Unidos.

A produção intensiva de perus é semelhante à de frangos, embora envolva uma maior complexidade nos segmentos, como por exemplo a dependência por inseminação artificial nos avozeiros e matrizeiros e a divisão da criação dos perus de corte em duas fases: fase inicial (até os 28 dias) e fase final (dos 28 dias até a idade de abate) (CASTRO et al., 2014). Cerca de dois terços do custo de produção de perus é composto pela alimentação. Perus também diferem do frango de corte em relação às exigências nutricionais, caracterizados por exigirem níveis maiores de proteína, cálcio e fósforo (SENS, 2009).

As dietas para perus no Brasil são compostas principalmente por milho e farelo de soja, e/ou alimentos alternativos, majoritariamente de origem vegetal. Estes ingredientes possuem um fator antinutricional denominado fitato, uma molécula composta por um anel de inositol ligado a 6 isômeros de fosfato que podem complexar em sua estrutura nutrientes como fósforo, cálcio e outros minerais, além de aminoácidos (COWIESON et al., 2009), indisponibilizando esses nutrientes para digestão e absorção. Em animais não-ruminantes, a produção endógena de enzimas é limitada em quantidade insuficiente para desfosforilar o fitato, ou seja, remover os grupos fosfatos da molécula e assim liberar os nutrientes complexados no trato gastrointestinal. A incapacidade de digerir completamente o fitato pode prejudicar o desempenho zootécnico e ainda aumentar a excreção de fósforo para o ambiente, contribuindo para a contaminação de solos e lençóis freáticos pela presença em demasia do mineral

em adubos orgânicos, provenientes principalmente da criação de animais monogástricos como frangos, perus e suínos (TOOR et al., 2005).

A utilização de fitase exógena na dieta de aves é uma das estratégias aplicadas para eliminar os efeitos negativos do fitato. Sua suplementação promove efeitos positivos na disponibilidade de fósforo fítico, reduzindo a necessidade de suplementação de fósforo inorgânico e consequentemente reduzindo o custo de formulação da dieta (SELLE; RAVINDRAN, 2007). Estudos recentes abordam a utilização de doses mais altas ou super-doses de fitase nas dietas de frangos e perus, afim de buscar evidências do chamado efeito “extra-fosfórico”. O efeito extra-fosfórico é respaldado no aumento significativo da taxa de degradação do fitato a ponto de aumentar a solubilidade de outros nutrientes no trato e liberar outros minerais e aminoácidos complexados além do fósforo. Uma alta dosagem visa também uma maior absorção da molécula de inositol livre resultante da completa desfosforilação do fitato, assim melhorando ainda mais o aproveitamento da dieta e aprimorando o desempenho e fortalecimento ósseo dos animais (WALK; RAMA RAO, 2020; DERSJANT-LI; KWAKERNAAK, 2019; COWIESON et al., 2017)

Um dos fatores de maior influência na interação do fitato com componentes da dieta e na atividade de fitase é o pH do trato intestinal (AMERAH et al., 2014). Na moela e proventrículo das aves, cujo pH varia de 2,5 a 5,0, a maior parte dos quelatos de fitato com outros nutrientes são solúveis (LIEBERT et al., 1993), porém o pH neutro do intestino favorece a formação destes quelatos, dificultando a ligação da fitase com o substrato. Otimizar o pH do trato é, portanto, essencial para garantir atividade ótima da fitase suplementada na dieta. Desta forma acredita-se que o pH da água fornecida as aves pode exercer influência sobre o pH do trato, justificando a necessidade de estudar a interação deste parâmetro com diferentes inclusões de fitase na dieta.

Dada a importância do presente assunto, será abordado nesta revisão a descrição da atividade enzimática da fitase, os fatores que influenciam esta atividade e os efeitos de sua suplementação sobre o desempenho e aproveitamento da dieta de perus de corte.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 EFEITOS DO FITATO

O mineral fósforo, além de ser um componente estrutural das membranas celulares, tem participação essencial em diversos processos fisiológicos, tais como a formação do tecido muscular, absorção de nutrientes, ativação de processos enzimáticos, manutenção osmótica e balanço ácido-básico, formação da molécula de adenosina-trifosfato, além de ser primordial para formação de colágeno e mineralização do sistema esquelético. Trata-se portanto de um dos nutrientes de maior importância considerando a exigência do animal e de maior custo na formulação de dietas para aves (OLIVEIRA, 2016).

A fonte do fósforo utilizado na dieta é um fator definitivo da biodisponibilidade e aproveitamento do mineral. O fósforo originado de fontes inorgânicas, tais como mono, di ou trifosfatos, ou então proveniente das farinhas de origem animal apresenta uma biodisponibilidade considerada próxima ao 100% (SCOTTÁ et al., 2014). Contudo, em ingredientes de origem vegetal, que compõem a maioria das dietas brasileiras para frangos e perus, principalmente milho e farelo de soja, a maior parte do fósforo está presente na forma de fósforo fítico (Tabela 1), parcialmente indisponível para o animal. Esta denominação é dada ao fósforo quando encontra-se complexado ao inositol, formando o ácido fítico, também chamado de fitato quando na forma de sal, uma molécula formada por seis grupos de fosfato ligados negativamente a 12 átomos de hidrogênio em um anel de inositol (mio-inositol-1,2,3,4,5,6-hexafosfato; IP_6) (SELLE; RAVINDRAN, 2007).

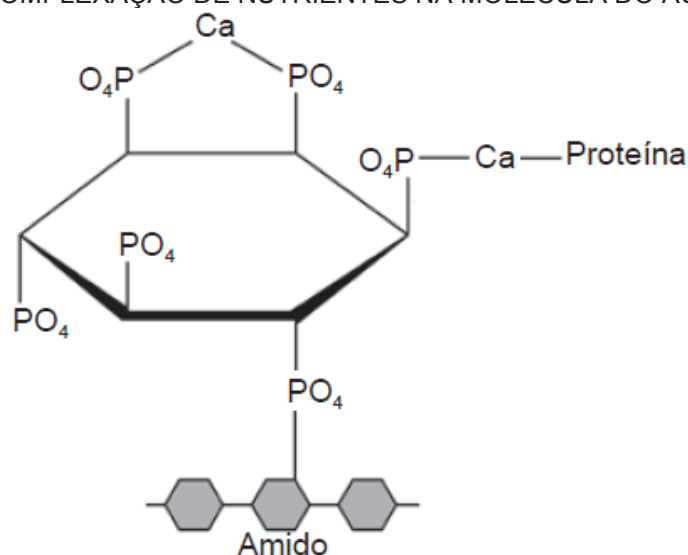
TABELA 1. TEOR DE FÓSFORO (P) TOTAL E FÍTICO NA COMPOSIÇÃO DE INGREDIENTES VEGETAIS

Ingredientes	P total (%)	P fítico (%)	P fítico/ P total (%)
Milho	0,28	0,20	71,4
Trigo	0,37	0,24	64,9
Farelo de Arroz	1,50	1,28	85,3
Aveia	0,27	0,22	81,5
Farelo de Soja	0,65	0,38	58,5
Farelo de Algodão	0,97	0,75	77,3
Farelo de Canola	1,07	0,65	60,7
Farelo de Amendoim	0,63	0,50	79,4

FONTE: Adaptado de NRC (1994).

A função do fitato presente nos cereais e sementes, que representa até 80% do total de fósforo, está relacionado com sinalizações transmembranas e mobilização de minerais para formar reservas intercelulares, sendo a principal fonte de energia e fósforo durante a germinação (LEI; PORRES, 2003). Pelo fato de ser uma molécula polianiônica, ou seja, estar negativamente carregado, pode facilitar a formação sais insolúveis com cátions, notadamente com minerais Ca^+ , K^+ , Mg^{++} , Zn^+ , Fe^+ , e Mn^{++} (LIU et al., 2005). Além disso, o fitato também pode formar associações químicas com polissacarídeos, proteínas e aminoácidos da dieta (FEBLES et al., 2002), conforme ilustrado na Figura 1. O fitato é, portanto, considerado um fator antinutricional na alimentação de animais monogástricos, e estima-se que, de uma maneira geral, as dietas das aves de produção contenham de 2,5 a 4,0 g/kg de P-fítico (SELLE; RAVINDRAN, 2006).

FIGURA 1. COMPLEXAÇÃO DE NUTRIENTES NA MOLÉCULA DO ÁCIDO FÍTICO.



FONTE: Adaptado de Romano e Russo (2008).

O fitato interage com componentes da dieta no trato digestório do animal, sendo estas interações influenciadas principalmente pelo pH do trato e ligações com outros minerais como por exemplo o cálcio (AMERAH et al., 2014). A afinidade da molécula de fitato por cátions está diretamente ligada ao pH do trato gastrointestinal e a constante de dissociação da molécula (pK_a) (SANTOS, 2012), sendo que em pH menor que 3,5 os quelatos de fitato com minerais estão levemente carregados negativamente e, portanto, são mais solúveis. Porém no pH neutro/alcalino do intestino das aves, o fitato está mais fortemente carregado

negativamente, resultando em aumento da afinidade da molécula por cátions, e assim favorecendo a formação dos quelatos (SHANMUGAN, 2018). Consequentemente estes quelatos diminuem a disponibilidade de fósforo e outros nutrientes complexados na molécula, e reduzem a solubilidade de outros nutrientes no trato gastrointestinal, assim aumentando a excreção de minerais e aminoácidos (COWIESON et al., 2017).

Ainda, quando na presença de Ca em alta quantidade, o mineral reage com o fitato formando um complexo de fitato+Ca que inibe a ação de enzimas sobre a molécula (McKNIGHT, 1997), sendo que a reação é acentuada em pH relativamente neutro. Além disso, as proteínas apresentam interação eletrostática com o fitato, fazendo com que estes nutrientes percam água ao seu redor, prejudicando sua solubilidade e digestibilidade (COWIESON; COWIESON, 2011).

Para que os nutrientes ligados ao fitato se tornem disponíveis e sejam absorvidos, o anel de mio-inositol deve ser primeiramente quebrado no trato digestório, liberando os grupos fosfatos pela ação de enzimas fitases ou outras fosfatases. Em animais ruminantes, esta quebra é realizada pelas bactérias ruminais, liberando o fósforo durante o processo de fermentação ruminal para posterior absorção (SANTOS, 2012). Contudo, em animais monogástricos, a exemplo de suínos e aves, a produção endógena destas enzimas se dá em quantidade insuficiente para realizar a hidrólise do fitato de maneira eficiente, limitando assim o aproveitamento da dieta (INGELMANN et al. 2018).

Devido à baixa disponibilidade de fósforo fítico na dieta das aves, relacionado com a baixa produção de fitase e fosfatase endógenas, usualmente são utilizadas fontes de fósforo inorgânico nas dietas, como por exemplo fosfatos de rocha, o que gera aumento dos custos de produção e de excreção do mineral (DERSJANT-LI; KWAKERNAAK, 2019). Entretanto, estima-se que até 2050 as fontes baratas de fosfato mineral sejam esgotadas (KUMAR et al., 2016). Além do mais, a utilização de excretas demasiadamente ricas em fósforo, para fins de adubação em lavouras e pastagens, é um dos maiores contribuintes para contaminação do solo e lençóis freáticos, relacionado a ocorrência de eutrofização e nitrificação, principalmente em áreas de concentrada produção de animais monogástricos (TOOR et al., 2005).

A presença de fitato no trato das aves também induz um excesso de HCl no lúmen intestinal, uma reação do organismo que visa compensar a reduzida digestibilidade proteica (COWIESON et al., 2004), porém gerando maior irritação da mucosa intestinal. Devido a irritação da mucosa, há aumento na produção de mucina no trato, conforme observado por Onyango et al. (2009), consequentemente levando a perda de aminoácidos endógenos. Além disso, Allen e Flemstron (2005) observaram maior transferência de NaHCO_3 para o lúmen, como forma de neutralizar o excesso de HCl, e neste caso causando um aumento na excreção de sódio.

2.2 ENZIMA FITASE

A utilização de fitase exógena na alimentação de animais não-ruminantes é uma prática comum. A fitase é uma enzima que age sobre a molécula de ácido fítico presente nos alimentos, catalisando sua degradação para liberar os nutrientes complexados na estrutura do IP_6 para absorção. A quebra do ácido fítico disponibiliza principalmente fósforo, cálcio e microminerais, além de outros nutrientes tais como proteínas e aminoácidos, carreando diversos outros efeitos benéficos provenientes da eliminação do fitato no trato do animal.

As fitases são essencialmente divididas em dois grandes grupos, de acordo com o local onde iniciam a reação na molécula do fitato, que é estabelecido pela posição do carbono no anel de mio-inositol. As chamadas 3-fitases, de origem microbiana, iniciam a hidrólise na posição C_3 , ou terceiro carbono, enquanto as 6-fitases, derivadas de plantas, iniciam na posição C_6 , ou sexto carbono (BEDFORD; PARTRIDGE, 2010).

A reação promovida pela fitase é a de desfosforilação da molécula de mioinositol-1,2,3,4,5,6-hexaquisfosfato, caracterizada pela remoção um a um dos grupos fosfatos ligados ao anel de mio-inositol. O caminho de degradação completa do ácido fítico, conforme definido por Dasgupta et al. (1996), é $\text{IP}_6 \rightarrow \text{IP}_5 \rightarrow \text{IP}_4 \rightarrow \text{IP}_3 \rightarrow \text{IP}_2 \rightarrow \text{IP}_1 \rightarrow$ inositol livre, assim gerando como produto final inositol e seis porções de fósforo. Após a hidrólise, os nutrientes ligados aos fosfatos são disponibilizados para absorção no trato do animal. Contudo, a hidrólise pode não ser completa, e dependendo do grau de desfosforilação do

ácido fítico, ou da quantidade de grupos fosfatos removidos, são gerados os ésteres intermediários, que variam de IP₅ a IP₁ (CORADI, 2017).

Apesar de não existir uma unidade internacional padrão para medição da atividade de fitase, Engelen et al. (1994) definiu a atividade de fitase em unidades de fitase (FTU), sendo que um FTU é a quantidade de enzima que libera 1 μ mol de ortofosfato inorgânico/min a partir de um fitato de Na de 0,0051 mol L⁻¹ em pH 5,5 e a temperatura de 37°C. Outras abreviações para unidade de fitase incluem FTY e U, adotadas para diferentes fitases comerciais, porém estabelecidas nos mesmos parâmetros.

A fitase está presente naturalmente em plantas, microorganismos e também na mucosa intestinal e na microbiota do trato digestivo das aves, embora em quantidade insuficiente para a quebra eficaz do fitato da dieta (INGELMANN et al., 2018). No milho e farelo de soja, os ingredientes vegetais mais utilizados na formulação de dietas para aves, a presença de fitase no grão é quase nula, porém outros alimentos como trigo, cevada e farelo de arroz são mais ricos em fitase, embora também contenham muito mais P fítico (LOTT et al., 2002).

A comercialização de fitase exógena teve início nos anos 90, em resposta a uma nova legislação holandesa que limitava a poluição ambiental por P (SELLE; RAVINDRAN, 2007). A maioria das fitases comercializadas para suplementação em dietas animais são provenientes de micro-organismos como fungos, leveduras, bactérias e protozoários, os quais produzem a enzima para aproveitar o fósforo proveniente do solo e da decomposição de plantas (CORADI, 2017). Por conta disso, um dos meios mais utilizados para obtenção de fitases é por controle de processos fermentativos para replicar a enzima em alta escala, realizados em meio líquido ou sólido (KUMAR et al., 2016).

Fungos do gênero *Aspergillus* são os micro-organismos mais utilizados na produção de fitases, sendo comuns também fitases de origem bacteriana, por exemplo dos gêneros *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Streptomyces*, e de leveduras (*Saccharomyces*, *Schawnniomyces*) (SINGH, 2008). Comumente são utilizadas no mercado enzimas derivadas de *A. niger*, uma 3-fitase, e de *P. lycii* e *E. coli*, que são 6-fitases (SELLE; RAVINDRAN, 2007).

A fermentação para produção da fitase pode ser realizada de duas formas (SINGHANIA et al., 2010): Fermentação submersa (FS), quando o microrganismo é mantido em meio aquoso composto por 95% de água;

Fermentação em estado sólido (FES), onde o micro-organismo cresce em uma superfície sólida na qual a água está adsorvida.

Industrialmente, o processo mais aplicado para obtenção de fitases é por FS, pois tem como vantagem a maior facilidade no controle de fatores como temperatura, pH, aeração, entre outros, permitindo uma produção em larga escala (YU; CHEN, 2013; SINGHANIA et al., 2010). Todavia, a FS pode apresentar baixo rendimento, alta geração de resíduos e problemas de contaminação relacionadas a alta atividade de água (A_w) (YU; CHEN, 2013).

A produção de fitases por FES apresenta maior rendimento, menor gasto energético e menor produção de resíduos, possibilitando a obtenção de um produto mais concentrado (CORADI, 2017). Em contrapartida, diferente da FS, o controle de parâmetros do processo tais como temperatura, pH e oxigenação é mais dificultoso (YU; CHEN, 2013).

A fitase é amplamente utilizada na alimentação de animais monogástricos, principalmente aves e suínos, para diminuir o efeito danoso do fitato sobre o aproveitamento da dieta, melhorando digestibilidade e absorção de diversos nutrientes e possibilitando a menor inclusão de fontes inorgânicas de P sem deixar de suprir o requerimento pelo mineral. Dersjant-Li e Kwakernaak (2019) comprovaram em seus estudos que a adição de fitase na dieta de frangos contribuiu para uma melhora muito mais significativa da conversão alimentar em comparação a dietas suplementadas somente com fosfato. Os resultados foram atribuídos a uma melhora na digestibilidade de aminoácidos e de sódio com inclusão de fitase, o que não ocorreu nas dietas sem enzima.

Em estudos mais recentes, buscaram-se evidências do chamado efeito extra-fosfórico que pode ser ocasionado pela suplementação de altas doses de fitase na dieta, além do nível padrão atualmente empregado pela maioria das empresas e formuladores. Uma dose alta, também chamada de super-dose ou super-dosagem pode ser estabelecida como sendo acima de 1500 FTU/kg (BONEY; MORITZ, 2017). Apesar dos meios de ação de uma super-dose de fitase ainda não serem muito bem conhecidos, o conceito da prática de super-dosagem baseia-se em potencializar a quebra do ácido fítico a ponto de promover a liberação de outros nutrientes além do fósforo, aumentando também o aproveitamento de proteína, aminoácidos e energia da dieta e a absorção de

inositol, por isso denominado efeito extra-fosfórico (DERSJANT-LI; KWAKERNAAK, 2019; COWIESON et al., 2017).

Os benefícios da super-dosagem de fitase têm sido apontados em trabalhos com frangos de corte (WALK; RAMA RAO, 2020; WALK; OLUKOSI, 2019; SOMMERFELD et al., 2018; BEESON et al., 2017; COWIESON et al., 2017; BONEY; MORITZ, 2016; WALK et al., 2013) e eventualmente com perus (PIRGOZLIEV et al., 2011; PIRGOZLIEV et al., 2007). Algumas investigações buscam caracterizar principalmente a intensidade de degradação do fitato com uso de doses altas de fitase (WALK; OLUKOSI, 2019; SOMMERFELD et al., 2018; BEESON et al., 2017), observada por meio da redução de IP6 no trato e aumento de inositol circulante, produto oriundo da desfosforilação completa do ácido fítico. Segundo revisão feita por Gonzalez-Uarquin et al. (2020), a função da molécula de inositol no organismo animal está ligada a vários processos metabólicos e regulatórios, a exemplo de efeitos no metabolismo da glicose e captação de glicose nos músculos, agindo como um mimético de insulina; efeitos antioxidantes; relações com o metabolismo de lipídeos; absorção óssea de minerais; ação osmótica em tecidos específicos, como cerebral e renal; entre outras funções. O aumento da absorção de inositol no trato é, portanto um dos intuitos da suplementação de super-dosagens de fitase.

Quanto maior a concentração de fitato na dieta, mais acentuados são os efeitos antinutricionais, e maiores devem ser as doses suplementadas de fitase para contrapor estes efeitos, dependendo do índice zootécnico que se busca otimizar. Em um trabalho recente, Walk e Rama Rao (2020) avaliaram os efeitos de 3 níveis de P fítico na dieta de frangos (0,24; 0,345; 0,45%) com 4 doses de fitase (0, 500, 1000 e 2000 FTU/kg). O máximo ganho de peso foi obtido com 1285 FTU/kg e 0,29% de P fítico, enquanto para conversão alimentar não foi possível chegar ao menor valor mesmo com uma maior dose que 2000 FTU/kg, demonstrando a possibilidade de se utilizar super-doses de fitase para otimizar desempenho das aves.

2.3 ATIVIDADE DE FITASE E PH

Diferentes categorias de fitase são influenciadas de maneira distinta por fatores tais como pH do trato, estabilidade térmica, resistência a proteases

endógenas e concentrações de cálcio e fósforo na dieta, e a eficácia da enzima depende também da sua capacidade em manter a atividade em diferentes condições (OLIVEIRA, 2016). De acordo com Coradi (2017), para realizar a hidrólise do fitato durante a digestão, a fitase deve ser resistente ao ambiente estomacal ácido e às proteases digestivas.

O pH do trato gastrointestinal das aves é um dos fatores de maior influência direta no grau de degradação do fitato e no nível de atividade da fitase. A deprotonação do fitato é otimizada em pH ácido, porém quando em meio a um pH mais neutro, pode levar a formação de complexos da molécula com cátions, principalmente Ca (AMERAH et al., 2014; SHANMUGAN, 2018).

O papo, proventrículo e moela das aves, que compreendem a porção superior do trato gastrointestinal das aves, caracterizam-se por apresentarem um pH mais ácido, variando de 2,5 a 5,0. Uma vez que nesta região do trato, os quelatos de fitato são mais susceptíveis a desfosforilação (LIEBERT et al., 1993), a atividade enzimática da fitase neste local deve ser potencializada.

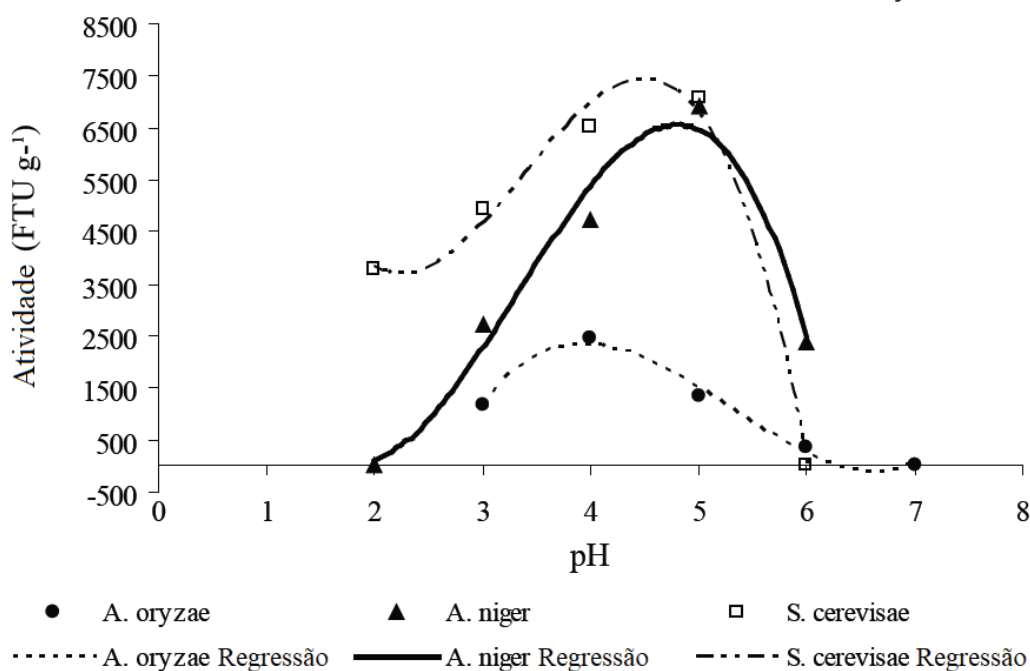
A medição da atividade de fitase é feita utilizando-se um pH padronizado de 5,5, definido como o valor de pH onde a atividade da enzima é 100%. Um teste *in vitro* feito por Naves et al. (2012) comparou a atividade de fitases de origem fúngica conforme a variação de pH do meio, demonstrando que a faixa de pH ótimo variou de 3,0 a 5,0 (Figura 2). Outro estudo, por Tran et al. (2011) comparou a atividade de quatro fitases comerciais de diferentes origens (*E. coli*, *A. niger* e *P. lycii*), relatando maior atividade enzimática em um nível de pH entre 2,0-5,0 para as fitases de *E. coli* e *A. niger* e de 4,0-5,0 para *P. lycii*.

A origem da fitase e o meio de produção são portanto determinantes da faixa de pH ótimo da enzima. Algumas fitases, a exemplo das provenientes de bactérias *Bacillus*, bem como de plantas dos gêneros *Typha* e *Lilium* são pertencentes ao grupo das alcalinas, cujo pH ótimo de atividade pode variar de 6,5 a 8,0 (IDRISS et al., 2002). A maioria das fitases comerciais, entretanto, provenientes principalmente de *Aspergillus* e *E. coli* são fitases ácidas.

Entretanto, mesmo entre fitases ácidas, são notáveis as diferenças entre os perfis de pH ótimo. Applegate et al. (2003) explicam que uma fitase originada de *E. coli* pode apresentar uma atividade 25% maior em pH 2,5, porém 35% menor em pH 5,5 comparada a uma derivada de *Aspergillus*. Comumente a formulação de dietas com fitase baseia-se na quantidade de P liberado em pH

5,5, porém se as enzimas são ativas em pH 2,5, a atividade enzimática na região gástrica será diferente entre ambas as fitases, mesmo com uma mesma inclusão na dieta. O exemplo dado pelos autores é que, ao incluir 500 FTU/kg na dieta, em pH 2,5 a atividade de uma fitase *E. coli* seria de 770 FTU/kg, o dobro se comparada a 335 FTU/kg da derivada de *Aspergillus*.

FIGURA 2. ATIVIDADE DE FITASES DE DIFERENTES ORIGENS EM FUNÇÃO DO PH.



FONTE: Adaptado de Naves et al. (2012)

Yu et al. (2012) demonstraram em seus estudos que a capacidade de ligação do IP₆ a proteínas vindas da dieta é maior comparada a seus respectivos ésteres (IP₅-IP₁), resultantes do processo de desfosforilação. A ligação do fitato ao Ca também depende da composição de ésteres presentes no trato, sendo que IP₃, por exemplo, apresenta cerca de 11% da capacidade de ligação ao Ca em comparação a IP₆ (ADEOLA; COWIESON, 2011). Os isômeros IP₁₋₄ apresentam baixa capacidade de se ligar a proteínas e minerais, ou seja, os produtos intermediários e finais resultantes da desfosforilação do fitato são menos efetivos em formar complexos com nutrientes. Relacionando esta característica com a atividade de fitase em diferentes pH, Dersjant-Li et al. (2015) realça a importância de hidrolisar o fitato o mais rápido e completamente possível na porção superior do trato, cujo pH mais ácido otimiza a eficácia da enzima. Dessa maneira, a extração da maior quantidade possível de IP₆ e IP₅ no

proventrículo e moela ajuda a reduzir o efeito antinutricional do fitato antes que chegue ao intestino, onde o ambiente de pH mais neutro favorece a formação de quelatos e prejudica a quebra da molécula.

Em vista da ação que o pH exerce sobre a atividade de fitase no trato das aves, concerne a este trabalho argumentar a respeito da influência do pH da água sobre esta característica. Antes de tudo, é evidente que a importância da água na nutrição das aves se relaciona ao fato da ingestão de água estar diretamente ligado ao consumo de ração. A elevação do pH, tornando a água alcalina ou alcalinizada, pode reduzir sua ingestão devido ao sabor amargo indesejável para as aves (WATKINS, 2008). O mesmo efeito inóspito no sabor da água também pode ser causado pela sua acidificação excessiva, deprimindo a ingestão (AÇIKGÖZ et al. (2011). As recomendações de pH da água para frangos, por exemplo, são de 6 a 6,5, embora há evidências de que podem tolerar um pH variando de 4 a 8 sem impactar a ingestão (WATKINS, 2008). Para perus, o pH recomendado pela Aviagen™ (2016) é de 5 a 8, sendo que valores abaixo de 5 podem levar a corrosão dos equipamentos bebedouros e valores acima de 8 prejudicam a eficácia de produtos desinfetantes utilizados na água.

A acidificação da água é prática comum na avicultura. O uso de ácidos orgânicos como alternativa aos antibióticos visa reduzir o pH da água, atuando como regulador da microbiota e diminuindo o nível de patógenos tanto na água quanto na moela e proventrículo das aves, assim melhorando desempenho (PHILIPSEN, 2006).

Estudos relatam melhoras no desempenho e digestibilidade de nutrientes advindas da acidificação da água com uso de ácidos orgânicos, principalmente por meio da melhor utilização de nutrientes decorrente da eliminação de patógenos e de benefícios à composição e atividade da microbiota intestinal (YANG et al., 2009; HAMID et al., 2018). Açıkgöz et al. (2011), por outro lado, não encontrou efeitos benéficos da água acidificada sobre desempenho, microbiota intestinal ou contaminação de carcaças de frangos. Os autores atrelam este resultado ao tipo e concentração do ácido orgânico utilizado, embora os animais tenham consumido água acidificada apenas durante um período de 8 horas pré-abate, diferente de outros estudos onde a suplementação de água acidificada foi contínua durante todo o período experimental. Em relação aos efeitos de água acidificada para perus, um experimento com peruas

poedeiras também não relatou diferenças no desempenho das aves ingerindo água com pH 4, 6 e 8 (CORNELISON et al., 2005).

Em relação a oferta de água alcalinizada ou ionizada para aves, os estudos são poucos. Uma revisão feita por El-Sabrout e El-Hanoun (2019) sintetiza os efeitos de água ionizada ou magneticamente tratada sobre desempenho de frangos e produção de ovos em poedeiras. Os autores descrevem que o processo de magnetização da água, que causa a alcalinização, também melhora sua dureza, sanitização e aumenta o número de sólidos dissolvidos, assim trazendo uma série de benefícios para as aves. No entanto, não há relatos envolvendo água com pH elevados para perus.

Estudos demonstram que a alteração do pH da água, mais extensivamente da acidificação, pode modificar o pH de diferentes partes do trato gastrointestinal das aves. Apesar de haverem relatos de não alteração no pH da moela de frangos e perus após ingestão de água acidificada (WATKINS et al., 2004), outras pesquisas indicam uma redução no pH do papo, proventrículo e íleo (HAMID et al. 2018) ou mesmo em todos os segmentos do trato (PESTI et al., 2004) advinda da ingestão de água acidificada. Neste caso pode-se supor que há influência do pH da água sobre enzimas cuja atividade é dependente do pH do trato para ótima funcionalidade, tais como a fitase.

2.4 EFEITOS DA FITASE NA DIETA DE PERUS

Assim como outras aves, os perus aproveitam o fósforo da dieta de maneira restrita devido a presença do ácido fítico. Além disto, existem diferenças substanciais quanto a utilização de fósforo dietético entre diferentes espécies de aves domésticas, sendo o peru a ave que apresenta menor taxa de utilização de fósforo da dieta em comparação a frangos, patos e codornas, conforme evidencia em trabalho de Rodehutsord e Dieckmann (2005). Neste estudo, os autores avaliaram a utilização de P em diferentes espécies de aves alimentadas com dietas basais sem suplementação de P por outras fontes, constatando que as taxas de utilização foram de 58% para frangos, 55% para codornas, 46% para patos e 39% para perus. As hipóteses levantadas acerca destas taxas são: potenciais diferenças na excreção de P, dada uma certa ingestão de P; Diferenças na taxa de passagem do alimento; Diferenças na habilidade de

hidrolisar o fitato, sendo este fator ligado, por sua vez, a diferenças no pH do trato e na atividade de fitases endógenas. Frente a este menor aproveitamento de P fítico, reforça-se a ideia de que a suplementação com fitase nas dietas para perus deve ser considerada de maneira singular.

Apesar dos estudos envolvendo utilização de fitase para perus serem mais escassos em comparação com frangos, existem relatos sobre os efeitos positivos da suplementação enzimática em vários aspectos da produção.

Atia et al. (2000) avaliaram o desempenho de perus alimentados com dietas contendo diferentes níveis de fósforo não-fítico, baseado nas recomendações do NRC (1994), com ou sem suplementação de fitase. Quando alimentados com apenas 30% do nível de fósforo recomendado pelo NRC (1994), porém com inclusão de 500 FTU/kg de fitase, os perus apresentaram desempenho similar aos que ingeriram dietas de alto fósforo não-fítico sem fitase. Os resultados demonstraram que a enzima possibilitou a redução dos níveis de fósforo da dieta sem prejudicar o desempenho dos animais.

Resultados positivos para utilização de fósforo e mineralização óssea foram observados em perus alimentados com fitases de diferentes origens por Applegate et al. (2003). Uma suplementação de 500 FTU/kg de fitase originada de *E. coli* melhorou a retenção de fósforo em até 10% e aumentou o peso e porcentagem de cinzas nas tíbias quando comparada a uma dieta sem enzima, e de forma mais efetiva comparada a fitases derivadas de *Aspergillus* e *Peniophora* devido a características intrínsecas das enzimas.

Em um estudo com fitases bacterianas oriundas de *E. coli*, Kozlowski et al. (2010) avaliaram o desempenho, mineralização óssea e digestibilidade de nutrientes em perus alimentados com diferentes inclusões da enzima em uma dieta de baixo cálcio e fósforo, comparativamente a uma dieta sem suplementação e com níveis padrões de cálcio e fósforo. Perus suplementados com 500 FTU/kg e 1000 FTU/kg de fitase obtiveram desempenho semelhante ao controle positivo, além de obterem os melhores resultados de conversão alimentar no período. A inclusão de fitase na maior dose, de 1000 FTU/kg, melhorou a digestibilidade de cálcio e fósforo, por conseguinte resultando em maior conteúdo de cinzas e fósforo absorvido nos ossos. O estudo sugere que os perus podem responder a doses superiores a 1000 FTU/kg na dieta.

Os efeitos resultantes de doses mais altas de fitase na dieta de perus foram evidenciados por algumas pesquisas. Pirgozliev et al. (2007) compararam o efeito de diferentes doses de fitase (250, 500 e 2500 FTU) em dietas de baixo cálcio e fósforo entre frangos e perus. O efeito da inclusão de fitase sobre o desempenho dos animais foi linear e positivo, com um aumento médio entre ambas espécies de 17% e 19% para consumo de ração e ganho de peso respectivamente. Também foram observados resultados positivos para digestibilidade de MS e EMA com a inclusão de alta dose de fitase para ambas espécies. Salienta-se que o aumento no ganho de peso foi maior em perus (13,2%) do que em frangos (10,2%), assim como o aumento na EMA (5,7% em perus contra 1,4% em frangos). Os autores concluem que frangos e perus podem responder a concentrações de fitase maiores que 2500 FTU/kg, porém de maneira diferente, destacando ainda que a enzima aumentou a eficiência alimentar dos perus em 7,6%, o que não foi observado para frangos.

Em uma continuação do estudo descrito acima, Pirgozliev et al. (2011) também verificaram efeitos lineares no aumento de digestibilidade de diversos aminoácidos e na redução de excreção de mucina, medida na forma de ácido siálico. Neste caso a menor excreção de mucina é reflexo de menos irritação da mucosa do intestino, que é provocada pela ação antinutricional do ácido fítico e contraposta pela fitase (ONYANGO et al., 2009).

Wealleans et al. (2016) testaram doses de fitase variando de 345 a 1380 FTU/kg com níveis de inclusão de P inorgânico variando de 0,6 a 1,8 g/kg. A dose ótima foi determinada como sendo o ponto onde o valor do incremento de P fosse igual ao custo de adição da enzima na dieta, considerando que a disponibilização de P proporcionada pela fitase fosse semelhante a proporcionada por fontes inorgânicas. Sob diferentes condições de custo, tanto da enzima quanto do fosfato, a dose que garantiu melhor ganho de peso e digestibilidade de P encontrada pelos autores variou entre 762 a 1231 FTU/kg. Neste caso enfatiza-se que a formulação com fitase para perus, assim como para outros animais monogástricos, deve determinar o quanto do custo de adição da enzima é recuperado por meio da retirada de fontes inorgânicas, garantindo o requerimento do animal por P. Todavia, é preciso também levar em conta o valor envolvido nos efeitos extra-fosfóricos da enzima, tais como melhora no aproveitamento de proteína, aminoácidos e energia.

REFERÊNCIAS

- ABPA. **Relatório Anual 2017**. São Paulo. Disponível em: <<http://abpabr.com.br/storage/files/relatorio-anual-2017.pdf>>. Acesso em 04 nov. 2019.
- AÇIKGÖZ, Z.; BAYRAKTAR, H.; ALTAN, Ö. Effects of formic acid administration in the drinking water on performance, intestinal microflora and carcass contamination in male broilers under high ambient temperature. **Asian-Aust. J. Anim. Sci.**, v. 24, n. 1, p. 96-102, 2011.
- ADEOLA, O.; COWIESON, A. J. Board-invited review: opportunities and challenges in using exogenous enzymes to improve nonruminant animal production. **J. Anim. Sci.**, v. 89, p. 3189–3218, 2011.
- ALLEN, A.; FLEMSTRON, G. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. **Amer. J. Physiol.**, v. 288, p. 1-19, 2005.
- AMERAH, A. M.; PLUMSTEAD, P. W.; BARNARD, L. P.; KUMAR, A. Effect of calcium level and phytase addition on ileal phytate degradation and amino acid digestibility of broilers fed corn-based diets¹. **Poult. Sci.**, v. 93, n. 4, p. 906–915, 2014.
- AOAC International. Official and tentative methods of analysis. 16th ed. Arlington, Virginia, 1995.
- APPLEGATE, T. J.; WEBEL, D. M.; LEI, X. G. Efficacy of a phytase derived from escherichia coli and expressed in yeast on phosphorus utilization and bone mineralization in turkey poults. **Poult. Sci.**, v. 82, p. 1726-1732, 2003.
- ATIA, F. A.; WAIBEL, P. E.; HERMES, I.; CARLSON, C. W.; WALSER, M. M. Effect of dietary phosphorus, calcium, and phytase on performance of growing turkeys. **Poult. Sci.**, v. 79, p. 231-239, 2000.
- AVIAGEN. **Water quality guidelines for turkeys**. West Virginia, 2016. Disponível em: <<https://www.aviagenturkeys.us/>>. Acesso em: 16/12/2019.
- BEDFORD, M. R.; PARTRIDGE, G. G. Enzymes in farm animal nutrition. 2nd ed., 2010, MPG Books Group, Bodmin, UK.
- BEESEON, L. A.; WALK, C. L.; BEDFORD, M. R.; OLUKOSI, O. A. Hydrolysis of phytate to its lower esters can influence the growth performance and nutrient utilization of broilers with regular or super doses of phytase. **Poult. Sci.**, p. 1-11, 2017.
- BONEY, J. W.; MORITZ, J. S. Phytase dose effects in practically formulated diets that vary in ingredient composition on feed manufacturing and broiler performance. **J. Appl. Poult. Res.**, p. 1-13, 2016.
- CASTRO, C. M.; GEWEHR, C. E.; REGINATTO, M. F. Rendimento de carcaça e cortes de perus comerciais submetidos a diferentes manejos de alimentação.

Archives of Veterinary Science, v. 19, n. 4, p. 51–56, 2014.

CORADI, G. V. **Produção, purificação e caracterização de fitases microbianas e potencial de produção de mioinositóis**. 2017. 207 f. Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Campinas, 2017.

CORNELISON, J.; WILSON, M.; WATKINS, S. Effects of water acidification on turkey performance. **Avian. Adv.**, v. 7, p. 1–3, 2005.

COWIESON, A. J.; ACAMOVIC, T.; BEDFORD, M. R. The effects of phytase and phytic acid on the loss of endogenous amino acids and minerals from broiler chickens. **Brist. Poult. Scie.**, v. 45, n. 1, p. 101-108, 2004.

COWIESON, A. J.; COWIESON, N. P. Phytate and the thermodynamics of water. **Austral. Poult. Symp.** 2011.

COWIESON, A. J.; BEDFORD, M. R.; SELLE, P. H.; RAVINDRAN, V. Phytate and microbial phytase: Implications for endogenous nitrogen losses and nutrient availability. **World's Poult. Sci. J.**, v. 65, n. 3, p. 401–418, 2009.

COWIESON, A. J.; RUCKEBUSH, J. P.; SORBARA, J. O. B.; WILSON, J. W.; GUGGENBUHL, P.; TANADINI, L.; ROOS, F. F. A systematic view on the effect of microbial phytase on ileal amino acid digestibility in broilers. **Anim. Feed Sci. Technol.**, v. 231, p. 138–149, 2017.

DERSJANT-LI, Y.; AWATI, A.; SCHULZE, H.; PARTRIDGE, G. Phytase in non-ruminant animal nutrition: a critical review on phytase activities in the gastrointestinal tract and influencing factors. **J. Sci. Food Agric.**, v. 95, p. 878-896, 2015.

DERSJANT-LI, Y.; KWAKERNAAK, C. Comparative effects of two phytases versus increasing the inorganic phosphorus content of the diet, on nutrient and amino acid digestibility in boilers. **Anim. Feed Sci. Technol.**, v. 253, p. 166–180, 2019.

EL-SABROUT, K.; EL-HANOUN, A. Does magnetised drinking water influence poultry's health and production?. **World's Poult. Sci. J.**, v. 75, p. 411-416, 2019.

ENGELN, A.J.; VAN DER HEEH, F.C.; RANDSDORP, P.G.H. et al. Simple and rapid determination of phytase activity. **Journal of AOAC International**, v.77, p.760-764, 1994.

FEBLES, C. I.; ARIAS, A.; HARDISON, A.; RODRÍGUEZ-ALVAREZ C.; SIERRA, A. Phytic acid level in wheat flours. **Journal of Cer. Scien**, v. 36, n. 1, p. 19-23, 2002.

GONZALEZ-UARQUIN, F.; RODEHUTSCORD, M.; HUBER, K. Myo-inositol: its metabolism and potential implications for poultry nutrition – a review. **Poult. Sci.**, v. 99, p. 893-905, 2020.

HAMID, H.; SHI, H. Q.; MA, G. Y.; FAN, Y.; LI, W. X.; ZHAO, L. H.; ZHANG, J. Y.; JI, C.; MA, Q. G. Influence of acidified drinking water on growth performance and gastrointestinal function of broilers. **Poult. Sci.**, v. 97, p. 3601-3609, 2018.

IDRISS, E. E.; MAKAREWICZ, O.; FAROUK, A.; ROSNER, K.; GREINER, R.; BOCHOW, H.; RICHTER, T.; BORRIS, R. Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant growth-promoting effect. **Microbiology**, v. 148, p. 2097–2109, 2002.

KOZLOWSKI, K.; JANKOWSKI, J.; JEROCH, H. Efficacy of escherichia coli - derived phytase on performance , bone mineralization and nutrient digestibility in meat-type turkeys. **Veterinarija Ir Zootechnika**, v. 52, n. 74, 2010.

KUMAR, A.; CHANDERMAN, A.; MAKOLOMAKWA, M.; PERUMAL, K.; SINGH, S. Microbial production of phytases for combating environmental phosphate pollution and other diverse applications. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 46, n. 6, p. 556-591, 2016.

LEI, X. G.; PORRES, J. M. Phytase enzymology, applications, and biotechnology. **Biotechnology Letters**, v. 25, p.1787–1794, 2003.

LIEBERT, F.; WECKE, C.; SCHONER, F. J. Phytase activities in different gut contents of chickens are dependent on level of phosphorus and phytase supplementations. In: Wenk C, Boessinger M, editor. Proceedings... **1st European Symposium Enzymes in Animal Nutrition**; 1993; Karthause Ittingen, Switzerland; p.202-205, 1993.

LIU, Z.; CHENG, F.; ZHANG, G. Grain phytic acid content in japonica rice as affected by cultivar end environment and its relation to protein content. **Food Chemistry**, v. 89, n. 1, p. 49-52, 2005.

LOTT, J. N. A.; OCKENDEN, I.; RABOY, V.; BATTEN, G. D. A global estimate of phytic acid and phosphorus in crop grains, seeds, and fruits. In: REDDY, N. R.; SATHE, S. K. **Food Phytates**. Boca Raton: CRC Press, 2002, p. 7-24.

McKNIGHT, W. F. Phytase technical specifications and properties. **Short Course on Feed Tecnology**, v. 7, 1997.

NAVES, L. P.; CORRÊA, A. D.; BERTECHINI, A. G.; GOMIDE, E. M.; SANTOS, C. D. Effect of pH and temperature the activity of phytase products used in broiler nutrition. **Rev. Bras. Ciênc. Avíc.**, v. 14, n. 3, p. 181-185, 2012.

NRC. Nutrient requirements of poultry. 9th ed., 1994, National Academy Press, Washington D.C.

OLIVEIRA, E. M. **Diferentes inclusões de fitase em dietas de frangos de corte**. 2016. 94 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, 2016.

ONYANGO, E. M.; ASEM, E. K.; ADEOLA, O. Phytic acid increase mucin and endogenous amino acids losses from the gastrointestinal tract of chickens. **Brist. Poult. Sci.**, v. 101, n. 6, p. 836-842, 2009.

PESTI, G.; BAKALLI, R.; VENDRELL, P.; CHEN, H. Y. Effects of organic acid on control of bacteria growth in drinking water for broilers. **Poult. Sci.**, v. 83, 2004.

PIRGOZLIEV, V.; BEDFORD, M. R.; ACAMOVIC, T.; ALLIMEHR, M. The effects of supplementary bacterial phytase on dietary true metabolisable energy, nutrient digestibility and endogenous losses in precision fed turkeys. **Brit. Poult. Sci.**, v. 52, p. 214-220, 2011.

PIRGOZLIEV, V.; ODUGUWA, O.; ACAMOVIC, T.; BEDFORD, M. R.; Diets containing escherichia coli-derived phytase on young chickens and turkeys: effects on performance, metabolizable energy, endogenous secretions, and intestinal morphology. **Poult Sci.**, v. 86, p. 705-713, 2007.

PHILIPSEN, I. P. L. J. Acidifying drinking water supports performance. **World's Poult. Sci. J.**, v. 22, p. 20-21, 2006.

RODEHUTSCORD, M.; DIECKMANN, A. Comparative studies with three-week-old chickens, turkeys, ducks, and quails on the response in phosphorus utilization to a supplementation of monobasic calcium phosphate. **Poult. Sci.**, v. 84, p. 1252-1260, 2005.

ROMANO, F.; RUSSO, A. Biocatalysis Research Progress. Hauppauge (NY): Nova Science Publishers, 2008.

SCOTTÁ, B. A.; GOMIDE, A. P. C.; CAMPOS, P. F.; BARROCA, C. C.; FORMIGONI, A. S.; FERREIRA, S. V. Utilização de fitase na alimentação de aves e suínos. **PUBVET**, v. 8, n. 2, 2014.

SELLE, P. H.; RAVINDRAN, V. Microbial phytase in poultry nutrition. **Anim. Feed Sci. Technol.**, v. 135, p. 1-41, 2007.

SENS, R. F. **Avaliação da suplementação das enzimas xilanase e β -mananase em rações para perus**. 2009. 70 f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Paraná, 2009.

SINGH, P.K. Significance of phytic acid and supplemental phytase in chicken nutrition: a review. **World's Poult. Sci. J.**, v.64, p.553-580, 2008.

SHANMUGAN, G. Characteristics of phytase enzyme and its role in animal nutrition. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.**, v. 7, n. 3, p. 1006-1013, 2018.

SOMMERFELD, V.; KUNZEL, S.; SCHOLLENBERGER, M.; KUHN, I.; RODEHUTSCORD, M. Influence of phytase or *myo*-inositol supplements on performance and phytate degradation products in the crop, ileum, and blood of broiler chickens. **Poult. Sci.**, v. 97, p. 920-929, 2018.

TOOR, G. S.; PEAK, J. D.; SIMS, J. T. Phosphorus speciation in broiler litter and turkey manure produced from modified diets. **Journal of Environmental Quality**, v. 697, p. 687–697, 2005.

TRAN., T. T.; HATTI-KAUL, R.; DALSGAARD, S.; YU, S. A simple and fast kinetic assay for phytases using phytic acid–protein complex as substrate. **Anal Biochem**, v. 410, p. 177–184, 2011.

WALK, C. L.; BEDFORD, M. R.; SANTOS, T. S.; PAIVA, D.; BRADLEY, J. R.; WLADECKI, H.; HONAKER, C.; McELROY, A. P. Extra-phosphoric effects of superdoses of a novel microbial phytase. **Poult. Sci.**, v. 92, n. 3, p. 719–725, 2013.

WALK, C. L.; OLUKOSI, O. A. Influence of graded concentrations of phytase in high-phytate diets on growth performance, apparent ileal amino acid digestibility, and phytate concentration in broilers from hatch to day 28 post-hatch. **Poult. Sci.**, p. 1-10, 2019.

WALK, C. L.; RAMA RAO, S. V. Dietary phytate has a greater anti-nutrient effect on feed conversion ratio compared to body weight gain and greater doses of phytase are required to alleviate this effect as evidenced by prediction equations on growth performance, bone ash and phytate degradation in broilers. **Poult. Sci.**, v. 99, p. 246-255, 2020.

WATKINS, S.; CORNELISON, J.; TILLERY, C.; WILSON, M.; HUBBARD, R. Effects of water acidification on broiler performance. **Avian Advice**, v. 6, p. 4–6, 2004.

WATKINS, S. Water: Identifying and correcting challenges. **Avian Advice**, v. 10, n. 3, p. 10-15, 2008.

WEALLEANS, A. L.; BARNARD, L. P.; ROMERO, L. F.; KWAKERNAAK, C. A. A value based approach to determine optimal phytase dose: A case study in turkey poults. **Anim. Feed Sci. Tech.**, v. 216, p. 288–295, 2016.

YANG, Y.; IJI, P. A.; CHOCT, M. Dietary modulation of gut microflora in broiler chickens: a review of the role of six kinds of alternatives to in-feed antibiotics. **World's Poult. Sci. J.**, v. 65, p. 97-114, 2009.

YU, P.; CHEN, Y. Purification and characterization of a novel neutral and heat-tolerant phytase from a newly isolated strain *Bacillus nealsonii* ZJ0702. **BMC Biotechnology**, v. 13, n. 78, p. 1-7, 2013.

YU, S.; COWIESON, A.; GILBERT, C.; PLUMSTEAD, P.; DALSGAARD, S. Interactions of phytate and myo-inositol phosphate esters (IP1-5) including IP5 isomers with dietary protein and iron and inhibition of pepsin. **J Anim. Sci.**, v. 90, p. 1824–1832, 2012.

3. DIFERENTES DOSES DE FITASE SOBRE O DESEMPENHO, APROVEITAMENTO DA DIETA, MINERALIZAÇÃO ÓSSEA E INOSITOL CIRCULANTE EM PERUS

(Different doses of phytase on performance, bone mineralization, diet utilization and circulating inositol of turkey poults)

RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos da suplementação de diferentes doses de fitase em dietas para perus. 320 perus de um dia de idade foram distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado com 4 tratamentos e 8 repetições de 10 aves cada. Os tratamentos consistiram em uma dieta controle positivo (CP), controle negativo (CN, -0,15% P disponível e -0,18% Ca), CN + 2000 FYT/kg, CN + 4000 FYT/kg. Consumo de ração (CR), ganho de peso (GP) e conversão alimentar (CA) foram calculados de 1-28 dias de idade. Foram calculadas digestibilidade ileal e metabolizabilidade aparente da dieta, energia aparente digestível e metabolizável e variáveis de mineralização óssea (resíduo, Ca, P e Índice de Seedor). Amostras de sangue foram coletadas para análise da concentração plasmática de inositol. Os dados foram submetidos a ANOVA, as médias comparadas por teste Tukey a 5% e uma análise de regressão foi conduzida entre a dieta CN e as dietas suplementadas com fitase. Ambas as doses de fitase tiveram resultados semelhantes para CR e GP ($P < 0,05$), ambas maiores que NC e similar a CP, porém não houve efeito dos tratamentos sobre CA ($P > 0,05$). Houve uma melhora linear com a suplementação enzimática para digestibilidade ileal de P e para todas as variáveis de metabolizabilidade analisadas nas excretas ($P < 0,05$). A inclusão de fitase aumentou linearmente o teor de P nas tibias e a concentração de inositol livre no plasma ($P < 0,05$). Conclui-se que a suplementação de altas doses de fitase para perus melhora a utilização da dieta, refletindo em maior absorção óssea de P e disponibilização de inositol.

Palavras-chave: Aproveitamento de fósforo. Características ósseas. Digestibilidade. Enzimas. Inositol. Metabolizabilidade.

ABSTRACT

The study aimed to evaluate the effects of different doses of phytase on performance, bone composition and diet utilization of turkeys. A total of 320 one-day-old turkeys were distributed in a completely randomized design into 4 treatments and 8 replicates of 10 birds each. Treatments were positive control (PC), negative control (NC, -0.15% P and -0.18% Ca), NC + 2000 FYT/kg, NC + 4000 FYT/kg. Feed intake (FI), body weight gain (BWG) and feed conversion ratio (FCR) from 1 to 28 days were calculated. Apparent ileal digestibility and metabolizability coefficients of the diet and digestible and metabolizable energy were determined, as well as tibia mineralization variables (Mineral residue, Ca, P and Seedor Index). Blood samples were collected at 28 days to analyze concentration of plasma *myo*-inositol. Data were submitted to ANOVA and means compared by Tukey test at 5% probability and a regression analysis was performed between NC diet and supplemented diets. The inclusion of both phytase levels resulted in higher FI and BWG compared to NC diet ($P < 0.05$), both similar to PC, but no effect was observed for FC ($P > 0.05$). Phytase presented a linear improvement ($P < 0.05$) on P ileal digestibility and metabolizability of all variables in the excreta. Phytase showed a linear response on P content in the tibiae and also a linear improvement in plasma *myo*-inositol ($P < 0.05$). In conclusion, the supplementation of turkey diets with high levels of phytase improves diet utilization, therefore increasing phosphorus content in the bone and inositol provision.

Key words: Bone characteristics. Digestibility. Enzymes. Metabolizability. P availability.

3.1 INTRODUÇÃO

As dietas para perus são compostas majoritariamente por ingredientes vegetais como milho e farelo de soja. Nestes ingredientes, o mineral fósforo está ligado covalentemente ao inositol, formando um fator antinutricional conhecido como ácido fítico, uma molécula formada por seis grupos de fosfato ligados negativamente a 12 átomos de hidrogênio em um anel de inositol (mio-inositol-1,2,3,4,5,6-hexafosfato; IP_6), a qual também pode formar complexos com outros minerais, proteínas e aminoácidos (COWIESON et al., 2019). Para serem absorvidos, os fosfatos devem ser removidos do fitato em uma reação catalisada por fitases e fosfatases. A produção endógena destas enzimas no trato de animais não-ruminantes é insuficiente para hidrolisar adequadamente o fitato, tornando os nutrientes indisponíveis ao animal e consequentemente prejudicando o desempenho e aumentando a contaminação ambiental de solos e lençóis freáticos pelo excesso de fósforo excretado (TOOR et al., 2005).

A utilização de fitases exógenas traz resultados positivos quanto ao aproveitamento do fósforo fítico, reduzindo a necessidade de suplementação de fósforo por inclusão de fontes inorgânicas na dieta de aves e garantindo melhoras nas características de mineralização óssea e aproveitamento da dieta de perus (WEALLEANS et al., 2016; KOZLOWSKI et al., 2010). Estudos recentes também fornecem evidências de que doses maiores de fitase podem gerar efeitos extra-fosfóricos (WALK; RAMA RAO, 2020; COWIESON et al., 2017; DERSJANT-LI; KWAKERNAAK, 2019), cujo objetivo é potencializar a total degradação do fitato, liberando nutrientes além do fósforo do complexo de fitato, tais como aminoácidos e outros minerais, e desta forma aumentando o aproveitamento e absorção de nutrientes no trato e melhorando o desempenho das aves.

Outro benefício gerado pela desfosforilação do IP_6 é o fornecimento de inositol, ou inositol na forma livre, uma molécula que tem participação em importantes funções biológicas na célula animal relacionadas ao metabolismo e crescimento (GONZALEZ-UARQUIN et al., 2020). Estudos com frangos demonstraram o efeito de fitases em aumentar a concentração de inositol na digesta devido a maior degradação do fitato, concebendo melhoras no desempenho (WALK; OLUKOSI, 2019; SOMMERFELD et al., 2018; COWIESON

et al., 2015). Contudo, não há relatos deste parametro ter sido estudado referente a suplementação de fitase para perus.

Quando comparados a frangos de corte, estudos envolvendo utilização de aditivos e enzimas e seus efeitos na dieta de perus são mais escassos. Além do mais, a capacidade de utilização do P fítico e P mineral difere entre as espécies de aves domésticas. O peru é a ave com menor taxa de aproveitamento de P em comparação a frangos, patos e codornas, cuja causa está relacionada principalmente a diferenças na taxa de passagem do alimento, na habilidade de hidrolisar fitato, produção endógena de enzimas e desenvolvimento do pH ao longo do trato gastrointestinal (RODEHUTSCORD; DIECKMANN, 2005).

O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos de diferentes inclusões de fitase sobre o desempenho, digestibilidade e metabolizabilidade da dieta, composição óssea e níveis circulantes de inositol em perus de corte.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Paraná, sob o número de protocolo 026/2018.

Um total de 320 perus da linhagem Nicholas® Super Select foram alojados em baterias de gaiolas metabólicas de 1 a 28 dias de idade. Cada bateria consistia em quatro andares com 2 gaiolas por andar e 10 aves por gaiola. Cada gaiola media 0,98m comprimento x 0,90m largura x 0,50m altura. A sala dispunha de iluminação artificial e o controle de temperatura era feito por uso de aquecedores e fechamento e abertura de janelas. Diariamente eram verificados e anotados dados de temperatura, umidade do ar e mortalidade das aves, retirando-se das gaiolas as aves mortas. A temperatura foi ajustada em 30°C no dia 1 e gradualmente reduzida a 23°C até os 28 dias. Ração e água foram oferecidos *ad libitum* durante todo o período experimental em comedouros do tipo calha e bebedouros de plástico tipo nipple.

As aves foram distribuídas em um delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos e oito repetições de 10 aves cada. Os tratamentos variaram de acordo a composição da dieta e inclusão de fitase exógena: Uma dieta basal - Controle positivo (CP); Dieta com redução de 0,18% de Ca e 0,15% de P disponível (P disp.) Controle Negativo – CN; CN + 2000 FYT/kg; CN + 4000 FYT/kg. As dietas experimentais foram formuladas baseadas em milho e farelo de soja, variando quanto ao teor de Ca e P entre a dieta CP e CN (Tabela 2). A enzima fitase utilizada no experimento foi a RONOZYME® Hiphos GT (DSM Nutritional Products, Kaiseraugst, Suíça), uma 6-fitase originada de *Citrobacter braakii* e expressada em *Aspergillus oryzae* com atividade de 20.000 FYT/kg de produto. Uma unidade de fitase (FYT) é definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de fosfato inorgânico por minuto a partir de um fitato de Na de 0,0051 mol L⁻¹ em pH 5,5 e a temperatura de 37°C (ENGELLEN et al., 1994).

As variáveis de desempenho foram obtidas de 1 a 28 dias de idade por meio da pesagem dos perus e das sobras de ração para cálculo do consumo de ração médio (CR), ganho de peso médio (GP) e conversão alimentar (CA) corrigidos para o peso das aves mortas.

Aos 21 dias de idade, cinco animais por repetição foram selecionados ao acaso e eutanaziados por meio de deslocamento cervical, de acordo com os cinco passos descritos por Ludtke et al. (2010), para coleta de conteúdo ileal. O conteúdo foi definido pela região coletada, estabelecida em 2 cm acima da junção íleo-cecal e 2 cm abaixo do divertículo de Meckel. Imediatamente após a coleta, as amostras de conteúdo ileal foram armazenadas em sacos plásticos apropriados e identificados e congeladas a -18°C. Anteriormente as análises, as amostras foram descongeladas até atingir temperatura ambiente. Amostras das dietas experimentais e de conteúdo ileal foram então secas em estufa a 105°C, homogeneizadas e moídas a 0,5 mm para análise do teor de matéria seca (MS), resíduo mineral (RM), proteína bruta (PB), Ca e P de acordo com metodologia da *Association of Official Analytical Chemists* (métodos 984,20; 942,05; 954,01; 927,02 e 965,17, respectivamente) (AOAC, 1995).

Amostras parciais de excretas foram coletadas diariamente no período de 19 a 21 dias de idade, com uma coleta por dia. As excretas eram armazenadas em sacos plásticos apropriados e identificados, atentando-se para evitar contaminação por penas e/ou ração no momento da coleta, e congeladas em freezer a -18°C. As excretas foram então descongeladas a temperatura ambiente, secas em estufa a 105°C, homogeneizadas e moídas a 0,5 mm e analisadas quanto ao teor de MS, RM, PB, Ca e P utilizando os métodos descritos anteriormente, e também o teor de Na (método 969,23) (AOAC, 1995).

A determinação de Cinzas Insolúveis em Ácido (CIA) nas amostras de dieta, conteúdo ileal e excretas foi realizada de acordo com metodologia de Scott e Boldaji (1997). Com base nos resultados da análise das dietas, excretas e conteúdo ileal, os coeficientes de digestibilidade ileal aparente (CDIA) e de metabolizabilidade aparente das excretas (CMA) e foram calculados pela seguinte equação:

$$CDIA \text{ ou } CMA (\%) = \frac{(Nutriente \text{ na dieta}) - (Nutriente \text{ na digesta ileal ou excreta} \times FI)}{Nutriente \text{ na dieta}}$$

Onde FI é o Fator de Indigestibilidade, obtido pela diferença entre a quantidade de CIA na dieta e CIA na digesta ileal ou excreta.

A energia digestível ileal aparente (EDA) e energia metabolizável aparente das excretas (EMA) foram calculados após ser aferido o valor de energia bruta (EB) das amostras de dieta, excretas e conteúdo ileal por uso de uma bomba calorimétrica (Ika Werke C2000 Control Oxygen Bomb Calorimeter, Ika-Werke GmbH&Co, Staufen, Alemanha). O cálculo de EMA e EDA foi feito pela seguinte equação:

$$EMA \text{ ou } EDA \text{ (kcal/kg MS)} = EB \text{ da dieta} - (EB \text{ da excreta ou digesta ileal} \times FI)$$

Duas das aves eutanasiadas aos 21 dias tiveram suas pernas esquerdas removidas para coleta do osso tibial. As tíbias foram limpas com éter para remoção de restos de músculo e gordura, secas em estufa a 105° C e queimadas em forno mufla a 600°C para análise do conteúdo de RM, Ca e P de acordo com os métodos da AOAC (1995) descritos anteriormente. Previamente a análise laboratorial, o Índice de Seedor (IS) das tíbias foi calculado pela divisão do peso do osso por seu comprimento como indicativo de densidade óssea (Seedor, 1993). O comprimento e peso ósseo foram aferidos com paquímetro digital e balança digital calibrada para escala de 0,0001 grama.

Ainda aos 21 dias, duas aves por repetição foram usadas para coleta de 3 a 5 mL de amostras de sangue, com uso de tubos Vacutainer® com heparina. Imediatamente após coleta de sangue, os tubos foram centrifugados a 3000 rpm por 10 minutos para separar o plasma sanguíneo. Após centrifugação, o plasma obtido foi armazenado em microtubos graduados e congelados a -20° C antes de envio para análise. A concentração de inositol no plasma foi então determinada por espectrometria em massa utilizando um sistema UPLC-TQD (ACQUITY UPLC® System, Waters, Milford, MA, EUA) de acordo com método descrito por Leung et al. (2011).

Para análise estatística, primeiramente foi verificado normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk e após detectada uma distribuição normal, todos os dados foram submetidos a análise de variância. Quando significativas, as médias foram comparadas por teste Tukey a 5% de significância e para avaliar os efeitos de doses crescentes de fitase foi conduzida uma análise de regressão linear e quadrática. Todos os procedimentos estatísticos foram realizados utilizando-se o pacote ExpDes do programa R® (Ferreira et al., 2011).

TABELA 2. INGREDIENTES E NÍVEIS NUTRICIONAIS DAS DIETAS.

Ingredientes (%)	Controle Positivo	Controle Negativo
Milho	46,837	48,316
Farelo de soja	41,400	41,200
Gluten de milho	3,000	3,000
Óleo de soja	0,700	0,200
Fosfato bicálcico	3,570	2,770
Calcário	1,300	1,320
Sal	0,470	0,470
DL-Metionina	0,420	0,420
L-Lisina	0,517	0,520
Treonina	0,116	0,114
Valina	0,155	0,154
L-Arginina	0,138	0,139
Cloreto de colina	0,080	0,080
Premix vitamínico ^a	0,150	0,150
Premix mineral ^b	0,080	0,080
Protease ^c	0,020	0,020
Amilase ^d	0,013	0,013
Premix 25(OH)D ₃ ^e	0,033	0,033
CIA	1,000	1,000
Nutrientes		
EMA, Kcal/kg	2,901	2,901
PB (%)	27,623	27,642
Extrato etéreo (%)	3,487	3,044
Ca (%)	1,519	1,338
P disponível (%)	0,800	0,650
Na (%)	0,200	0,200
Cloro (%)	0,345	0,346
Lisina digestível (%)	1,700	1,700
Metionina digestível (%)	0,797	0,797
Met+Cis digestível (%)	1,186	1,187
Treonina digestível (%)	1,054	1,053
Triptofano digestível (%)	0,281	0,280
Arginina digestível (%)	1,785	1,785
Valina digestível (%)	1,258	1,258
Leucina digestível (%)	2,156	2,163
Isoleucina digestível (%)	1,037	1,037

^aROVIMIX®, suplementação por kg de produto: vitamina A, 11.000.000 UI; vitamina D3, 4.000.000 UI; vitamina E, 55.000 UI; vitamina K3, 3 g; vitamina B1, 2.3 g; vitamina B2, 7 g; ácido pantotênico, 12 g; vitamina B6, 4 g; vitamina B12, 25 mg; ácido nicotínico, 60 g; ácido fólico, 2 g; biotina, 250 mg; selênio, 300 mg.

^bROLIGOMIX®, suplementação por kg de produto: cobre, 20g; ferro, 100g; iodina, 2g; manganês, 130g; zinco, 130g.

^cRonozyme ProAct (CT) com 15.000 PROT/kg de produto

^dRonozyme HiStarch (CT) com 80 KNU/kg de produto

^ePremix Hy•D® a 91 mg de 25(OH)D₃/ton de ração.

3.3 RESULTADOS

A atividade de fitase analisada apresentou baixa variação nas dietas suplementadas e permaneceu abaixo dos níveis de detecção para as dietas não-suplementadas (Tabela 3).

TABELA 3. ANÁLISE DE RECUPERAÇÃO DE FITASE DAS DIETAS EXPERIMENTAIS.

Tratamento	Fitase ¹ , FYT ² /kg	
	Declarado	Analisado
Controle positivo (CP)	0	<LDD ³
Controle negativo (CN)	0	<LDD
CN + 2000 FYT/kg	2000	2386
CN + 4000 FYT/kg	4000	4014

*Análise de recuperação realizada por BioPract GmbH, Berlin, Alemanha.

¹Atividade da enzima é expressada como a quantidade de produto adicionada na ração.

²FYT = unidades de fitase por kg de ração.

³<LDD = limite de detecção.

Os resultados de desempenho (Tabela 4) indicam que os perus alimentados com dieta contendo fitase obtiveram maior CR e GP comparado aos alimentados com a dieta CN ($P < 0,05$), sendo que ambas as doses apresentaram resultados semelhantes entre si e foram semelhantes a dieta CP. Não houve diferença entre os tratamentos para a variável CA ($P > 0,05$) e não foi encontrado efeito entre as doses de fitase para desempenho na análise de regressão ($P > 0,05$).

TABELA 4. CONSUMO DE RAÇÃO (CR), GANHO DE PESO (GP) E CONVERSÃO ALIMENTAR DE 1 A 28 DIAS.

Tratamento	CR (g)	GP (g)	CA
Controle positivo (CP)	1226.01 ^a	815.75 ^a	1.510
Controle negativo (CN)	1167.9 ^b	738.6 ^b	1.582
CN + 2000 FYT/kg	1231.2 ^a	810.87 ^a	1.518
CN + 4000 FYT/kg	1219.7 ^a	806.48 ^a	1.516
Probabilidade	0.003	0.042	0.776
P-linear	0.186	0.230	0.242
CV* (%)	6.91	9.03	4.51

*CV – Coeficiente de Variação.

Médias seguidas por letras sobrescritas diferem na mesma coluna pelo teste Tukey a 5%.

Os resultados de digestibilidade estão apresentados na Tabela 5. A maior dose de fitase (4000 FYT/kg) promoveu maior CDIA de P comparada as

demais dietas ($P < 0,05$). Não foram detectadas diferenças significativas entre as dietas controle e as dietas suplementadas com fitase para CDIA de MS, RM, PB, Ca ou para EDA ($P > 0,05$). O efeito de disponibilização do P promovida pela fitase no íleo dos perus, observado por meio do CDIA, aumentou linearmente (P -linear $< 0,05$) com doses crescentes, conforme observado na Figura 3.

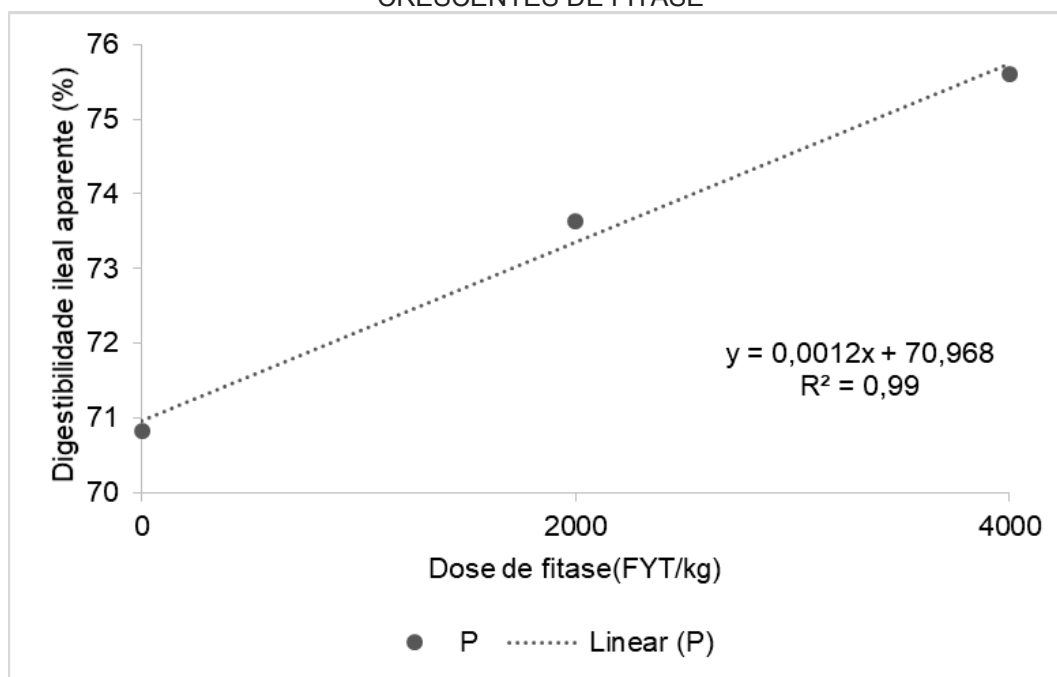
TABELA 5. COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDADE ILEAL APARENTE (%) DA MATÉRIA SECA (MS), RESÍDUO MINERAL (RM), PROTEÍNA BRUTA (PB), CÁLCIO (CA), FÓSFORO (P) E ENERGIA DIGESTÍVEL APARENTE (EDA) AOS 28 DIAS.

Tratamento	MS	RM	PB	Ca	P	EDA (kcal)
Controle positivo (CP)	74.27	56.77	89.38	62.06	69.78 ^b	3312
Controle negativo (CN)	73.16	56.67	89.56	64.20	70.83 ^b	3222
CN + 2000 FYT/kg	73.20	58.03	88.70	65.14	73.63 ^{ab}	3239
CN + 4000 FYT/kg	72.65	60.42	90.26	63.81	75.60 ^a	3334
Probabilidade	0.539	0.202	0.101	0.148	< 0.001	0.492
P-linear	0.281	0.223	0.095	0.234	0.020	0.151
CV* (%)	4.85	6.06	1.80	8.57	5.49	4.90

*CV – Coeficiente de Variação.

Médias seguidas por letras sobrescritas diferem na mesma coluna pelo teste Tukey a 5%.

FIGURA 3. COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDADE ILEAL DO FÓSFORO COM DOSES CRESCENTES DE FITASE



FONTE: O autor (2020).

Foi observada diferença significativa para o CMA de todas as variáveis analisadas, incluindo EMA (Tabela 6; $P < 0,05$). A inclusão de 4000 FYT/kg na dieta resultou nos maiores valores para CMA da MS, RM, PB, Na, Ca, P e EMA

em comparação aos demais tratamentos. As demais dietas (CP, CN e CN + 2000 FYT/kg) foram semelhantes para CMA da MS, RM, Na, Ca e P. A metabolizabilidade de PB aumentou com inclusão de 2000 FYT em comparação as dietas controle. Para EMA, a inclusão de 2000 FYT foi similar a dieta CP.

As análises de regressão de CMA e EMA (Figuras 4, 5, 6 e 7) mostram um efeito crescente linear da suplementação com fitase (P-linear<0,05).

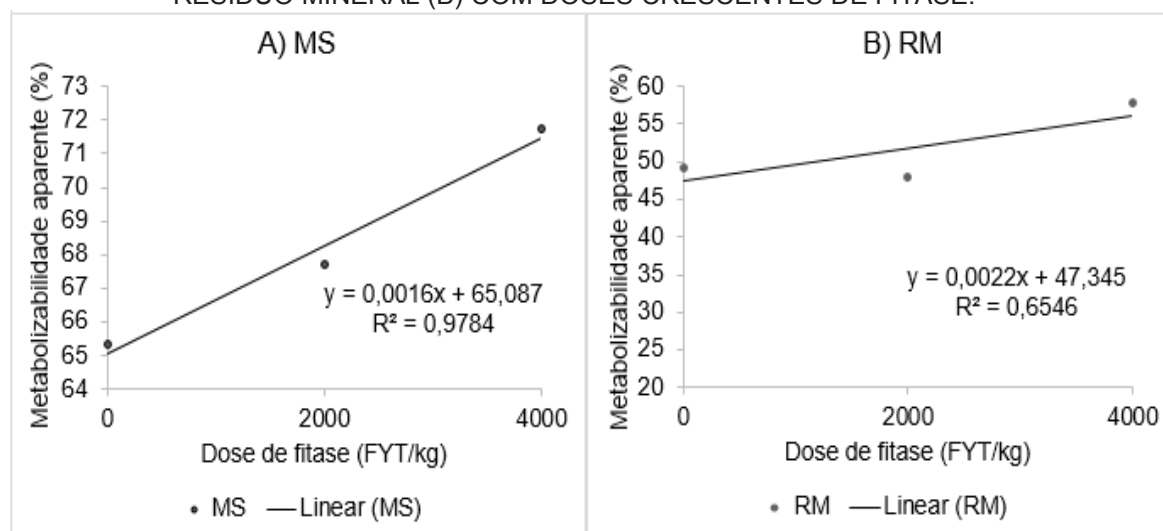
TABELA 6. COEFICIENTE DE METABOLIZABILIDADE APARENTE (%) DA MATÉRIA SECA (MS), RESÍDUO MINERAL (RM), PRÓTEÍNA BRUTA (PB), CÁLCIO, FÓSFORO, SÓDIO E ENERGIA METABOLIZÁVEL APARENTE (EMA) AOS 28 DIAS DE IDADE.

Tratamento	MS	RM	PB	Na	Ca	P	EMA (kcal)
Controle positivo	68.18 ^{bc}	45.93 ^c	56.34 ^c	65.08 ^b	67.10 ^c	58.01 ^c	3218 ^b
Controle negativo	65.36 ^c	49.18 ^{bc}	55.47 ^c	64.71 ^b	69.42 ^c	59.54 ^c	3104 ^c
CN + 2000 FYT/kg	67.73 ^c	48.05 ^c	61.99 ^b	65.70 ^b	69.99 ^{bc}	61.50 ^{bc}	3256 ^b
CN + 4000 FYT/kg	71.74 ^a	57.93 ^a	68.88 ^a	72.63 ^a	75.33 ^a	73.21 ^a	3486 ^a
Probabilidade	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
P-linear	<0.001	<0.001	<0.001	0.001	0.001	<0.001	<0.001
CV* (%)	3.50	7.90	6.77	5.44	4.64	5.49	2.62

*CV – Coeficiente de Variação.

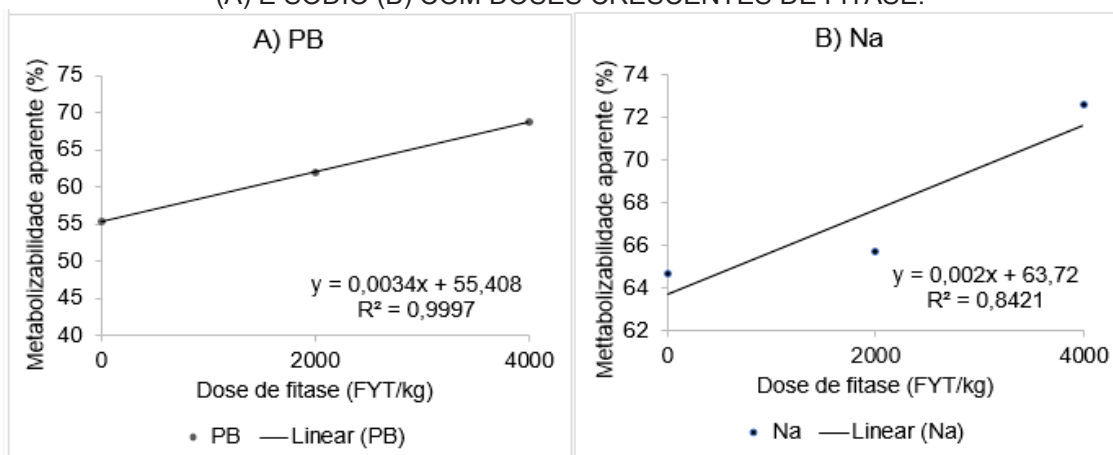
Médias seguidas por letras sobrescritas diferem na mesma coluna pelo teste Tukey a 5%.

FIGURA 4. COEFICIENTE DE METABOLIZABILIDADE APARENTE DA MATÉRIA SECA (A) E RESÍDUO MINERAL (B) COM DOSES CRESCENTES DE FITASE.



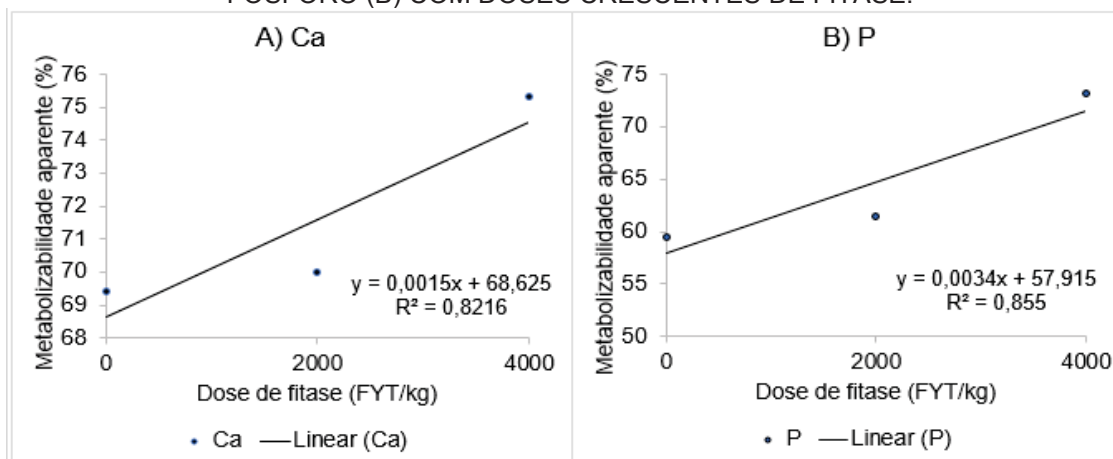
FONTE: O autor (2020)

FIGURA 5. COEFICIENTE DE METABOLIZABILIDADE APARENTE DA PROTEÍNA BRUTA (A) E SÓDIO (B) COM DOSES CRESCENTES DE FITASE.



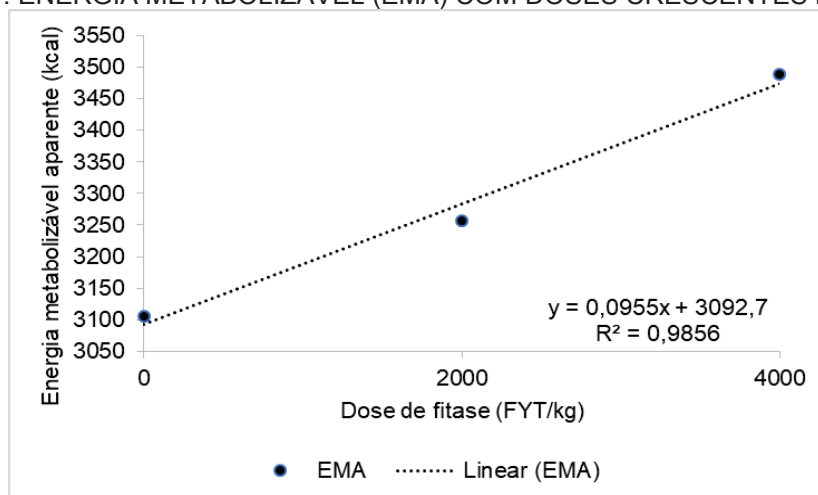
FONTE: O autor (2020).

FIGURA 6. COEFICIENTE DE METABOLIZABILIDADE APARENTE DE CÁLCIO (A) E FÓSFORO (B) COM DOSES CRESCENTES DE FITASE.



FONTE: O autor (2020)

FIGURA 7. ENERGIA METABOLIZÁVEL (EMA) COM DOSES CRESCENTES DE FITASE.



FONTE: O autor (2020)

Os perus alimentados com dieta contendo 4000 FYT/kg de fitase apresentaram maior conteúdo de P no osso tibial quando comparados àqueles que comeram a dieta CN, enquanto a suplementação de 2000 FYT/kg resultou no o mesmo teor de P na tibia quanto a dieta CP (Tabela 7; $P < 0,05$). Não houve efeito dos tratamentos para conteúdo de RM e Ca e índice de Seedor. A análise de regressão entre a dieta CN e as dietas suplementadas mostrou um efeito linear de aumento no teor de P no osso com doses maiores de fitase (Figura 8; $P\text{-linear} < 0,05$).

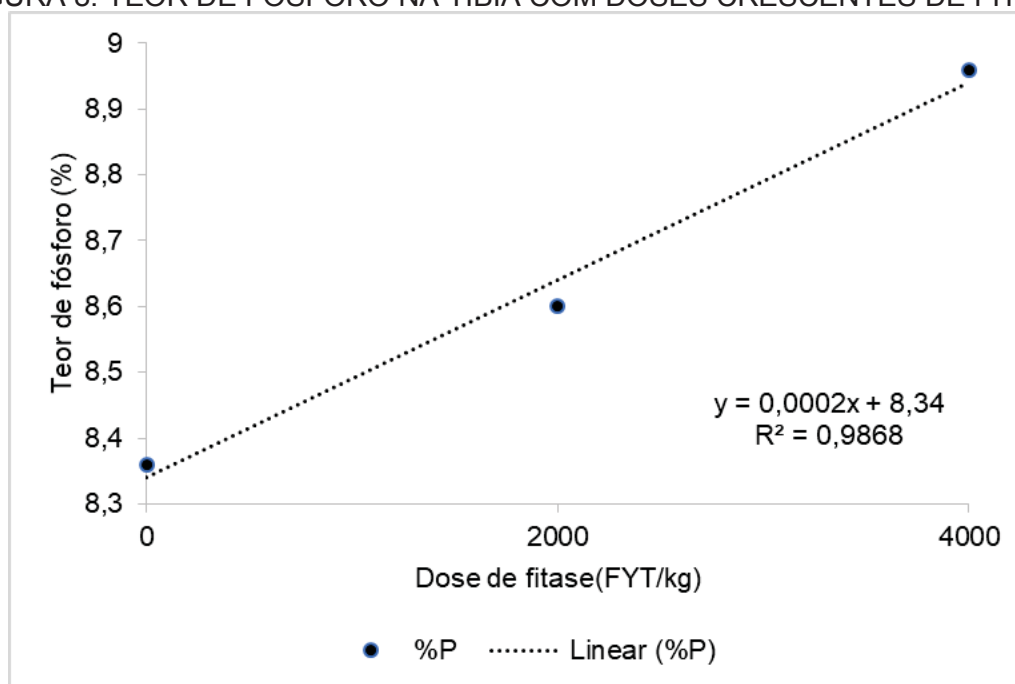
TABELA 7. TEOR DE RESÍDUO MINERAL (RM), CÁLCIO E FÓSFORO NA TIBIA E ÍNDICE DE SEEDOR

Tratamento	RM (%)	Ca (%)	P (%)	IS
Controle positivo	48.67	18.03	8.71 ^{ab}	33.88
Controle negativo	48.78	17.76	8.36 ^b	33.37
CN + 2000 FYT/kg	48.49	17.81	8.60 ^{ab}	34.17
CN + 4000 FYT/kg	49.15	18.42	8.96 ^a	32.69
Probabilidade	0.988	0.599	0.03	0.828
P-linear	0.835	0.08	0.005	0.842
CV* (%)	3.51	4.71	3.91	8.59

*CV – Coeficiente de Variação.

Médias seguidas por letras sobrescritas diferem na mesma coluna pelo teste Tukey a 5%.

FIGURA 8. TEOR DE FÓSFORO NA TIBIA COM DOSES CRESCENTES DE FITASE.



FONTE: O autor (2020).

Foi observada diferença significativa entre os tratamentos para inositol circulante no plasma dos perus (Tabela 8; $P < 0,05$). Ambas as doses de fitase apresentaram resultados de inositol semelhantes entre si e maiores que as dietas controle. A concentração de inositol no plasma foi maior para a dieta CN em comparação a dieta CP. Na análise de regressão, foi observado um efeito linear crescente, onde ao se aumentar a dose de fitase, a degradação de fitato no trato foi provavelmente maior, assim resultando em mais absorção de inositol para a corrente sanguínea ($P\text{-linear} < 0,05$).

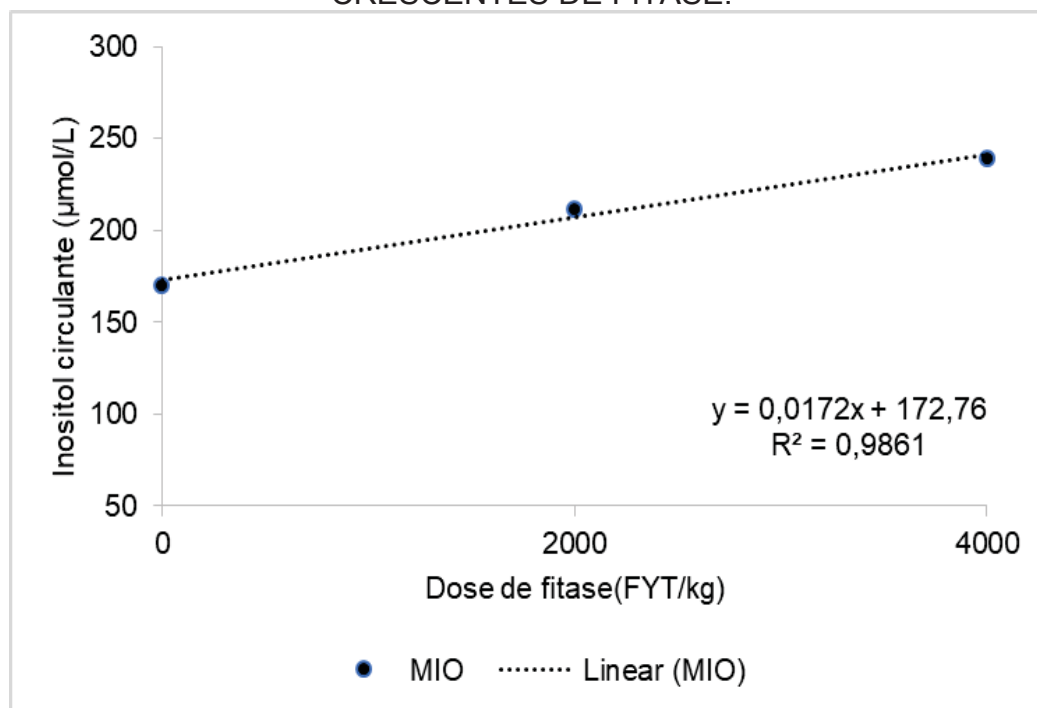
TABELA 8. CONCENTRAÇÃO DE INOSITOL NO PLASMA AOS 28 DIAS

Tratamento	Inositol ($\mu\text{mol/L}$)
Controle positivo	163.38 ^c
Controle negativo	170.50 ^{bc}
CN + 2000 FYT/kg	211.82 ^a
CN + 4000 FYT/kg	239.09 ^a
Probabilidade	< 0.001
P-linear	< 0.001
CV* (%)	16.15

*CV – Coeficiente de Variação.

Médias seguidas por letras sobrescritas diferem na mesma coluna pelo teste Tukey a 5%.

FIGURA 9. CONCENTRAÇÃO DE INOSITOL NO PLASMA COM DOSES CRESCENTES DE FITASE.



FONTE: O autor (2020).

3.4 DISCUSSÃO

A inclusão de fitase na dieta dos perus aumentou o consumo de ração e ganho de peso em 4,05% e 9,61% comparada a dieta CN, porém não afetou a conversão alimentar. Wealleans et al. (2016) relataram aumentos ainda mais expressivos no consumo e ganho de peso de perus aos 21 dias, em até 16% e 21%, respectivamente, com inclusão de 1035 FYT/kg em dieta de baixo cálcio e fósforo. Os resultados se equiparam a oferta de 1,2g/kg de P inorgânico na forma de fosfato. Os autores não observaram efeito da suplementação de fitase sobre a taxa de conversão alimentar, em acordo com os resultados deste trabalho.

Por outro lado, Kozlowski et al. (2010) relataram que a inclusão de 500 e 1000 FYT/kg em dietas de baixo cálcio e fósforo para perus promoveu melhora na conversão alimentar comparada a dietas controles sem suplementação, como reflexo de maior fornecimento de P aos perus. Os perus, no entanto, foram criados até as 16 semanas de idade, o que provavelmente permitiu um maior impacto da redução de cálcio e fósforo e da inclusão de fitase na dieta ao longo do crescimento das aves.

Foi possível observar que o aumento das doses de fitase teve um impacto linear crescente na metabolizabilidade aparente de todas as variáveis analisadas nas excretas, incluindo EMA, assim como na digestibilidade ileal aparente do P. Resultados semelhantes também foram encontrados por outros estudos em relação a fitase e seus efeitos na disponibilidade de P para perus, por meio do aumento da digestibilidade ileal de P (INGELMANN et al., 2018; WEALLEANS et al., 2016; KOZLOWSKI et al., 2010; APPLEGATE et al., 2003), apesar dos autores não terem utilizado doses muito superiores a 1000 FTU/kg. No presente estudo, a inclusão de até 4000 FYT/kg aumentou o CDIA e CMA em 13% e 23% respectivamente em comparação as dietas sem enzima, retratando que mais P foi liberado da ligação com fitato para ser retido e absorvido no trato digestivo. Choct (2006) explica que a inclusão de 500 FYT/kg de ração pode liberar até 0,1% de P disponível ligado ao fitato.

Estudos constataam a influência do uso de fitase sobre o melhor aproveitamento de outros nutrientes além do fósforo, como aminoácidos, sódio, outros minerais e também da energia da dieta, definindo o chamado efeito extra-

fosfórico da fitase. Este efeito foi observado em dietas contendo fitase para frangos de corte (WALK et al., 2013; COWIESON et al., 2017; DERSJANT-LI; KWAKERNAAK, 2019; WALK; RAMA RAO, 2020) e também para perus de corte (PIRGOZLIEV et al., 2011; PIRGOZLIEV et al., 2007). Os achados do presente trabalho também comprovam que doses superiores a 2000 FYT aumentaram eficazmente a metabolizabilidade de proteína, sódio e energia. A melhoria no aproveitamento destes nutrientes parece estar relacionada principalmente ao maior grau de desfosforilação do ácido fítico e eliminação dos efeitos antinutricionais induzidos por doses maiores de fitase (COWIESON et al., 2011).

A fitase não afetou a digestibilidade de MS, RM, PB, Ca ou EDA na dieta dos perus, no entanto melhorou significativamente a metabolizabilidade de nutrientes e EMA, indicando que a ação da fitase foi mais eficaz na porção distal do intestino das aves. Apesar de não ser conclusiva, esta ocorrência pode estar ligada a hipótese de que houve um desenvolvimento da microbiota no intestino grosso dos perus devido a um aumento no fluxo de nutrientes provenientes da degradação do fitato. Borda-Molina et al. (2019) explica que a maior disponibilidade de P advinda do uso de fitase parece favorecer populações de microrganismos benéficos no ceco de frangos, o que contribuiria para um melhor aproveitamento da dieta. Ademais, Ravindran et al. (1999) afirmaram que medidas do aproveitamento de amino ácidos, por exemplo, podem diferir quando feitas no íleo ou excretas, devido a uma possível contaminação das excretas com aminoácidos urinários e/ou penas.

A excreção de Na da dieta foi reduzida pela inclusão de fitase, como observado no CMA. Um dos efeitos antinutricionais do fitato inclui o aumento na excreção de Na devido a uma maior descarga de NaHCO_3 no lúmen intestinal, como forma de mitigar o excesso de HCl induzido pela presença do fitato (ALLEN; FLEMSTRON, 2005). A fitase parece combater este efeito ao eliminar o fitato do trato, conforme visto em dietas para frangos (COWIESON et al., 2009; RAVINDRAN et al., 2006) e também nos resultados deste estudo, onde as altas doses de fitase reduziram de forma linear o conteúdo de Na nas excretas em comparação as dietas sem enzima.

Ao longo das pesquisas com fitase, foi comprovado o efeito benéfico da enzima na utilização de P e Ca da dieta que resulta em maior absorção óssea destes minerais (HAN et al., 2009; CAMDEN et al., 2001). O percentual de P na

tíbia dos perus aumentou em até 7,18% comparada ao CN. Os resultados são consistentes com os encontrados por Kozlowski et al. (2010), que relatou aumento no teor de P na tíbia de perus alimentados com até 1000 FYT/kg e por Applegate et al. (2003), que observou aumento linear no percentual de P e cinzas na tíbia de perus ao utilizar 500 FYT/kg. Todavia, uma dose alta de fitase (4000 FYT/kg) foi mais efetiva em disponibilizar P para mineralização óssea quando comparada a dose de 2000 FYT e ao uso de uma dieta basal sem suplementação.

Os tratamentos não afetaram o teor de RM e Ca nos ossos, ou o índice de Seedor. Os resultados diferem do observado por Walk e Rama Rao (2020), onde doses superiores a 2000 FYT/kg resultaram em maior concentração de Ca e cinzas na tíbia de frangos de corte. Rezvani et al. (2009) testaram os efeitos de duas fitases distintas sobre a utilização de P para perus e não encontraram diferenças para teor de P e cinzas na tíbia, enquanto o teor de Ca foi afetado somente por uma das fitases. Os autores enfatizam que nem todos os produtos de fitase são semelhantes, diferindo em características como termostabilidade e pH, desta forma produzindo resultados diferentes de aproveitamento da dieta. No caso deste estudo, a não variação de RM e Ca na tíbia pode ser explicado pela ausência de efeito significativo sobre o CDIA de RM e Ca.

A concentração de inositol no plasma foi aumentada linearmente com doses crescentes de fitase comparada as dietas controle, provavelmente devido a uma maior taxa de desfosforilação dos isômeros de fosfato e consequente liberação de inositol no trato. Os resultados estão em acordo com outros estudos que relataram níveis maiores de inositol plasmático com a oferta de dietas suplementadas com fitase para frangos de corte (WALK; OLUKOSI, 2019; SOMMERFELD et al., 2018; COWIESON et al., 2015). A molécula de inositol livre é um produto da total degradação do fitato com diversas funções no organismo do animal. O inositol parece ter participação em processos de transporte de glicose e metabolismo de lipídeos, auxílio no equilíbrio osmótico de tecidos específicos e absorção de minerais, além de promover efeitos antioxidantes e ações osmóticas em tecidos específicos (Gonzalez-Uarquin et al. (2020). Contudo, mesmo o aumento no inositol circulante sugerindo uma maior taxa de quebra do fitato, os tratamentos não tiveram efeito sobre a digestibilidade de nutrientes além do P.

A resposta a suplementação de fitase difere entre frangos e perus, sendo que a taxa de desfosforilação dos isômeros de fosfato como IP_6 , IP_5 e IP_4 , assim como a digestibilidade de P, é menor em perus. Os resultados de um estudo comparativo entre frangos e perus conduzido por Ingelmann et al. (2019) indicam que a digestibilidade pré-cecal do P em dietas sem fitase variou de 51 a 60% em frangos e 22 a 28% em perus. Já a degradação de IP_6 em dietas sem fitase variou de 64 a 76% para frangos e 6 a 15% para perus. Com a adição de fitase, o aumento na digestibilidade pré-cecal de P aumentou mais em perus do que frangos, contudo a diferença foi pouca (17% x 15%, respectivamente) considerando as capacidades de hidrólise de fitato de cada espécie. Esta baixa capacidade de degradação pode estar relacionada a fatores como perda endógena de P, taxa de passagem e pH do trato (INGELMANN et al., 2019; RODEHUTSCORD; DIECKMANN, 2005) ou mesmo diferenças no desenvolvimento do trato (ZELLER et al., 2016). A formulação de dietas para perus com fitase deve ser ponderada de maneira diferente das dietas para frangos, visto que as respostas a enzima diferem.

De qualquer forma, os resultados deste trabalho evidenciam que os perus podem responder a suplementações de fitase acima de 4000 FYT/kg na dieta em termos de aproveitamento da dieta, demonstrando os efeitos extra-fosfóricos obtidos com as doses utilizadas. As dietas para perus podem ser formuladas com menor inclusão de Ca e P sem comprometer desempenho e mineralização óssea, ao passo que a inclusão de altas doses de fitase levam a maior disponibilização e aproveitamento de P e Ca, absorção óssea de P, fornecimento de inositol livre e melhor utilização da proteína, Na e energia. Para complementar, esta estratégia pode otimizar custos de formulação e reduzir a excreção de P ao ambiente, considerada um risco para a qualidade de solos e lençóis freáticos, especialmente em áreas com alta produção avícola (TOOR et al., 2005).

3.5 CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos com este experimento é possível concluir que os perus têm capacidade de responder a doses de fitase de até 4000 FYT/kg adicionadas à dieta, permitindo a redução dos níveis formulados de Ca e P sem comprometer o desempenho dos animais e as características de mineralização óssea. O estudo traz evidências de efeitos extra-fosfóricos com o uso de altas doses da enzima pela melhora na retenção de sódio, proteína e energia da dieta, além de maior digestibilidade do fósforo. Os efeitos também são refletidos na maior concentração de inositol no plasma dos perus, produto resultante da degradação da molécula de fitato.

REFERÊNCIAS

- ALLEN, A.; FLEMSTRON, G. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. **Amer. J. Physiol.**, v. 288, p. 1-19, 2005.
- AOAC International. Official and tentative methods of analysis. 16th ed. Arlington, Virginia, 1995.
- APPLEGATE, T. J.; WEBEL, D. M.; LEI, X. G. Efficacy of a phytase derived from escherichia coli and expressed in yeast on phosphorus utilization and bone mineralization in turkey poult. **Poult. Sci.**, v. 82, p. 1726-1732, 2003.
- BORDA-MOLINA, D.; ZUBER, T.; SIEGERT, W.; CAMARINHA-SILVA, A.; FEUERSTEIN, D.; RODEHUTSCORD, M. Effects of protease and phytase supplements on small intestinal microbiota and amino acid digestibility in broiler chickens. **Poult. Sci.**, v. 98, p. 2906-2918, 2019.
- CAMDEN, B. J.; MOREL, P. C. H.; THOMAS, D. V.; RAVINDRAN, V.; BEDFORD, M. R. Effectiveness of exogenous microbial phytase in improving the bioavailabilities of phosphorus and other nutrients in maize-soya-bean meal diets for broilers. **Anim. Sci.**, v. 73, p. 2089-297, 2001.
- CHOCT, M. Enzymes for the feed industry: past, present and future. **World. Poult. Sci.**, v. 62, p. 5-15, 2006.
- COWIESON A. J.; AURELI, R.; GUGGENBUHL, P.; FRU-NJI, F. Possible involvement of myo-inositol in the physiological response of broilers to high doses of microbial phytase. **Anim. Prod. Sci.**, v. 55, p. 710–719, 2015.
- COWIESON, A. J.; RUCKEBUSH, J. P.; SORBARA, J. O. B.; WILSON, J. W.; GUGGENBUHL, P.; TANADINI, L.; ROOS, F. F. A systematic view on the effect of microbial phytase on ileal amino acid digestibility in broilers. **Anim. Feed Sci. Technol.**, v. 231, p. 138–149, 2017.
- COWIESON, A. J.; BEDFORD, M. R.; SELLE, P. H.; RAVINDRAN, V. Phytate and microbial phytase: Implications for endogenous nitrogen losses and nutrient availability. **World's Poult. Sci. J.**, v. 65, n. 3, p. 401–418, 2009.
- COWIESON, A. J.; WILCOCK, P.; BEDFORD, M. R. Super-dosing effects of phytase in poultry and other monogastrics. **World Poult. Sci. J.**, v. 67, p. 225-236, 2011.
- DERSJANT-LI, Y.; KWAKERNAAK, C. Comparative effects of two phytases versus increasing the inorganic phosphorus content of the diet, on nutrient and amino acid digestibility in boilers. **Anim. Feed Sci. Tech.**, v. 253, p. 166-180, 2019.
- ENGELN, A.J.; VAN DER HEEH, F.C.; RANDSDORP, P.G.H. et al. Simple and rapid determination of phytase activity. **Journal of AOAC International**,

v.77, p.760-764, 1994.

FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. Experimental Designs: um pacote R para análise de experimentos. **Revista de Estatística da UFOP**, v. 1, n. 1, p. 1-9, 2011.

GONZALEZ-UARQUIN, F.; RODEHUTSCORD, M.; HUBER, K. *Myo*-inositol: its metabolism and potential implications for poultry nutrition – a review. **Poult. Sci.**, v. 99, p. 893-905, 2020.

HAN, J. C.; YANG, X. D.; QU, H. X.; XU, M.; ZHANG, T.; LI, W. L.; YAO, J. H.; LIU, Y. R.; SHI, B. J.; ZHOU, Z. F.; FENG, X. Y. Evaluation of equivalency values of microbial phytase to inorganic phosphorus in 22- to 42-day-old broilers. **J. Appl. Poult.**, v. 18, p. 707–715, 2009.

INGELMANN, C. J.; WITZIG, M.; MÖHRING, J.; SCHOLLENBERGER, M.; KÜHN, I.; RODEHUTSCORD, M. Effect of supplemental phytase and xylanase in wheat-based diets on prececal phosphorus digestibility and phytate degradation in young turkeys. **Poult. Sci.**, v. 97, p. 2011-2020, 2018.

INGELMANN, C. J.; WITZIG, M.; MÖHRING, J.; SCHOLLENBERGER, M.; KÜHN, I.; RODEHUTSCORD, M. Phytate degradation and phosphorus digestibility in broilers and turkeys fed different corn sources with or without added phytase. **Poult. Sci.**, v. 98, p. 912-922, 2019.

KOZLOWSKI, K.; JANKOWSKI, J.; JEROCH, H. Efficacy of escherichia coli - derived phytase on performance , bone mineralization and nutrient digestibility in meat-type turkeys. **Veterinarija Ir Zootechnika**, v. 52, n. 74, 2010.

LEUNG, K. Y.; MILLS, K.; BURREN, K. A.; COPP, A. J.; GREENE, N. D. E. Quantitative analysis of *myo*-inositol in urine, blood and nutritional supplements by high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **J. Chromatography, Analyt. Tech. Biomed. Life Sci.**, v. 87, p. 2759-2763, 2011.

LUDTKE, C. B., CIOCCA, J.R.P., DANDIN, T., BARBALHO, P.C., VILELA, J.A. *Abate humanitário de aves*. 1st ed. World Society for the Protection of Animals, Copacabana, Rio de Janeiro, 2010.

PIRGOZLIEV, V.; BEDFORD, M. R.; ACAMOVIC, T.; ALLIMEHR, M. The effects of supplementary bacterial phytase on dietary true metabolisable energy, nutrient digestibility and endogenous losses in precision fed turkeys. **Brit. Poult. Sci.**, v. 52, p. 214-220, 2011.

PIRGOZLIEV, V.; ODUGUWA, O.; ACAMOVIC, T.; BEDFORD, M. R.; Diets containing escherichia coli-derived phytase on young chickens and turkeys: effects on performance, metabolizable energy, endogenous secretions, and intestinal morphology. **Poult Sci.**, v. 86, p. 705-713, 2007.

RAVINDRAN, V.; HEW, L. I.; RAVINDRAN, G.; BRYDEN, W. L. A comparison of ileal digesta and excreta analysis for the determination of amino acid

digestibility in food ingredients for poultry. **Brit. Poult. Sci.**, v. 40, p. 266-274, 1999.

RAVINDRAN, V.; MOREL, P. C. H.; PARTRIDGE, G. G.; HRUBY, M.; SANDS, J. S. Influence of an *E. coli*-derived phytase on nutrient utilization in broiler starters fed diets containing varying concentrations of phytic acid. **Poult. Sci.**, v. 85, p. 82-89, 2006.

REZVANI, M. R.; RODEHUTSCORD, M.; OMMATI, M. M. Efficacy of phytase preparations to improve P availability in young turkeys. **Iran. Agric. Res.**, v. 28, p. 89-98, 2009.

RODEHUTSCORD, M.; DIECKMANN, A. Comparative studies with three-week-old chickens, turkeys, ducks, and quails on the response in phosphorus utilization to a supplementation of monobasic calcium phosphate. **Poult. Sci.**, v. 84, p. 1252–1260, 2005.

SCOTT, T. A.; BOLDADI, F. Comparison of inert markers [chromic oxide or insoluble ash (CeliteTM)] for determining apparent metabolizable energy of wheat- or barley- based broiler diets with or without enzymes. **Poult. Sci.**, v. 76, p. 594–598, 1997.

SEEDOR, J. G. The biophosphonate alendronate (MK-217) inhibit bone loss due to ovariectomy in rats. **J. Bone Min. Res.**, v. 4, p. 265-270, 1993.

SELLE, P. H.; RAVINDRAN, V. Microbial phytase in poultry nutrition. **Anim. Feed Sci. Technol.**, v. 135, p. 1–41, 2007.

SOMMERFELD, V.; KUNZEL, S.; SCHOLLENBERGER, M.; KUHN, I.; RODEHUTSCORD, M. Influence of phytase or *myo*-inositol supplements on performance and phytate degradation products in the crop, ileum, and blood of broiler chickens. **Poult. Sci.**, v. 97, p. 920-929, 2018.

TAMIM, N. M.; ANGEL, R.; CHRISTMAN, M. Influence of dietary calcium and phytase on phytate phosphorus hydrolysis in broiler chickens. **Poult. Sci.**, v. 83, p. 1358–1367, 2004.

TOOR, G. S.; PEAK, J. D.; SIMS, J. T. Phosphorus speciation in broiler litter and turkey manure produced from modified diets. **Journal of Environmental Quality**, v. 697, p. 687–697, 2005.

WALK, C. L.; BEDFORD, M. R.; SANTOS, T. S.; PAIVA, D.; BRADLEY, J. R.; WLADECKI, H.; HONAKER, C.; McELROY, A. P. Extra-phosphoric effects of superdoses of a novel microbial phytase. **Poult. Sci.**, v. 92, n. 3, p. 719–725, 2013.

WALK, C. L.; OLUKOSI, O. A. Influence of graded concentrations of phytase in high-phytate diets on growth performance, apparent ileal amino acid digestibility, and phytate concentration in broilers from hatch to day 28 post-hatch. **Poult. Sci.**, p. 1-10, 2019.

WALK, C. L.; RAMA RAO, S. V. Dietary phytate has a greater anti-nutrient effect on feed conversion ratio compared to body weight gain and greater doses of phytase are required to alleviate this effect as evidenced by prediction equations on growth performance, bone ash and phytate degradation in broilers. **Poult. Sci.**, v. 99, p. 246-255, 2020.

WEALLEANS, A. L.; BARNARD, L. P.; ROMERO, L. F.; KWAKERNAAK, C. A. A value based approach to determine optimal phytase dose: A case study in turkey poults. **Anim. Feed Sci. Tech.**, v. 216, p. 288–295, 2016.

ZELLER, E.; SCHOLLENBERGER, M.; KÜHN, I.; RODEHUTSCORD, M. Dietary effects on inositol phosphate breakdown in the crop of broilers. **Arch. Anim. Nutr.**, v. 70, p. 57–71, 2016.

4. DIFERENTES DOSES DE FITASE E PH DE ÁGUA SOBRE DESEMPENHO, APROVEITAMENTO DA DIETA, MINERALIZAÇÃO ÓSSEA E INOSITOL CIRCULANTE EM PERUS

(Different phytase doses and drinkable water pH on performance, diet utilization, bone mineralization and circulating inositol of turkey poults)

RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos da suplementação de diferentes doses de fitase e pH da água em dietas para perus. 420 perus de um dia de idade foram distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 3x2: 3 doses de fitase (0, 1000 e 2500 FYT/kg) e 2 valores de pH da água (5,5 e 8,2), com 6 tratamentos e 7 repetições de 10 aves cada. Foram avaliados consumo de ração (CR), ganho de peso (GP), conversão alimentar (CA) e ingestão de água (IA) de 1-21 dias de idade; Digestibilidade e metabolizabilidade aparente da dieta; Energia aparente digestível (EDA) e metabolizável (EMA); Resíduo mineral, Ca, P e Índice de Seedor na tíbia; pH da moela; Concentração plasmática de inositol. Ambas as doses de fitase melhoraram igualmente o GPM e CA em comparação a dieta sem enzima ($P < 0,05$). A IA não foi afetada pelos tratamentos e não houve efeito do pH da água sobre desempenho ($P > 0,05$). O uso de fitase melhorou significativamente a digestibilidade e metabolizabilidade da dieta e utilização de energia ($P < 0,05$). A digestibilidade de Ca e P foi maior em pH 8,2 e a dose de 1000 FYT/kg foi mais eficaz em pH 8,2 para EDA e EMA, enquanto a digestibilidade e metabolizabilidade da matéria seca e proteína foram maiores em pH 5,5. Contudo ao aumentar a dose para 2500 FYT/kg as variáveis de utilização da dieta foram semelhantes em ambos os pH. A inclusão de fitase também aumentou o teor de minerais nas tibias e a concentração de inositol livre no plasma ($P < 0,05$), que não foram afetados pelo pH da água. O pH da moela não foi afetado pelos tratamentos ($P > 0,05$). A influência do pH da água sobre utilização da dieta para perus gerou resultados conflitantes. Todavia, o aumento da dose de fitase para 2500 FYT/kg demonstrou a maior efetividade de dosagens mais altas da enzima em otimizar o aproveitamento da dieta de perus, refletindo em melhor desempenho, mineralização óssea e disponibilização de inositol.

Palavras-chave: Digestibilidade. Enzimas. Inositol. Metabolizabilidade. pH da água.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effects different phytase doses and drinkable water pH on turkey poult diets. 420 one-d-old turkeys were distributed in a completely randomized design in a 3x2 factorial scheme: 3 phytase doses (0, 1000 and 2500 FYT/kg) and 2 water pH levels (5.5 and 8.2), with 6 treatments and 7 replicates of 10 birds. Analyzed variables were: Feed intake (FI), weight gain (WG), feed conversion (FC) and water ingestion (WI) from 1-21 days; Apparent digestibility and metabolizability of the diet; Apparent digestible and metabolizable energy (ADE; AME); Mineral residue, Ca, P and Seedor Index in the tibia; Plasmatic myo-inositol concentration; Gizzard pH. Both phytase doses equally improved WG and FC compared to unsupplemented diet ($P<0.05$). WI was not affected by the treatments, and water pH did not affect performance ($P>0.05$). Use of phytase significantly improved dietary digestibility and metabolizability and energy utilization ($P<0.05$). Ca and P digestibility were higher with 8.2 water pH, and the dose 1000 FYT/kg was more effective for ADE and AME at 8.2 water pH, whereas dry matter and protein digestibility and metabolizability were higher at 5.5 pH. When increasing the dose to 2500 FYT/kg, however, diet utilization was similar for both pH levels. Phytase also increased mineral concentration on tibia and plasmatic inositol ($P<0.05$), which were not influenced by water pH. Gizzard pH remained the same for all treatments ($P>0.05$). Influence of water pH on turkey diet utilization provided conflicting results. Nonetheless, it's effects were nullified by increasing phytase to 2500 FYT, showing a better effectiveness of high phytase dosage for optimizing diet utilization, reflecting on a better performance, bone mineralization and inositol provision for turkeys.

Key-words: Digestibility. Enzymes. Inositol. Metabolizability. Water pH.

4.1 INTRODUÇÃO

Em ingredientes vegetais, amplamente utilizados na nutrição de aves, o armazenamento do mineral fósforo se dá na forma de ácido fítico (mio-inositol-1,2,3,4,5,6-hexafosfato; IP_6), presente nestes alimentos em diferentes concentrações. Esta substância é tipicamente encontrada na forma de sal, denominada fitato, usualmente complexada com outros nutrientes além de P, tais como Ca, Mg, K, podendo até mesmo formar complexos com proteínas e aminoácidos (COWIESON et al., 2009).

A suplementação de fitase exógena na dieta das aves visa compensar a baixa produção endógena da enzima e combater os efeitos antinutricionais do fitato, aumentando a disponibilidade de P (INGELMANN et al., 2018). Além disso, a ocorrência de efeitos extra-fosfóricos têm sido associada ao uso de doses altas de fitase para frangos e perus, baseados na intensificação de hidrólise do fitato e melhoras no aproveitamento de proteínas, aminoácidos e energia da dieta (WALK; RAMA RAO, 2020; DERSJANT-LI; KWAKERNAAK, 2019; COWIESON et al., 2017; PIRGOZLIEV et al., 2011).

A interação entre o fitato e outros componentes da dieta é fortemente influenciada pelo pH do trato gastrointestinal, dentre outros fatores. Em pH mais ácidos os quelatos de fitato são mais solúveis e portanto mais susceptíveis a hidrólise (LIEBERT et al., 1993), enquanto em pH mais neutros a molécula de fitato apresenta maior afinidade por cátions, propiciando a complexação com outros nutrientes (AMERAH et al., 2014; SHANMUGAN, 2018). Por conta deste aspecto, a maior parte das fitases disponíveis comercialmente são as chamadas fitases ácidas, cuja atividade é estimulada em pH baixos (NAVES et al., 2012).

A porção superior do trato gastrointestinal das aves domésticas, essencialmente o papo, proventrículo e moela apresentam um perfil de pH ácido, em torno de 2,5 a 5,0, enquanto a partir do intestino delgado o pH se eleva, variando de 5,7 a 6,5 (RUTZ et al., 2015). Entretanto, estes valores de pH podem ser alterados por fatores externos como por exemplo uso de dietas contendo ácidos orgânicos ou pela acidificação e/ou alcalinização da água potável (HAMID et al., 2018; PESTI et al., 2004). Desta forma, pressupõe-se que o pH da água oferecida aos animais pode exercer influência sobre a atividade ótima da fitase.

Os estudos envolvendo doses altas de fitase para perus de corte, superiores a 1000 FTU/kg, são escassos, especialmente estudos que investiguem os efeitos de pH da água para perus ou que proponham a análise conjunta de ambos os fatores.

Por esses motivos, o objetivo do trabalho foi avaliar a interação entre diferentes doses de fitase e valores de pH da água sobre o desempenho, digestibilidade e metabolizabilidade da dieta, características de mineralização óssea e concentração de inositol plasmático em perus de corte.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Paraná, sob protocolo número 042/2018. Neste experimento, um total de 420 peruzinhos machos da linhagem Nicholas® Super Select, debicados ao primeiro dia de idade, foram alojados em uma sala com baterias de gaiolas metabólicas de 1 a 21 dias de idade. Cada bateria consistia em quatro andares com duas gaiolas por andar, cada gaiola medindo 0,98m comprimento x 0,90m largura x 0,50m altura, sendo alojados 10 animais por gaiola. A sala dispunha de iluminação artificial e o controle de temperatura era feito por uso de aquecedores e fechamento e abertura de janelas. Diariamente eram verificadas a temperatura, umidade do ar e mortalidade das aves, retirando-se das gaiolas as aves mortas. A temperatura foi ajustada para 30°C no dia 1 e gradualmente reduzida a 25°C até os 21 dias. Ração e água foram oferecidos *ad libitum* durante todo o período experimental em comedouros do tipo calha e bebedouros de plástico tipo nipple.

As aves foram distribuídas em um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 3x2, com 3 doses de fitase (0, 1000 e 2500 FYT/kg) e 2 pH da água (5,5 e 8,2), totalizando 6 tratamentos com 7 repetições de 10 aves cada. As dietas experimentais foram produzidas a base de milho e farelo de soja (Tabela 9), variando apenas quanto a dose de fitase utilizada. A enzima fitase utilizada no experimento foi a RONOZYME® Hiphos GT (DSM Nutritional Products, Kaiseraugst, Suíça), uma 6-fitase originada de *Citrobacter braakii* e expressada em *Aspergillus oryzae* com atividade de 20.000 FYT/kg de produto. Uma unidade de fitase (FYT) é definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de fosfato inorgânico por minuto a partir de um fitato de Na de 0,0051 mol L⁻¹ em pH 5,5 e a temperatura de 37°C (ENGELLEN et al., 1994).

Os pH foram obtidos pela adição de uma solução a base de hidróxido de sódio (NaOH) na proporção 22 $\mu\text{l/l}$ de água para atingir pH 8,2 e uma solução diluída de ácido clorídrico (HCl, na concentração 1 mol/L) na proporção 0,28ml/l para atingir pH 5,5. O procedimento para alteração de pH era realizado rotineiramente antes do fornecimento de água aos animais, tomando-se o devido cuidado para manusear a água apenas com objetos plásticos, evitando o contato com materiais metálicos que pudessem modificar o pH indesejavelmente.

As variáveis de desempenho de a 1 a 21 dias foram obtidas por meio da pesagem dos animais e sobras de ração para cálculo do consumo de ração médio (CR), ganho de peso médio (GP) e conversão alimentar (CA). Diariamente foi fornecido às aves uma quantidade já definida de água, cujas sobras foram pesadas também diariamente para cálculo da ingestão média de água (IA) por ave durante o período de 1 a 21 dias.

Aos 21 dias de idade, cinco animais por repetição foram selecionados ao acaso e eutanaziados por meio de deslocamento cervical, de acordo com os cinco passos descritos por Ludtke et al. (2010), para coleta de conteúdo ileal. O conteúdo foi definido pela região coletada, estabelecida em 2 cm acima da junção íleo-cecal e 2 cm abaixo do divertículo de Meckel. Imediatamente após a coleta, as amostras de conteúdo ileal foram armazenadas em sacos plásticos apropriados e identificados e congeladas a -18°C. Anteriormente as análises, as amostras foram descongeladas até atingir temperatura ambiente. Amostras das dietas experimentais e de conteúdo ileal foram então secas em estufa a 105°C, homogeneizadas e moídas a 0,5 mm para análise do teor de matéria seca (MS), resíduo mineral (RM), proteína bruta (PB), Ca e P de acordo com metodologia da *Association of Official Analytical Chemists* (métodos 984,20; 942,05; 954,01; 927,02 e 965,17, respectivamente) (AOAC, 1995).

Amostras parciais de excretas foram coletadas diariamente no período de 19 a 21 dias de idade, com uma coleta por dia. As excretas eram armazenadas em sacos plásticos apropriados e identificados, atentando-se para evitar contaminação por penas e/ou ração no momento da coleta, e congeladas em freezer a -18°C. As excretas foram então descongeladas a temperatura ambiente, secas em estufa a 105°C, homogeneizadas e moídas a 0,5 mm e analisadas quanto ao teor de MS, RM, PB, Ca e P de acordo com os métodos descritos anteriormente e também o teor de Na (método 969,23) (AOAC, 1995).

A determinação de Cinzas Insolúveis em Ácido (CIA) nas amostras de dieta, conteúdo ileal e excretas foi realizada de acordo com metodologia de Scott e Boldaji (1997). Com base nos resultados da análise das dietas, excretas e conteúdo ileal, os coeficientes de digestibilidade ileal aparente (CDIA) e de metabolizabilidade aparente das excretas (CMA) e foram calculados pela seguinte equação:

$$CDIA \text{ ou } CMA (\%) = \frac{(Nutriente \text{ na dieta}) - (Nutriente \text{ na digesta ileal ou excreta} \times FI)}{Nutriente \text{ na dieta}}$$

Onde FI é o Fator de Indigestibilidade, obtido pela diferença entre a quantidade de CIA na dieta e CIA na digesta ileal ou excreta. A energia digestível ileal aparente (EDA) e energia metabolizável aparente das excretas (EMA) foram calculados após aferido o valor de energia bruta (EB) das amostras de dieta, excretas e conteúdo ileal por uso de uma bomba calorimétrica (Ika Werke C2000 Control Oxygen Bomb Calorimeter, Ika-Werke GmbH&Co, Staufen, Alemanha). O cálculo de EMA e EDA foi feito pela seguinte equação:

$$EMA \text{ ou } EDA (kcal/kg \text{ MS}) = EB \text{ da dieta} - (EB \text{ da excreta ou digesta ileal} \times FI)$$

Duas das aves eutanasiadas aos 21 dias tiveram as pernas esquerdas removidas para coleta do osso tibial. As tíbias foram limpas com éter para remoção de restos de músculo e gordura, secas em estufa a 105° C e queimadas em forno mufla a 600°C para análise do conteúdo de RM, Ca e P de acordo com métodos da AOAC (1995) descritos anteriormente. Previamente, o Índice de Seedor das tíbias foi calculado dividindo-se o peso do osso pelo comprimento como indicativo de densidade óssea (Seedor, 1993). O comprimento e peso ósseo foram aferidos com paquímetro digital e balança digital calibrada para escala de 0,0001 grama. As mesmas aves também tiveram a moela removida para medição do pH interno por uso de pHmetro de bancada (Gehaka® pHmetro PG1800, São Paulo, SP, Brasil). O pH foi medido imediatamente por meio de uma secção no órgão para inserção do eletrodo do aparelho.

Ainda aos 21 dias, duas aves por repetição foram usadas para coleta de 3 a 5 mL de amostras de sangue, com uso de tubos Vacuntainer® com heparina. Imediatamente após coleta de sangue, os tubos foram centrifugados a 3000 rpm por 10 minutos para separar o plasma sanguíneo. Após centrifugação, o plasma obtido foi armazenado em microtubos graduados e congelados a -20° C antes de envio para análise. A concentração de mioinositol no plasma foi então determinada por espectrometria em massa utilizando um sistema UPLC-TQD (ACQUITY UPLC® System, Waters, Milford, MA, EUA) de acordo com método descrito por Leung et al. (2011).

Para análise estatística, foi determinada normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk e após detectada distribuição normal, os dados foram

submetidos a análise de variância. Quando significativas, as médias e interações foram comparadas por teste Tukey a 5% de significância. Para os efeitos de doses crescentes de fitase, foi realizada análise de regressão linear e quadrática em ambos os pH de água. Os procedimentos estatísticos foram feitos no pacote ExpDes do R® (Ferreira et al., 2011).

TABELA 9. INGREDIENTES E NÍVEIS NUTRICIONAIS DAS DIETAS.

Ingredientes (%)	0 FYT/kg	1000 FYT/kg	2500 FYT/kg
Milho	44,977	44,972	44,965
Farelo de soja	44,340	44,340	44,340
Gluten de milho	3,000	3,000	3,000
Óleo de soja	0,660	0,660	0,660
Fosfato bicálcico	2,710	2,710	2,710
Calcário	1,550	1,550	1,550
Sal	0,470	0,470	0,470
DL-Metionina	0,388	0,388	0,388
L-Lisina	0,401	0,401	0,401
Treonina	0,061	0,061	0,061
Valina	0,079	0,079	0,079
Premix vitamínico ^a	0,150	0,150	0,150
Premix mineral ^b	0,080	0,080	0,080
Premix 25(OH)D ₃ ^c	0,033	0,033	0,033
Cloreto de colina	0,080	0,080	0,080
Marcador (Celite)	1,000	1,000	1,000
Protease ^d	0,020	0,020	0,020
Fitase ^e	-	0,005	0,0125
Nutrientes			
EMA, Kcal/kg	2900	2900	2900
PB (%)	28,630	28,650	28,650
Metionina (%)	0,786	0,785	0,785
Met+Cis (%)	1,189	1,189	1,189
Lisina (%)	1,699	1,700	1,700
Treonina (%)	1,054	1,054	1,054
Isoleucina (%)	1,110	1,110	1,110
Leucina (%)	2,269	2,278	2,278
Valina (%)	1,258	1,258	1,258
Arginina (%)	1,785	1,785	1,785
Triptofano (%)	0,303	0,303	0,303
Ca (%)	1,518	1,339	1,339
P disponível (%)	0,800	0,650	0,650
Na (%)	0,200	0,200	0,200

^aROVIMIX®, suplementação por kg de produto: vitamina A, 11.000.000 UI; vitamina D3, 4.000.000 UI; vitamina E, 55.000 UI; vitamina K3, 3g; vitamina B1, 2.3g; vitamina B2, 7g; ácido pantotênico, 12g; vitamina B6, 4g; vitamina B12, 25mg; ácido nicotínico, 60g; ácido fólico, 2g; biotina, 250mg; selênio, 300mg.

^bROLIGOMIX®, suplementação por kg de produto: cobre, 20g; ferro, 100g; iodina, 2g; manganês, 130g; zinco, 130g.

^cPremix Hy•D® a 91 mg de 25(OH)D₃/ton de ração.

^dRonozyme ProAct (CT) com 15.000 PROT/kg de produto.

^eRonozyme Hiphos® com 20.000 FYT/kg de produto.

4.3 RESULTADOS

A análise de atividade de fitase mostra pouca variação dos níveis nas dietas suplementadas, e na dieta controle, permaneceram abaixo dos limites de detecção (Tabela 10).

TABELA 10. RECUPERAÇÃO DE FITASE NAS DIETAS EXPERIMENTAIS.

Tratamento	pH	Fitase, FYT/kg ¹	
		Declarado	Analisado
Controle	5.5	0	<LDD ²
Controle + 1000 FYT/kg	5.5	1000	1092
Controle + 2500 FYT/kg	5.5	2500	2800
Controle	8.2	0	<LDD
Controle + 1000 FYT/kg	8.2	1000	1133
Controle + 2500 FYT/kg	8.2	2500	3171

*Atividade da enzima é expressada como a quantidade de produto adicionada na ração.

¹FYT = Unidades de fitase por kg de ração.

²LDD = Limite de detecção.

Não houve interação entre os fatores para as variáveis de desempenho ou para IA ($P>0,05$; Tabela 11). A inclusão de fitase na dieta influenciou positivamente o GPM e CA dos perus ($P<0,05$) em comparação a dieta controle. Ambas as doses foram estatisticamente semelhantes para GPM e CA. Não houve efeito da fitase sobre CR ($P>0,05$), assim como não houve efeito do nível de pH da água sobre nenhuma das variáveis de desempenho ($P>0,05$). A IA não foi afetada pelas doses de fitase ou pH da água ($P>0,05$).

TABELA 11. CONSUMO DE RAÇÃO (CR), GANHO DE PESO (GP), CONVERSÃO ALIMENTAR (CA) E INGESTÃO DE ÁGUA (IA) DE 1 A 21 DIAS.

Tratamento	CR (g)	GP (g)	CA (g/g)	IA (g)
Efeito da fitase				
0 FYT/kg	975,76	589,81 ^b	1,660 ^a	121,94
1000 FYT/kg	1003,80	625,93 ^{ab}	1,604 ^b	121,65
2500 FYT/kg	1008,50	634,09 ^a	1,590 ^b	123,66
Efeito do pH de água				
5,5	980,12	605,66	1,628	124,45
8,2	1001,91	629,56	1,610	120,39
P-valor				
Fitase	0,322	0,030	0,003	0,855
pH	0,101	0,062	0,215	0,213
Interação	0,975	0,987	0,999	0,155
CV ¹ (%)	6,15	7,30	3,23	8,48

¹Coeficiente de Variação

Médias seguidas por letras minúsculas sobrescritas diferem pelo teste Tukey a 5%.

As dietas suplementadas com fitase resultaram em aumento do CDIA de RM, PB e P, sendo que a inclusão de 2500 FYT/kg foi superior a inclusão de 1000 FYT/kg, ambas com resultados melhores que a dieta controle ($P < 0.05$; Tabela 12) para as três variáveis. Quanto ao efeito do fator pH de água, houve diferença significativa somente para P, cuja digestibilidade foi maior nas aves que beberam água com pH 8,2.

TABELA 12. DIGESTIBILIDADE ILEAL APARENTE DO RESÍDUO MINERAL (RM), PROTEÍNA BRUTA (PB) E FÓSFORO.

Tratamento	RM (%)	PB (%)	P (%)
Efeito da fitase			
0 FYT/kg	50,16 ^c	85,24 ^b	63,83 ^c
1000 FYT/kg	57,70 ^b	87,59 ^{ab}	70,68 ^b
2500 FYT/kg	62,15 ^a	88,11 ^a	75,42 ^a
Efeito do pH de água			
5,5	55,76	86,28	68,41
8,2	57,58	87,50	71,38
P-valor			
Fitase	<0,001	0,031	<0,001
pH	0,303	0,133	0,040
Fitase*pH	0,719	0,874	0,873
CV ¹ (%)	9,33	3,38	7,29

¹Coeficiente de Variação

Médias seguidas por letras minúsculas sobrescritas diferem pelo teste Tukey a 5%.

Ainda em relação aos resultados de digestibilidade, foi observada interação entre os fatores para o CDIA de MS e Ca, bem como para EDA ($P < 0,05$). Conforme o desdobramento da interação (Tabela 13), as dietas com inclusão de 2500 FYT/kg resultaram em maior digestibilidade de MS quando as aves ingeriram água acidificada de pH 5,5, enquanto a digestibilidade de Ca foi maior com a ingestão de água alcalinizada e dose de 2500 FYT/kg. Resultados de EDA foram maiores com a suplementação de 2500 FYT/kg em ambos os pH da água, porém ambas as doses de fitase tiveram resultado semelhante de EDA nos perus que ingeriram água alcalinizada.

As figuras 10, 11 e 12 elucidam a análise de regressão para a interação entre os fatores para CDIA de MS e Ca e EDA, respectivamente. Conforme mostra a análise, a fitase aumentou linearmente a CDIA de MS e EDA em perus ingerindo água acidificada, porém houve uma queda em ambas as variáveis com ingestão de água alcalinizada. Para CDIA de Ca, foi observado efeito linear somente com perus ingerindo água de pH 8,2.

TABELA 13. DESDOBRAMENTO DA INTERAÇÃO - DIGESTIBILIDADE ILEAL APARENTE DA MATÉRIA SECA (MS), CÁLCIO E ENERGIA DIGESTÍVEL APARENTE.

Fitase	MS (%)		Ca (%)		EDA (kcal)	
	pH 5,5	pH 8,2	pH 5,5	pH 8,2	pH 5,5	pH 8,2
0 FYT/kg	66,31 ^d	67,70 ^{cd}	58,08 ^b	60,15 ^b	3017 ^c	3165 ^c
1000 FYT/kg	71,48 ^{bc}	73,09 ^{ab}	61,61 ^b	72,29 ^a	3201 ^{bc}	3461 ^a
2500 FYT/kg	76,89 ^a	72,68 ^{ab}	63,64 ^b	74,34 ^a	3460 ^a	3400 ^a
P-valor						
Fitase*pH	0,021		0,018		0,004	
P-linear	<0,001	<0,002	0,100	<0,001	<0,001	<0,001
P-quadrática	0,943	<0,001	0,784	0,118	0,624	<0,001
CV ¹ (%)	4,18		6,76		3,75	

¹Coeficiente de Variação

Médias seguidas por letras minúsculas sobrescritas diferem pelo teste Tukey a 5%.

FIGURA 10. DIGESTIBILIDADE ILEAL APARENTE DA MATÉRIA SECA COM DOSES CRESCENTES DE FITASE E DOIS PH DA ÁGUA.

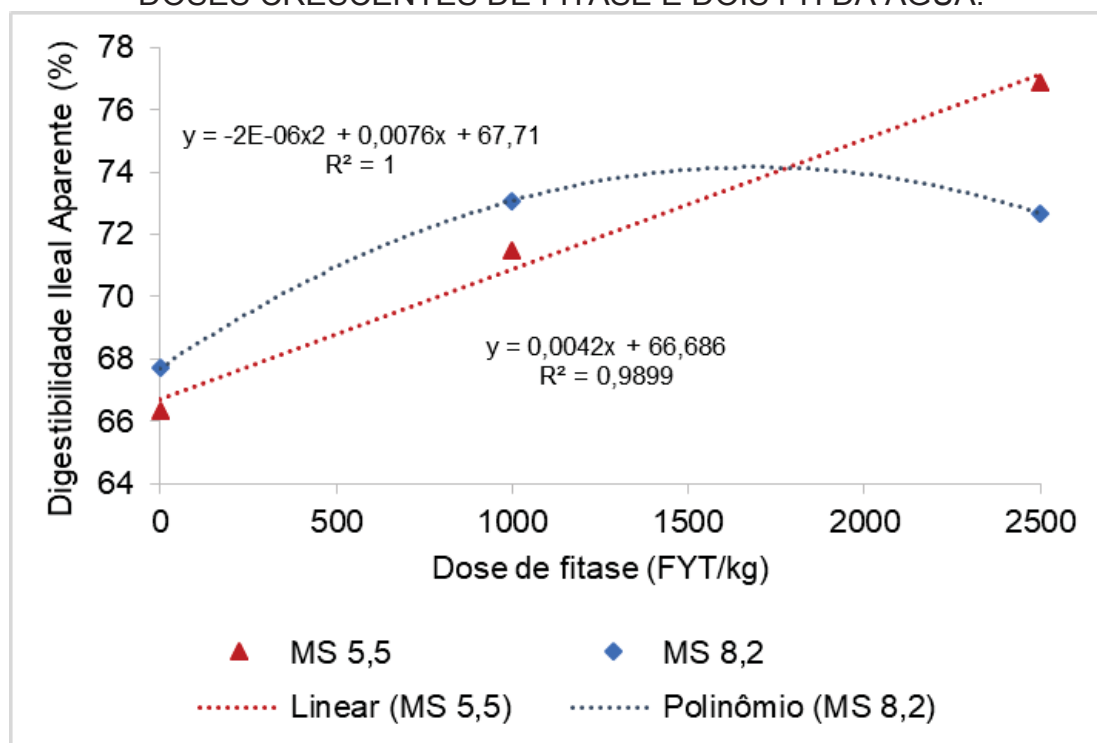
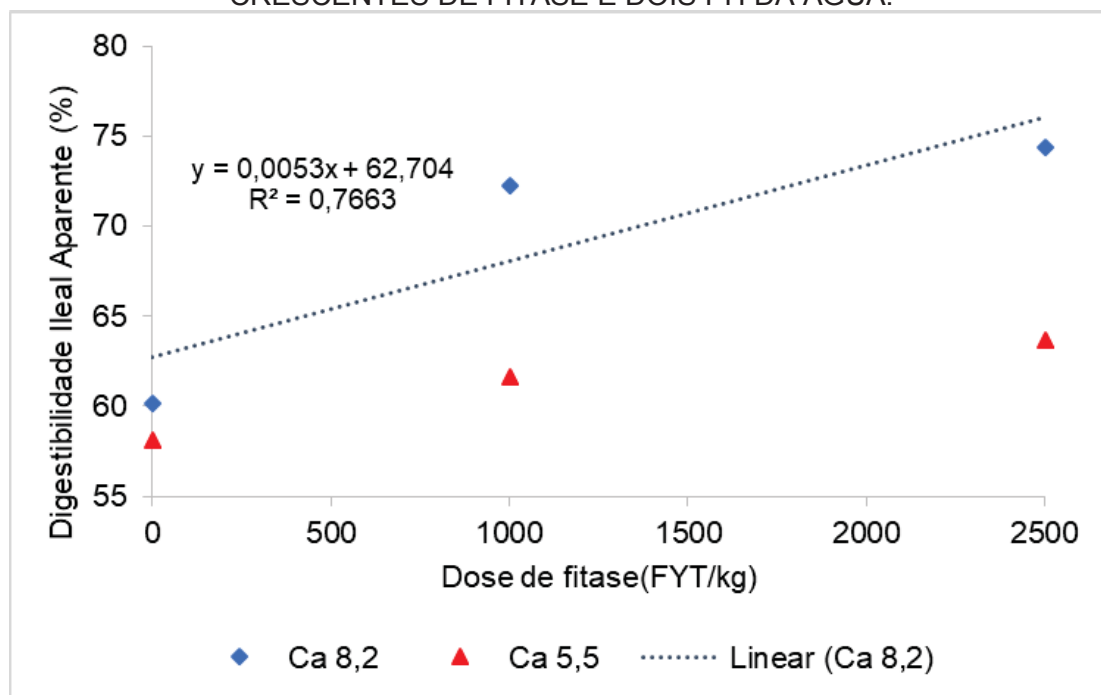
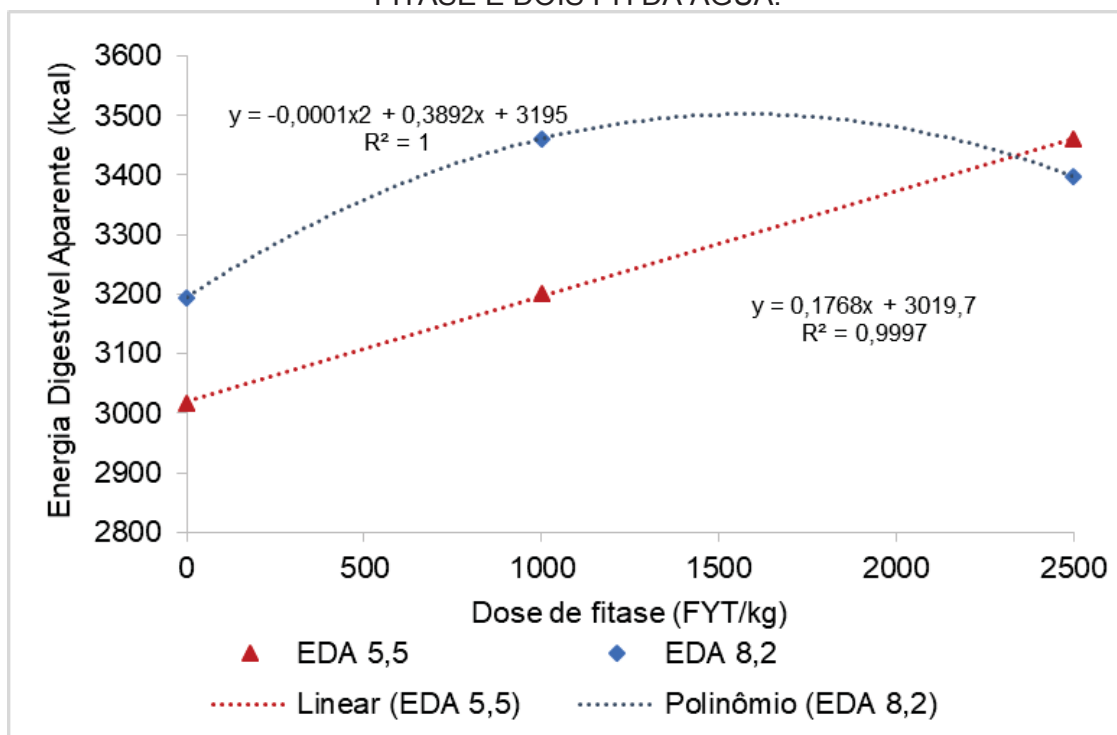


FIGURA 11. DIGESTIBILIDADE ILEAL APARENTE DO CÁLCIO COM DOSES CRESCENTES DE FITASE E DOIS PH DA ÁGUA.



FONTE: O autor (2020)

FIGURA 12. ENERGIA DIGESTÍVEL APARENTE COM DOSES CRESCENTES DE FITASE E DOIS PH DA ÁGUA.



FONTE: O autor (2020)

A análise de excretas mostra que a inclusão de fitase na dieta aumentou o CMA de MS, PB e Ca (Tabela 14; $P < 0,05$). Para MS, a dose de 2500 FYT/kg foi superior aos demais tratamentos, enquanto para PB e Ca ambas as doses de fitase foram semelhantes e superiores a dieta sem enzima. O nível de pH da água afetou somente o CMA de PB, que foi maior para os perus que ingeriram água acidificada ($P < 0,05$).

TABELA 14. METABOLIZABILIDADE APARENTE DA MATÉRIA SECA (MS), PROTEÍNA BRUTA (PB) E CÁLCIO.

Tratamento	MS (%)	PB (%)	Ca (%)	Na (%)
Efeito da fitase				
0 FYT/kg	67,81 ^c	56,34 ^b	33,44 ^b	51,47 ^b
1000 FYT/kg	72,43 ^b	64,61 ^a	45,56 ^a	56,76 ^a
2500 FYT/kg	75,12 ^a	65,80 ^a	45,66 ^a	60,38 ^a
Efeito do pH de água				
5,5	72,04	64,18 ^a	40,05	56,07
8,2	71,53	60,32 ^b	41,06	56,34
P-valor				
Fitase	<0,001	<0,000	<0,001	<0,001
pH	0,666	0,017	0,086	0,834
Fitase*pH	0,100	0,334	0,144	0,848
CV ¹ (%)	5,25	8,07	12,87	7,30

¹Coeficiente de Variação

Médias seguidas por letras minúsculas sobrescritas diferem pelo teste Tukey a 5%.

Além disso, foi observada interação entre os fatores para metabolizabilidade de RM e P e também para EMA ($P < 0,05$). Conforme valores apresentados no desdobramento da interação (Tabela 15), o CMA de RM e P foi maior nas dietas com inclusão de 2500 FYT/kg em ambos os pH da água. No entanto, com a mesma dosagem de 2500 FYT, o valor de EMA foi maior quando as aves ingeriram água com pH 5,5.

As figuras 13, 14 e 15 elucidam a análise de regressão para a interação entre os fatores para CMA de RM e P e EMA, respectivamente. Conforme mostra a análise, a fitase aumentou linearmente a CDIA de MS e EDA em perus ingerindo água acidificada, porém houve uma queda em ambas as variáveis com ingestão de água alcalinizada. Para CDIA de Ca, foi observado efeito linear somente com perus ingerindo água de pH 8,2.

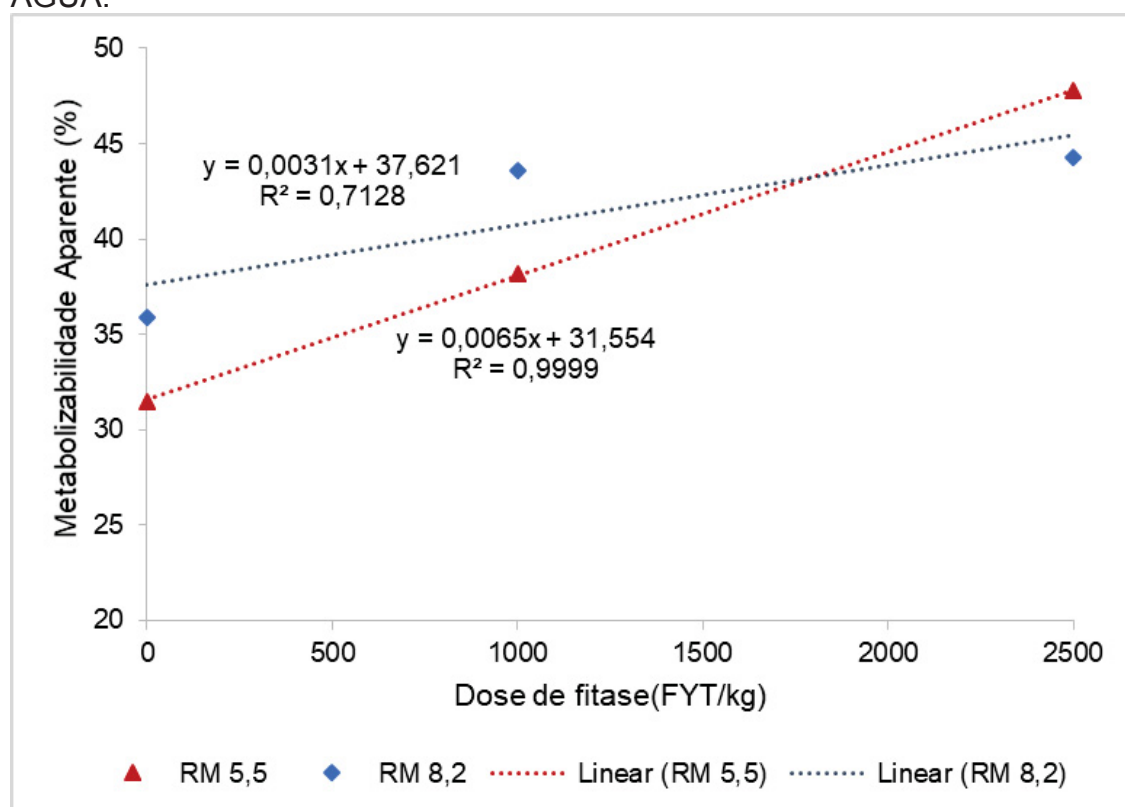
TABELA 15. DESDOBRAMENTO DA INTERAÇÃO - METABOLIZABILIDADE APARENTE DO RESÍDUO MINERAL (RM), FÓSFORO E ENERGIA METABOLIZÁVEL APARENTE (EMA).

Fitase	RM (%)		P (%)		EMA (kcal)	
	pH 5,5	pH 8,2	pH 5,5	pH 8,2	pH 5,5	pH 8,2
0 FYT/kg	31,49 ^d	35,99 ^{cd}	45,35 ^c	52,47 ^b	3011 ^d	3189 ^c
1000 FYT/kg	38,16 ^{bc}	43,62 ^{ab}	52,83 ^b	58,13 ^{ab}	3282 ^{bc}	3458 ^{ab}
2500 FYT/kg	47,76 ^a	44,29 ^a	61,58 ^a	60,86 ^a	3496 ^a	3420 ^{ab}
P-valor						
Fitase*pH	0,005		<0,001		0,001	
P-linear	<0,001	0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
P-quad	0,474	0,209	0,769	0,200	0,616	0,004
CV ¹ (%)	9,22		6,80		3,02	

¹Coefficiente de Variação

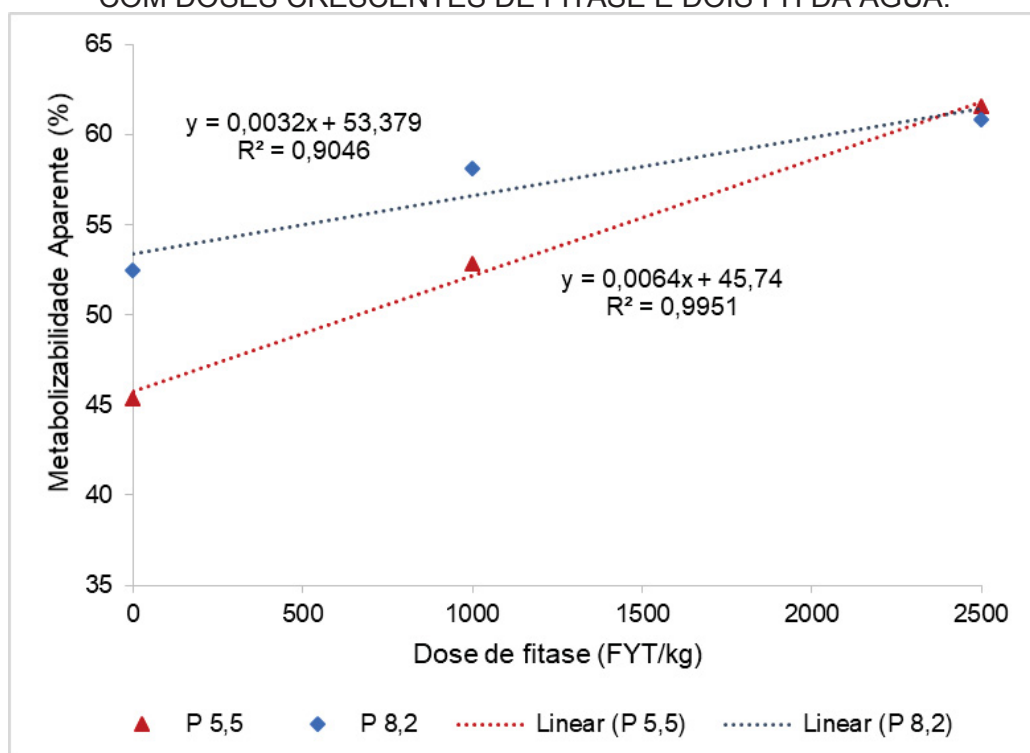
Médias seguidas por letras minúsculas sobrescritas diferem pelo teste Tukey a 5%.

FIGURA 13. COEFICIENTE DE METABOLIZABILIDADE APARENTE DO RESÍDUO MINERAL COM DOSES CRESCENTES DE FITASE E DOIS PH DA ÁGUA.



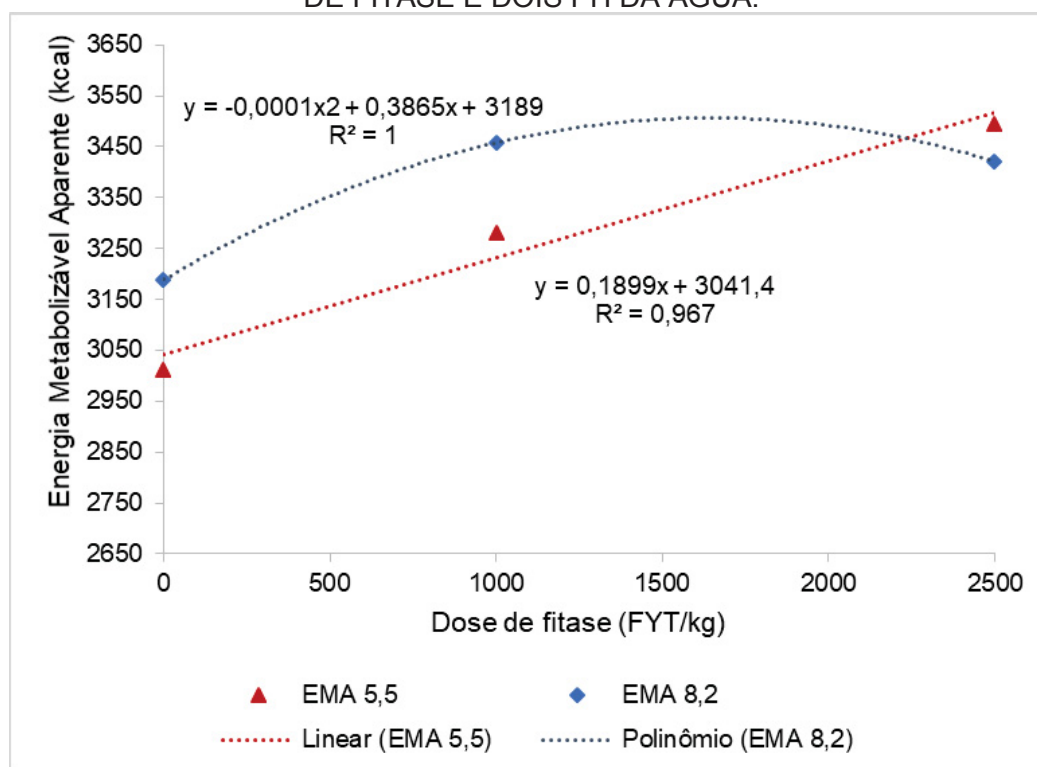
FONTE: O autor (2020)

FIGURA 14. COEFICIENTE DE METABOLIZABILIDADE APARENTE DO FÓSFORO COM DOSES CRESCENTES DE FITASE E DOIS PH DA ÁGUA.



FONTE: O autor (2020)

FIGURA 15. ENERGIA METABOLIZÁVEL APARENTE COM DOSES CRESCENTES DE FITASE E DOIS PH DA ÁGUA.



FONTE: O autor (2020)

Não foi observada interação entre os fatores para as variáveis de composição óssea analisadas nas tíbias dos perus ($P < 0.05$) (Tabela 16). Quando avaliando os fatores em separado, os perus alimentados com dieta contendo 2500 FYT/kg tiveram maiores teores de RM, Ca e P na tíbia em comparação a dieta controle ($P < 0,05$), enquanto a dosagem de 1000 FYT foi estatisticamente semelhante a ambas. Não foi observado efeito do nível de pH da água sobre a composição mineral das tíbias, assim como não houve efeito dos tratamentos sobre a variável SI ($P > 0,05$).

TABELA 16. TEOR DE RESÍDUO MINERAL (RM), CÁLCIO E FÓSFORO NA TÍBIA E ÍNDICE DE SEEDOR

Tratamento	RM (%)	Ca (%)	P (%)	Seedor
Efeito da fitase				
0 FYT/kg	49,71 ^b	17,37 ^b	8,20 ^b	25,57
1000 FYT/kg	50,45 ^{ab}	18,45 ^{ab}	8,53 ^{ab}	26,35
2500 FYT/kg	51,43 ^a	19,23 ^a	8,92 ^a	26,47
Efeito do pH de água				
5,5	50,43	18,47	8,56	26,08
8,2	50,62	18,22	8,54	26,19
P-valor				
Fitase	0,003	0,009	<0,001	0,565
pH	0,605	0,605	0,875	0,882
Fitase*pH	0,996	0,674	0,691	0,744
CV ¹ (%)	2,43	8,28	4,15	9,13

¹Coeficiente de Variação

Médias seguidas por letras minúsculas sobrescritas diferem pelo teste Tukey a 5%.

Não foi observada interação entre os tratamentos para concentração de inositol no plasma dos perus e para pH da moela (Tabela 17; $P > 0,05$). Separadamente, apenas o fator fitase demonstrou efeito significativo sobre o inositol plasmático, cuja concentração da substância foi maior nos animais alimentados com as dietas contendo enzima, independente da dose, em comparação aos que receberam dieta controle ($P < 0,05$). O pH da água não exerceu influência sobre a concentração de inositol no plasma dos perus ($P > 0,05$). As diferentes doses de fitase e pH da água, quando avaliados separadamente também não exerceram efeito significativo sobre o pH da moela ($P > 0,05$).

TABELA 17. CONCENTRAÇÃO DE INOSITOL PLASMÁTICO E PH DA MOELA DE PERUS.

Tratamento	Inositol ($\mu\text{mol/L}$)	pH moela
Efeito da fitase		
0 FYT/kg	186.82 ^b	3,25
1000 FYT/kg	232.17 ^a	3,52
2500 FYT/kg	236.26 ^a	3,43
Efeito do pH e água		
5,5	217.31	3,32
8,2	219.52	3,50
P-valor		
Fitase	0.003	0,620
pH	0.867	0,503
Fitase*pH	0.880	0,688
CV ¹ (%)	19.43	16,38

¹Coeficiente de Variação

Médias seguidas por letras minúsculas sobrescritas diferem pelo teste Tukey a 5%.

4.4 DISCUSSÃO

O desempenho dos perus foi melhorado com adição de altas doses de fitase na dieta. Foi gerado um aumento de 7,51% para GPM e redução de 4,4% para CA comparando a dose de 2500 FYT/kg com a dieta sem suplementação, como um possível reflexo da maior disponibilidade de nutrientes resultante da hidrólise de fitato na presença da enzima. Os resultados estão em conformidade com os encontrados por Pirgozliev et al. (2007), que também observaram melhor no ganho de peso e eficiência alimentar de perus alimentados com doses de fitase de até 2500 FYT/kg. De acordo com estes autores, os ganhos no desempenho com uso de fitase são ainda mais expressivos em perus comparados a frangos de corte.

A oferta de água acidificada (pH 5,5) ou alcalinizada (pH 8,2) não exerceu efeito significativo sobre o desempenho dos perus. Os resultados diferem do observado por outros autores em relação ao tratamento de pH da água para frangos de corte. Segundo Yang et al. (2009) e Hamid et al. (2018), a água acidificada por uso de ácidos orgânicos melhora o desempenho por trazer benefícios a flora intestinal e auxiliar na eliminação de patógenos. Por outro lado, outros estudos relatam não haver influência do pH da água sobre desempenho de frangos (AÇIKGÖZ et al., 2011) e perus (CORNELISON et al., 2005).

Segundo Watkins et al. (2008), a elevação do pH da água pode causar uma característica indesejável de amargura no sabor, e o mesmo pode ser causado pela acidificação excessiva (AÇIKGÖZ et al., 2011) o que induz a redução na ingestão de água em aves. Contudo, neste estudo a ingestão de água se manteve inalterada tanto pela elevação quanto diminuição do pH da água. A ingestão de água está diretamente ligada ao consumo de ração e da mesma forma não foram observadas diferenças para consumo.

O aumento da dose de fitase de 1000 para 2500 FYT/kg teve um impacto positivo na digestibilidade e metabolizabilidade da dieta de maneira generalizada. Conforme observado por outros autores em dietas para frangos de corte, a utilização de doses altas de fitase superiores a 1000 FYT/kg, além de melhorar o aproveitamento de P, também aumenta a digestibilidade de proteína e aminoácidos complexados ao fitato e a energia digestível e metabolizável (WALK; RAMA RAO, 2020; WALK; OLUKOSI, 2019; DERSJANT-LI;

KWAKERNAAK, 2019; COWIESON et al., 2017). O mesmo foi observado com doses de até 2500 FTU/kg para perus (Pirgozliev et al., 2011; Pirgozliev et al., 2007). A intenção com o uso de doses maiores de fitase é garantir que a enzima tenha um maior contato com o substrato fitato de modo a intensificar o grau de degradação da molécula, ocasionando assim os efeitos extra-fosfóricos na dieta (BEESON et al., 2017; COWIESON et al., 2017).

O conteúdo de Na nas excretas também foi reduzido com a utilização de fitase. Na presença do fitato, há maior secreção de NaHCO_3 no lúmen intestinal na tentativa de combater o desequilíbrio de pH causado pela alta excreção de HCl (COWIESON et al., 2009; RAVINDRAN et al., 2006). A fitase contrapõe esta condição ao eliminar mais fitato do trato, reduzindo a secreção de HCl no lúmen e portanto diminuindo a excreção excessiva de Na.

A formação de complexos do fitato com cátions, por exemplo Ca, é favorecida em meio a pH mais altos, e em pH ácidos os quelatos se tornam mais susceptíveis a hidrólise enzimática (AMERAH et al., 2014; SANTOS, 2012). A alteração de pH da água teve influência significativa para algumas variáveis de digestibilidade e metabolizabilidade da dieta, porém de maneira inconsistente. O CDIA para MS e CMA para PB foram maiores para os perus que ingeriram água acidificada, sugerindo neste caso que o pH ácido da água ocasionou uma maior eficácia da enzima por tratar-se de uma fitase ácida originada de *Aspergillus*, cujo pH ótimo de atividade varia de 2,5 a 5,0 (TRAN et al., 2011). Por outro lado, o maior pH de água aumentou o CDIA do P, e ao avaliarmos a interação entre os fatores, o CMA de Ca só foi melhorado com fitase em pH 8,2 e a dieta sem fitase ou com dose 1000 FYT/kg em pH 8,2 gerou melhores resultados para metabolizabilidade de P e EMA. O resultado é controverso a estudos que mostram que pH mais baixos favorecem a complexação entre fitato e Ca, tornando a molécula menos susceptível a quebra por fitase e assim prejudicando o aproveitamento de demais nutrientes (SELLE et al., 2009; SANTOS, 2012). Porém ao aumentar a dose para 2500 FYT/kg, os valores de digestibilidade e metabolizabilidade da dieta foram, de maneira geral, estatisticamente semelhantes em ambos os pH. Aparentemente uma alta dosagem de fitase não sofre influência do pH da água no aproveitamento da dieta. Em todo o caso, a divergência entre os resultados observados neste e outros estudos pode estar ligada ao método ou a dose e tipo de substância aplicados na alteração do pH.

Da mesma forma, o pH da moela não foi alterado pelo pH da água. O resultado confere com o encontrado por Watkins et al., 2004, que não observaram alteração no pH da moela de frangos e perus ingerindo água acidificada, porém difere de outros estudos que relataram redução do pH no papo, proventrículo e íleo (HAMID et al., 2018) ou em todo o trato (PESTI et al., 2004) com oferta de água acidificada para frangos. Alguns estudos descrevem que a adição de fitase na dieta de frangos pode aumentar o pH da moela e outras porções do trato por reduzir a secreção de HCl (AMERAH et al., 2014; WALK et al., 2012), porém neste estudo este efeito não foi observado no pH da moela de perus.

A melhora no CDIA e CMA pela inclusão de fitase reflete em uma maior disponibilidade de Ca e P para o animal, além de outros minerais que possam estar complexados na molécula de fitato. Desta forma a absorção óssea de minerais foi fortalecida, aumentando o teor de RM, Ca P na tíbia dos perus em comparação a dieta controle. Resultados similares foram obtidos em relação a mineralização óssea de frangos (HAN et al., 2009; SOUSA et al., 2015) e perus (KOZLOWSKI et al., 2010; APPLGATE et al., 2003). Em um estudo recente Walk e Rama Rao (2020) descreveram um aumento significativo na concentração de Ca e cinzas na tíbia de frangos alimentados com doses acima de 2000 FTU/kg de fitase. Similarmente no presente estudo, a composição mineral óssea da tíbia de perus foi ainda maior com aumento da dose enzimática de 1000 para 2500 FYT/kg.

O inositol livre é uma molécula resultante da total desfosforilação ou remoção dos grupos fosfatos da molécula de fitato e participa de diversas funções no organismo animal, como transporte de glicose, metabolismo de lipídeos, absorção de minerais e equilíbrio osmótico, além de exercer ação antioxidante (GONZALEZ-UIRQUIN et al., 2020). Por ser parte do fitato, o inositol está presente em dietas convencionais de aves e suínos, na concentração de 2 a 4 g/kg, e quando a forma pura é incrementada à dieta são observados benefícios no desempenho dos animais (COWIESON et al., 2014). Ao potencializar a hidrólise de fitato, a fitase também aumenta a concentração e absorção de inositol no trato do animal, conforme evidenciado em estudos com frangos de corte (WALK; OLUKOSI, 2019; COWIESON et al., 2016). No presente estudo a inclusão de fitase aumentou significativamente a concentração de

inositol livre no plasma sanguíneo de perus, refletindo uma taxa maior de degradação do fitato em relação a dieta controle, embora ambas as doses foram igualmente eficazes para esta característica.

4.5 CONCLUSÕES

A inclusão de fitase na dieta melhora o desempenho de perus de 1 a 21 dias. O aumento da dose enzimática de 1000 para 2500 FYT/kg promoveu melhora sobre a digestibilidade e metabolizabilidade da dieta, incremento do conteúdo mineral no osso tibial e concentração de inositol plasmático. A variação do pH da água não teve influência sobre o desempenho, ingestão de água, pH da moela e mineralização óssea dos perus. Contudo, foi observada interação entre os fatores para algumas variáveis de digestibilidade e metabolizabilidade da dieta, entretanto com resultados divergentes entre água acidificada ou alcalinizada. Porém, a suplementação de uma dose de fitase mais alta (2500 FYT/kg) otimizou o aproveitamento da dieta para perus em ambos os pH estudados, desta forma melhorando desempenho, mineralização óssea e absorção de inositol.

REFERÊNCIAS

- AÇIKGÖZ, Z.; BAYRAKTAR, H.; ALTAN, Ö. Effects of formic acid administration in the drinking water on performance, intestinal microflora and carcass contamination in male broilers under high ambient temperature. **Asian-Aust. J. Anim. Sci.**, v. 24, n. 1, p. 96-102, 2011.
- AMERAH, A. M.; PLUMSTEAD, P. W.; BARNARD, L. P.; KUMAR, A. Effect of calcium level and phytase addition on ileal phytate degradation and amino acid digestibility of broilers fed corn-based diets¹. **Poult. Sci.**, v. 93, n. 4, p. 906–915, 2014.
- AOAC International. Official and tentative methods of analysis. 16th ed. Arlington, Virginia, 1995.
- APPLEGATE, T. J.; WEBEL, D. M.; LEI, X. G. Efficacy of a phytase derived from escherichia coli and expressed in yeast on phosphorus utilization and bone mineralization in turkey poult. **Poult. Sci.**, v. 82, p. 1726-1732, 2003.
- BEESEON, L. A.; WALK, C. L.; BEDFORD, M. R.; OLUKOSI, O. A. Hydrolysis of phytate to its lower esters can influence the growth performance and nutrient utilization of broilers with regular or super doses of phytase. **Poult. Sci.**, p. 1-11, 2017.
- CORNELISON, J.; WILSON, M.; WATKINS, S. Effects of water acidification on turkey performance. **Avian. Adv.**, v. 7, p. 1–3, 2005.
- COWIESON, A. J.; AURELI, R.; GUGGENBUHL, P.; FRU-NJI, F. Possible involvement of myo-inositol in the physiological response of broilers to high doses of microbial phytase. **Anim. Prod. Sci.**, v. 55, p. 710–719, 2014.
- COWIESON, A. J.; BEDFORD, M. R.; SELLE, P. H.; RAVINDRAN, V. Phytate and microbial phytase: Implications for endogenous nitrogen losses and nutrient availability. **World's Poult. Sci. J.**, v. 65, n. 3, p. 401–418, 2009.
- COWIESON, A. J.; RUCKEBUSCH, J. P.; KNAP, I.; GUGGENBUHL, P.; FRU-NJI, F. Phytate-free nutrition: A new paradigm in monogastric animal production. **Anim. Feed Sci. Tech.**, v. 222, p. 180-189, 2016.
- COWIESON, A. J.; RUCKEBUSH, J. P.; SORBARA, J. O. B.; WILSON, J. W.; GUGGENBUHL, P.; TANADINI, L.; ROOS, F. F. A systematic view on the effect of microbial phytase on ileal amino acid digestibility in broilers. **Anim. Feed Sci. Technol.**, v. 231, p. 138–149, 2017.
- DERSJANT-LI, Y.; KWAKERNAAK, C. Comparative effects of two phytases versus increasing the inorganic phosphorus content of the diet, on nutrient and amino acid digestibility in broilers. **Anim. Feed Sci. Tech.**, v. 253, p. 166-180, 2019.

ENGELN, A.J.; VAN DER HEEH, F.C.; RANDSDORP, P.G.H. et al. Simple and rapid determination of phytase activity. **Journal of AOAC International**, v.77, p.760-764, 1994.

FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. Experimental Designs: um pacote R para análise de experimentos. **Revista da Estatística da UFOP**, v. 1, n. 1, p. 1-9, 2011.

GONZALEZ-UARQUIN, F.; RODEHUTSCORD, M.; HUBER, K. *Myo*-inositol: its metabolism and potential implications for poultry nutrition – a review. **Poult. Sci.**, v. 99, p. 893-905, 2020.

HAMID, H.; SHI, H. Q.; MA, G. Y.; FAN, Y.; LI, W. X.; ZHAO, L. H.; ZHANG, J. Y.; JI, C.; MA, Q. G. Influence of acidified drinking water on growth performance and gastrointestinal function of broilers. **Poult. Sci.**, v. 97, p. 3601-3609, 2018.

INGELMANN, C. J.; WITZIG, M.; MÖHRING, J.; SCHOLLENBERGER, M.; KÜHN, I.; RODEHUTSCORD, M. Effect of supplemental phytase and xylanase in wheat-based diets on prececal phosphorus digestibility and phytate degradation in young turkeys. **Poult. Sci.**, v. 97, p. 2011-2020, 2018.

KOZLOWSKI, K.; JANKOWSKI, J.; JEROCH, H. Efficacy of escherichia coli - derived phytase on performance , bone mineralization and nutrient digestibility in meat-type turkeys. **Veterinarija Ir Zootechnika**, v. 52, n. 74, 2010.

LEUNG, K. Y.; MILLS, K.; BURREN, K. A.; COPP, A. J.; GREENE, N. D. E. Quantitative analysis of *myo*-inositol in urine, blood and nutritional supplements by high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **J. Chromatography, Analyt. Tech. Biomed. Life Sci.**, v. 87, p. 2759-2763, 2011.

LIEBERT, F.; WECKE, C.; SCHONER, F. J. Phytase activities in different gut contents of chickens are dependent on level of phosphorus and phytase supplementations. In: Wenk C, Boessinger M, editor. Proceedings... **1st European Symposium Enzymes in Animal Nutrition**; 1993; Karthause Ittingen, Switzerland; p.202-205, 1993.

LUDTKE. C. B., CIOCCA, J.R.P., DANDIN, T., BARBALHO, P.C., VILELA, J.A. Abate humanitário de aves. 1st ed. World Society for the Protection of Animals, Copacabana, Rio de Janeiro, 2010.

NAVES, L. P.; CORRÊA, A. D.; BERTECHINI, A. G.; GOMIDE, E. M.; SANTOS, C. D. Effect of pH and temperature the activity of phytase products used in broiler nutrition. **Rev. Bras. Ciênc. Avíc.**, v. 14, n. 3, p. 181-185, 2012.

PESTI, G.; BAKALLI, R.; VENDRELL, P.; CHEN, H. Y. Effects of organic acid on control of bacteria growth in drinking water for broilers. **Poult. Sci.**, v. 83, 2004.

PIRGOZLIEV, V.; BEDFORD, M. R.; ACAMOVIC, T.; ALLIMEHR, M. The effects of supplementary bacterial phytase on dietary true metabolisable

energy, nutrient digestibility and endogenous losses in precision fed turkeys. **Brit. Poult. Sci.**, v. 52, p. 214-220, 2011.

PIRGOZLIEV, V.; ODUGUWA, O.; ACAMOVIC, T.; BEDFORD, M. R.; Diets containing escherichia coli-derived phytase on young chickens and turkeys: effects on performance, metabolizable energy, endogenous secretions, and intestinal morphology. **Poult Sci.**, v. 86, p. 705-713, 2007.

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

RUTZ, F.; ROLL, V. F. B.; XAVIER, E. G.; ANCIUTI, M. A.; LOPES, D. C. N. Fisiologia da digestão em aves. Disponível em: <<https://pt.engormix.com/avicultura/artigos/fisiologia-digestao-absorcao-aves-t38668.htm>>. Acesso em: 23/12/2019.

SANTOS, T.T. Phytate: anti-nutrient for poultry and swine. **Feedstuffs**, v. 84, p. 1-3, 2012.

SCOTT, T. A.; BOLDAJI, F. Comparison of inert markers [chromic oxide or insoluble ash (Celite™)] for determining apparent metabolizable energy of wheat- or barley- based broiler diets with or without enzymes. **Poult. Sci.**, v. 76, p. 594–598, 1997.

SEEDOR, J. G. The biophosphonate alendronate (MK-217) inhibit bone loss due to ovariectomy in rats. **J. Bone Min. Res.**, v. 4, p. 265-270, 1993.

SELLE, P. H.; COWIESON, A. J.; RAVINDRAN, V. Consequences of calcium interactions with phytate and phytase for poultry and pigs. *Livest. Sci.*, v. 124, p. 126–141, 2009.

SHANMUGAN, G. Characteristics of phytase enzyme and its role in animal nutrition. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.**, v. 7, n. 3, p. 1006-1013, 2018.

SOUSA, J. P. L.; ALBINO, L. F. T.; VAZ, R. G. M. V.; RODRIGUES, K. F.; SILVA, G. F.; RENNO, L. N.; BARROS, V. R. S. M.; KANEKO, I. N. The effect of dietary phytase on broiler performance and digestive, bone, and blood biochemistry characteristics. **Rev. Bras. Ciênc. Avíc.**, v. 17, n. 1, p. 69-76, 2015.

TRAN., T. T.; HATTI-KAUL, R.; DALSGAARD, S.; YU, S. A simple and fast kinetic assay for phytases using phytic acid–protein complex as substrate. **Anal Biochem**, v. 410, p. 177–184, 2011.

YANG, Y.; IJI, P. A.; CHOCT, M. Dietary modulation of gut microflora in broiler chickens: a review of the role of six kinds of alternatives to in-feed antibiotics. **World's Poult. Sci. J.**, v. 65, p. 97-114, 2009.

WALK, C. L.; BEDFORD, M. R.; MCELROY, A. P. Influence of limestone and phytase on broiler performance, gastrointestinal pH, and apparent ileal nutrient digestibility. **Poult. Sci.**, v. 91, p. 1371–1378, 2012.

WALK, C. L.; OLUKOSI, O. A. Influence of graded concentrations of phytase in high-phytate diets on growth performance, apparent ileal amino acid digestibility, and phytate concentration in broilers from hatch to day 28 post-hatch. **Poult. Sci.**, p. 1-10, 2019.

WALK, C. L.; RAMA RAO, S. V. Dietary phytate has a greater anti-nutrient effect on feed conversion ratio compared to body weight gain and greater doses of phytase are required to alleviate this effect as evidenced by prediction equations on growth performance, bone ash and phytate degradation in broilers. **Poult. Sci.**, v. 99, p. 246-255, 2020.

WATKINS, S. Water: Identifying and correcting challenges. **Avian Advice**, v. 10, n. 3, p. 10-15, 2008.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de fitase na dieta de animais monogástricos, principalmente suínos e aves, é amplamente disseminada. O principal objetivo da suplementação é melhorar o aproveitamento de P fítico e diminuir os efeitos antinutricionais do fitato. Desta forma é possível reduzir a entrada de outras fontes de P na dieta, barateando o custo de formulação e produção de rações, além de também reduzir a excreção de nutrientes para o meio ambiente.

Em comparação a frangos de corte, os perus apresentam um maior requerimento nutricional de proteína, fósforo e cálcio. Além disso são menos eficazes em hidrolisar o fitato e aproveitar o P da dieta, o que está ligado a fatores fisiológicos que diferem entre as espécies. A formulação de dietas para perus contendo fitase e os efeitos da enzima devem ser portanto considerados de maneira distinta a formulação para frangos de corte.

Doses altas de fitase, acima dos níveis comumente aplicados no sistema de produção, têm sido o foco de pesquisas atuais, principalmente para frangos. Os resultados providos por ambos os experimentos mostram claramente que os perus também podem responder, ainda nas primeiras semanas de idade, a altas dosagens de fitase na dieta, de até 4000 FYT/kg. Efeitos lineares foram observados para variáveis de aproveitamento da dieta e composição óssea, além de melhoras significativas no desempenho em comparação a oferta de dietas sem fitase. Ainda, a inclusão da enzima foi eficaz em recuperar o desempenho de perus alimentados com níveis reduzidos de Ca e P.

Os efeitos extra-fosfóricos da fitase também foram evidenciados nos experimentos quando consideramos o maior aproveitamento da matéria seca, proteína, sódio, energia e a maior concentração de inositol livre no sangue. Vale ressaltar, porém, que o aumento da metabolizabilidade, diferentemente da digestibilidade ileal, infere no maior desaparecimento do nutriente e não necessariamente em maior absorção. Isto pode significar que o nutriente foi efetivamente aproveitado pela microbiota intestinal presente nos cecos e não pela ave.

Parte das observações, entretanto, foram divergentes e de limitada elucidação no tocante ao real efeito do pH da água para perus e a interação com diferentes doses de fitase. A literatura traz um consenso de que a variação do

pH pode alterar a ingestão de água em aves, e consequentemente o consumo de ração, o que não foi observado neste estudo. As variáveis de digestibilidade e metabolizabilidade foram influenciadas pelo pH da água de maneira discrepante, enquanto outros parâmetros de desempenho, mineralização óssea e concentração plasmática de inositol não sofreram efeito deste fator. A divergência de resultados pode estar ligada ao tipo de substância utilizada no tratamento de pH. Em muitos estudos a água é acidificada por uso de ácidos orgânicos, que também estão ligados a outros benefícios para a dieta, e a alcalinização da água normalmente é feita por tratamento magnético, enquanto no segundo experimento foram utilizadas uma simples solução ácida e base. Diferentes ácidos apresentam distintos pKa e podem se dissociar no trato de maneira diferente e no caso do experimento, não foi observada diferença para o pH da moela dos perus. Questiona-se, portanto, o real efeito dessa alteração artificial de pH da água, isoladamente ou em interação com a fitase. Outros detalhes no momento da coleta de conteúdo ileal e excreta, assim como na medição de pH da moela, como por exemplo se uma ave estivesse ingerindo água momentos antes da coleta enquanto outras estivessem há mais tempo sem beber, também podem influenciar os resultados.

A criação de perus tem uma participação importante no mercado avícola nacional e a demanda por pesquisas que avaliem a suplementação enzimática para estas aves é crescente. É essencial investigar a eficácia de diferentes doses de fitase e sua interação com outros fatores inerentes a alimentação de perus. A composição da dieta e dos ingredientes isolados, em relação a quantidade de substrato e a interação com demais enzimas pode influenciar o efeito da fitase sobre os parâmetros alvos da pesquisa.

REFERÊNCIAS FINAIS

- ABPA. **Relatório Anual 2017**. São Paulo. Disponível em: <<http://abpabr.com.br/storage/files/relatorio-anual-2017.pdf>>. Acesso em 04 nov. 2019.
- AÇIKGÖZ, Z.; BAYRAKTAR, H.; ALTAN, Ö. Effects of formic acid administration in the drinking water on performance, intestinal microflora and carcass contamination in male broilers under high ambient temperature. **Asian-Aust. J. Anim. Sci.**, v. 24, n. 1, p. 96-102, 2011.
- ADEOLA, O.; COWIESON, A. J. Board-invited review: opportunities and challenges in using exogenous enzymes to improve nonruminant animal production. **J. Anim. Sci.**, v. 89, p. 3189–3218, 2011.
- ALLEN, A.; FLEMSTRON, G. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. **Amer. J. Physiol.**, v. 288, p. 1-19, 2005.
- AMERAH, A. M.; PLUMSTEAD, P. W.; BARNARD, L. P.; KUMAR, A. Effect of calcium level and phytase addition on ileal phytate degradation and amino acid digestibility of broilers fed corn-based diets¹. **Poult. Sci.**, v. 93, n. 4, p. 906–915, 2014.
- AOAC International. Official and tentative methods of analysis. 16th ed. Arlington, Virginia, 1995.
- APPLEGATE, T. J.; WEBEL, D. M.; LEI, X. G. Efficacy of a phytase derived from escherichia coli and expressed in yeast on phosphorus utilization and bone mineralization in turkey poults. **Poult. Sci.**, v. 82, p. 1726-1732, 2003.
- ATIA, F. A.; WAIBEL, P. E.; HERMES, I.; CARLSON, C. W.; WALSER, M. M. Effect of dietary phosphorus, calcium, and phytase on performance of growing turkeys. **Poult. Sci.**, v. 79, p. 231-239, 2000.
- AVIAGEN. **Water quality guidelines for turkeys**. West Virginia, 2016. Disponível em: <<https://www.aviagenturkeys.us/>>. Acesso em: 16/12/2019.
- BEDFORD, M. R.; PARTRIDGE, G. G. Enzymes in farm animal nutrition. 2nd ed., 2010, MPG Books Group, Bodmin, UK.
- BEESEON, L. A.; WALK, C. L.; BEDFORD, M. R.; OLUKOSI, O. A. Hydrolysis of phytate to its lower esters can influence the growth performance and nutrient utilization of broilers with regular or super doses of phytase. **Poult. Sci.**, p. 1-11, 2017.
- BONEY, J. W.; MORITZ, J. S. Phytase dose effects in practically formulated diets that vary in ingredient composition on feed manufacturing and broiler performance. **J. Appl. Poult. Res.**, p. 1-13, 2016.

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

CAMDEN, B. J.; MOREL, P. C. H.; THOMAS, D. V.; RAVINDRAN, V.; BEDFORD, M. R. Effectiveness of exogenous microbial phytase in improving the bioavailabilities of phosphorus and other nutrients in maize-soya-bean meal diets for broilers. **Anim. Sci.**, v. 73, p. 2089-297, 2001.

CASTRO, C. M.; GEWEHR, C. E.; REGINATTO, M. F. Rendimento de carcaça e cortes de perus comerciais submetidos a diferentes manejos de alimentação. **Archives of Veterinary Science**, v. 19, n. 4, p. 51–56, 2014.

CHOCT, M. Enzymes for the feed industry: past, present and future. **World. Poult. Sci.**, v. 62, p. 5-15, 2006.

CORADI, G. V. **Produção, purificação e caracterização de fitases microbianas e potencial de produção de mioinositóis**. 2017. 207 f. Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Campinas, 2017.

CORNELISON, J.; WILSON, M.; WATKINS, S. Effects of water acidification on turkey performance. **Avian. Adv.**, v. 7, p. 1–3, 2005.

COWIESON A. J.; AURELI, R.; GUGGENBUHL, P.; FRU-NJI, F. Possible involvement of myo-inositol in the physiological response of broilers to high doses of microbial phytase. **Anim. Prod. Sci.**, v. 55, p. 710–719, 2015.

COWIESON, A. J.; ACAMOVIC, T.; BEDFORD, M. R. The effects of phytase and phytic acid on the loss of endogenous amino acids and minerals from broiler chickens. **Brist. Poult. Sci.**, v. 45, n. 1, p. 101-108, 2004.

COWIESON, A. J.; BEDFORD, M. R.; SELLE, P. H.; RAVINDRAN, V. Phytate and microbial phytase: Implications for endogenous nitrogen losses and nutrient availability. **World's Poult. Sci. J.**, v. 65, n. 3, p. 401–418, 2009.

COWIESON, A. J.; COWIESON, N. P. Phytate and the thermodynamics of water. **Austral. Poult. Symp.** 2011. 11p.

COWIESON, A. J.; RUCKEBUSCH, J. P.; KNAP, I.; GUGGENBUHL, P.; FRU-NJI, F. Phytate-free nutrition: A new paradigm in monogastric animal production. **Anim. Feed Sci. Tech.**, v. 222, p. 180-189, 2016.

COWIESON, A. J.; RUCKEBUSH, J. P.; SORBARA, J. O. B.; WILSON, J. W.; GUGGENBUHL, P.; TANADINI, L.; ROOS, F. F. A systematic view on the effect of microbial phytase on ileal amino acid digestibility in broilers. **Anim. Feed Sci. Technol.**, v. 231, p. 138–149, 2017.

COWIESON, A. J.; WILCOCK, P.; BEDFORD, M. R. Super-dosing effects of phytase in poultry and other monogastrics. **World Poult. Sci. J.**, v. 67, p. 225-236, 2011.

COWIESON, A.J.; AURELI, R.; GUGGENBUHL, P.; FRU-NJI, F. Possible involvement of myo-inositol in the physiological response of broilers to high doses of microbial phytase. **Anim. Prod. Sci.**, v. 55, p. 710–719, 2014.

DERSJANT-LI, Y.; AWATI, A.; SCHULZE, H.; PARTRIDGE, G. Phytase in non-ruminant animal nutrition: a critical review on phytase activities in the gastrointestinal tract and influencing factors. **J. Sci. Food Agric.**, v. 95, p. 878-896, 2015.

DERSJANT-LI, Y.; KWAKERNAAK, C. Comparative effects of two phytases versus increasing the inorganic phosphorus content of the diet, on nutrient and amino acid digestibility in boilers. **Anim. Feed Sci. Tech.**, v. 253, p. 166-180, 2019.

EL-SABROUT, K.; EL-HANOUN, A. Does magnetised drinking water influence poultry's health and production?. **World's Poult. Sci. J.**, v. 75, p. 411-416, 2019.

ENGELN, A.J.; VAN DER HEEH, F.C.; RANDSDORP, P.G.H. et al. Simple and rapid determination of phytase activity. **Journal of AOAC International**, v.77, p.760-764, 1994.

FEBLES, C. I.; ARIAS, A.; HARDISON, A.; RODRÍGUEZ-ALVAREZ C.; SIERRA, A. Phytic acid level in wheat flours. **Journal of Cer. Scien**, v. 36, n. 1, p. 19-23, 2002.

FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. Experimental Designs: um pacote R para análise de experimentos. **Revista da Estatística da UFOP**, v. 1, n. 1, p. 1-9, 2011.

GONZALEZ-UARQUIN, F.; RODEHUTSCORD, M.; HUBER, K. Myo-inositol: its metabolism and potential implications for poultry nutrition – a review. **Poult. Sci.**, v. 99, p. 893-905, 2020.

HAMID, H.; SHI, H. Q.; MA, G. Y.; FAN, Y.; LI, W. X.; ZHAO, L. H.; ZHANG, J. Y.; JI, C.; MA, Q. G. Influence of acidified drinking water on growth performance and gastrointestinal function of broilers. **Poult. Sci.**, v. 97, p. 3601-3609, 2018.

HAN, J. C.; YANG, X. D.; QU, H. X.; XU, M.; ZHANG, T.; LI, W. L.; YAO, J. H.; LIU, Y. R.; SHI, B. J.; ZHOU, Z. F.; FENG, X. Y. Evaluation of equivalency values of microbial phytase to inorganic phosphorus in 22- to 42-day-old broilers. **J. Appl. Poult.**, v. 18, p. 707–715, 2009.

IDRISS, E. E.; MAKAREWICZ, O.; FAROUK, A.; ROSNER, K.; GREINER, R.; BOCHOW, H.; RICHTER, T.; BORRIS, R. Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant growth-promoting

effect. **Microbiology**, v. 148, p. 2097–2109, 2002.

INGELMANN, C. J.; WITZIG, M.; MÖHRING, J.; SCHOLLENBERGER, M.; KÜHN, I.; RODEHUTSCORD, M. Effect of supplemental phytase and xylanase in wheat-based diets on prececal phosphorus digestibility and phytate degradation in young turkeys. **Poult. Sci.**, v. 97, p. 2011-2020, 2018.

INGELMANN, C. J.; WITZIG, M.; MÖHRING, J.; SCHOLLENBERGER, M.; KÜHN, I.; RODEHUTSCORD, M. Phytate degradation and phosphorus digestibility in broilers and turkeys fed different corn sources with or without added phytase. **Poult. Sci.**, v. 98, p. 912-922, 2019.

KOZLOWSKI, K.; JANKOWSKI, J.; JEROCH, H. Efficacy of escherichia coli - derived phytase on performance , bone mineralization and nutrient digestibility in meat-type turkeys. **Veterinarija Ir Zootechnika**, v. 52, n. 74, 2010

KUMAR, A.; CHANDERMAN, A.; MAKOLOMAKWA, M.; PERUMAL, K.; SINGH, S. Microbial production of phytases for combating environmental phosphate pollution and other diverse applications. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 46, n. 6, p. 556-591, 2016.

LEI, X. G.; PORRES, J. M. Phytase enzymology, applications, and biotechnology. **Biotechnology Letters**, v. 25, p.1787–1794, 2003.

LEUNG, K. Y.; MILLS, K.; BURREN, K. A.; COPP, A. J.; GREENE, N. D. E. Quantitative analysis of *myo*-inositol in urine, blood and nutritional supplements by high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **J. Chromatography, Analyt. Tech. Biomed. Life Sci.**, v. 87, p. 2759-2763, 2011.

LIEBERT, F.; WECKE, C.; SCHONER, F. J. Phytase activities in different gut contents of chickens are dependent on level of phosphorus and phytase supplementations. In: Wenk C, Boessinger M, editor. Proceedings... **1st European Symposium Enzymes in Animal Nutrition**; 1993; Karthause Ittingen, Switzerland; p.202-205, 1993.

LIU, Z.; CHENG, F.; ZHANG, G. Grain phytic acid content in japonica rice as affected by cultivar end environment and its relation to protein content. **Food Chemistry**, v. 89, n. 1, p. 49-52, 2005.

LOTT, J. N. A.; OCKENDEN, I.; RABOY, V.; BATTEN, G. D. A global estimate of phytic acid and phosphorus in crop grains, seeds, and fruits. In: REDDY, N. R.; SATHE, S. K. **Food Phytates**. Boca Raton: CRC Press, 2002, p. 7-24.

LUDTKE. C. B., CIOCCA, J.R.P., DANDIN, T., BARBALHO, P.C., VILELA, J.A. Abate humanitário de aves. 1st ed. World Society for the Protection of Animals, Copacabana, Rio de Janeiro, 2010.

McKNIGHT, W. F. Phytase technical specifications and properties. **Short Course on Feed Tecnology**, v. 7, 1997.

NAVES, L. P.; CORRÊA, A. D.; BERTECHINI, A. G.; GOMIDE, E. M.; SANTOS, C. D. Effect of pH and temperature the activity of phytase products used in broiler nutrition. **Rev. Bras. Ciênc. Avíc.**, v. 14, n. 3, p. 181-185, 2012.

NRC. Nutrient requirements of poultry. 9th ed., 1994, National Academy Press, Washington D.C.

OLIVEIRA, E. M. **Diferentes inclusões de fitase em dietas de frangos de corte**. 2016. 94 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, 2016.

ONYANGO, E. M.; ASEM, E. K.; ADEOLA, O. Phytic acid increase mucin and endogenous amino acids losses from the gastrointestinal tract of chickens. **Brist. Poult. Scie.**, v. 101, n. 6, p. 836-842, 2009.

PESTI, G.; BAKALLI, R.; VENDRELL, P.; CHEN, H. Y. Effects of organic acid on control of bacteria growth in drinking water for broilers. **Poult. Sci.**, v. 83, 2004.

PHILIPSEN, I. P. L. J. Acidifying drinking water supports performance. **World's Poult. Sci. J.**, v. 22, p. 20-21, 2006.

PIRGOZLIEV, V.; BEDFORD, M. R.; ACAMOVIC, T.; ALLIMEHR, M. The effects of supplementary bacterial phytase on dietary true metabolisable energy, nutrient digestibility and endogenous losses in precision fed turkeys. **Brit. Poult. Sci.**, v. 52, p. 214-220, 2011.

PIRGOZLIEV, V.; ODUGUWA, O.; ACAMOVIC, T.; BEDFORD, M. R.; Diets containing escherichia coli-derived phytase on young chickens and turkeys: effects on performance, metabolizable energy, endogenous secretions, and intestinal morphology. **Poult Sci.**, v. 86, p. 705-713, 2007.

RAVINDRAN, V.; HEW, L. I.; RAVINDRAN, G.; BRYDEN, W. L. A comparison of ileal digesta and excreta analysis for the determination of amino acid digestibility in food ingredients for poultry. **Brit. Poult. Sci.**, v. 40, p. 266-274, 1999.

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

REZVANI, M. R.; RODEHUTSCORD, M.; OMMATI, M. M. Efficacy of phytase preparations to improve P availability in young turkeys. **Iran. Agric. Res.**, v. 28, p. 89-98, 2009.

RODEHUTSCORD, M.; DIECKMANN, A. Comparative studies with three-week-old chickens, turkeys, ducks, and quails on the response in phosphorus utilization to a supplementation of monobasic calcium phosphate. **Poult. Sci.**, v. 84, p. 1252-1260, 2005.

ROMANO, F.; RUSSO, A. Biocatalysis Research Progress. Hauppauge (NY): Nova Science Publishers, 2008.

RUTZ, F.; ROLL, V. F. B.; XAVIER, E. G.; ANCIUTI, M. A.; LOPES, D. C. N. Fisiologia da digestão em aves. Disponível em: <<https://pt.engormix.com/avicultura/artigos/fisiologia-digestao-absorcao-aves-t38668.htm>>. Acesso em: 23/12/2019.

SANTOS, T.T. Phytate: anti-nutrient for poultry and swine. **Feedstuffs**, v. 84, p. 1-3, 2012.

SCOTT, T. A.; BOLDAJI, F. Comparison of inert markers [chromic oxide or insoluble ash (Celite™)] for determining apparent metabolizable energy of wheat- or barley- based broiler diets with or without enzymes. **Poult. Sci.**, v. 76, p. 594–598, 1997.

SCOTTÁ, B. A.; GOMIDE, A. P. C.; CAMPOS, P. F.; BARROCA, C. C.; FORMIGONI, A. S.; FERREIRA, S. V. Utilização de fitase na alimentação de aves e suínos. **PUBVET**, v. 8, n. 2, 2014.

SEEDOR, J. G. The biophosphonate alendronate (MK-217) inhibit bone loss due to ovariectomy in rats. **J. Bone Min. Res.**, v. 4, p. 265-270, 1993.

SELLE, P. H.; COWIESON, A. J.; RAVINDRAN, V. Consequences of calcium interactions with phytate and phytase for poultry and pigs. *Livest. Sci.*, v. 124, p. 126–141, 2009.

SELLE, P. H.; RAVINDRAN, V. Microbial phytase in poultry nutrition. **Anim. Feed Sci. Technol.**, v. 135, p. 1–41, 2007.

SENS, R. F. **Avaliação da suplementação das enzimas xilanase e β -mananase em rações para perus**. 2009. 70 f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Paraná, 2009.

SHANMUGAN, G. Characteristics of phytase enzyme and its role in animal nutrition. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.**, v. 7, n. 3, p. 1006-1013, 2018.

SINGH, P.K. Significance of phytic acid and supplemental phytase in chicken nutrition: a review. **World's Poult. Sci. J.**, v.64, p.553-580, 2008.

SOMMERFELD, V.; KUNZEL, S.; SCHOLLENBERGER, M.; KUHN, I.; RODEHUTSCORD, M. Influence of phytase or *myo*-inositol supplements on performance and phytate degradation products in the crop, ileum, and blood of broiler chickens. **Poult. Sci.**, v. 97, p. 920-929, 2018.

SOUSA, J. P. L.; ALBINO, L. F. T.; VAZ, R. G. M. V.; RODRIGUES, K. F.; SILVA, G. F.; RENNO, L. N.; BARROS, V. R. S. M.; KANEKO, I. N. The effect of dietary phytase on broiler performance and digestive, bone, and blood biochemistry characteristics. **Rev. Bras. Ciênc. Avíc.**, v. 17, n. 1, p. 69-76,

2015.

TAMIM, N. M.; ANGEL, R.; CHRISTMAN, M. Influence of dietary calcium and phytase on phytate phosphorus hydrolysis in broiler chickens. *Poult. Sci.*, v. 83, p. 1358–1367, 2004.

TOOR, G. S.; PEAK, J. D.; SIMS, J. T. Phosphorus speciation in broiler litter and turkey manure produced from modified diets. **Journal of Environmental Quality**, v. 697, p. 687–697, 2005.

TRAN., T. T.; HATTI-KAUL, R.; DALSGAARD, S.; YU, S. A simple and fast kinetic assay for phytases using phytic acid–protein complex as substrate. **Anal Biochem**, v. 410, p. 177–184, 2011.

WALK, C. L.; BEDFORD, M. R.; MCELROY, A. P. Influence of limestone and phytase on broiler performance, gastrointestinal pH, and apparent ileal nutrient digestibility. **Poult. Sci.**, v. 91, p. 1371–1378, 2012.

WALK, C. L.; BEDFORD, M. R.; SANTOS, T. S.; PAIVA, D.; BRADLEY, J. R.; WLADECKI, H.; HONAKER, C.; MCELROY, A. P. Extra-phosphoric effects of superdoses of a novel microbial phytase. **Poult. Sci.**, v. 92, n. 3, p. 719–725, 2013.

WALK, C. L.; OLUKOSI, O. A. Influence of graded concentrations of phytase in high-phytate diets on growth performance, apparent ileal amino acid digestibility, and phytate concentration in broilers from hatch to day 28 post-hatch. **Poult. Sci.**, p. 1-10, 2019.

WALK, C. L.; RAMA RAO, S. V. Dietary phytate has a greater anti-nutrient effect on feed conversion ratio compared to body weight gain and greater doses of phytase are required to alleviate this effect as evidenced by prediction equations on growth performance, bone ash and phytate degradation in broilers. **Poult. Sci.**, v. 99, p. 246-255, 2020.

WATKINS, S. Water: Identifying and correcting challenges. **Avian Advice**, v. 10, n. 3, p. 10-15, 2008.

WATKINS, S.; CORNELISON, J.; TILLERY, C.; WILSON, M.; HUBBARD, R. Effects of water acidification on broiler performance. **Avian Advice**, v. 6, p. 4–6, 2004.

WEALLEANS, A. L.; BARNARD, L. P.; ROMERO, L. F.; KWAKERNAAK, C. A. A value based approach to determine optimal phytase dose: A case study in turkey poults. **Anim. Feed Sci. Tech.**, v. 216, p. 288–295, 2016.

YANG, Y.; IJI, P. A.; CHOCT, M. Dietary modulation of gut microflora in broiler chickens: a review of the role of six kinds of alternatives to in-feed antibiotics. **World's Poult. Sci. J.**, v. 65, p. 97-114, 2009.

YU, P.; CHEN, Y. Purification and characterization of a novel neutral and heat-

tolerant phytase from a newly isolated strain *Bacillus nealsonii* ZJ0702. **BMC Biotechnology**, v. 13, n. 78, p. 1-7, 2013.

YU, S.; COWIESON, A.; GILBERT, C.; PLUMSTEAD, P.; DALSGAARD, S. Interactions of phytate and myo-inositol phosphate esters (IP1-5) including IP5 isomers with dietary protein and iron and inhibition of pepsin. **J Anim. Sci.**, v. 90, p. 1824–1832, 2012.

ZELLER, E.; SCHOLLENBERGER, M.; KÜHN, I.; RODEHUTSCORD, M. Dietary effects on inositol phosphate breakdown in the crop of broilers. **Arch. Anim. Nutr.**, v. 70, p. 57–71, 2016.