

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC  
CENTRO DE EDUCAÇÃO SUPERIOR DO OESTE – CEO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA– PPGZOO**

**JÉSSICA LINE FARIAS DE LIMA**

**ESTRESSE OXIDATIVO E ENZIMAS DO METABOLISMO ENERGÉTICO DE  
FRANGOS ALIMENTADOS COM DIETAS CONTENDO FITASE**

**CHAPECÓ**

**2023**

**JÉSSICA LINE FARIAS DE LIMA**

**ESTRESSE OXIDATIVO E ENZIMAS DO METABOLISMO ENERGÉTICO DE  
FRANGOS ALIMENTADOS COM DIETAS CONTENDO FITASE**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Zootecnia pelo Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC.  
Orientador: Prof. Dr. Denise Nunes Araújo.

**CHAPECÓ**

**2023**

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da  
Biblioteca Universitária Udesc,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Lima, Jéssica Line Farias de  
Estresse oxidativo e enzimas do metabolismo energético  
de frangos alimentados com dietas contendo fitase / Jéssica  
Line Farias de Lima. -- 2023.  
62 p.

Orientadora: Denise Nunes Araújo  
Coorientador: Aleksandro Schafer da Silva  
Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de  
Santa Catarina, Centro de Educação Superior do Oeste,  
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Chapecó, 2023.

1. Ácido Fítico. 2. Digestibilidade. 3. Enzimas. I. Araújo,  
Denise Nunes . II. Silva, Aleksandro Schafer da. III.  
Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de  
Educação Superior do Oeste, Programa de Pós-Graduação  
em Zootecnia. IV. Título.

**JÉSSICA LINE FARIAS DE LIMA**

**ESTRESSE OXIDATIVO E ENZIMAS DO METABOLISMO ENERGÉTICO DE  
FRANGOS ALIMENTADOS COM DIETAS CONTENDO FITASE**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Zootecnia pelo Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC.  
Orientador: Prof. Dr. Denise Nunes Araújo

**BANCA EXAMINADORA**

Membros:

Denise Nunes Araujo, Dra.

Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC

Marcos José Migliorini, Dr.

Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC

Lilian Francisco Arantes de Souza, Dra.

Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

Chapecó, 27 de outubro de 2023.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus orientadores por aceitar conduzir o meu trabalho de pesquisa.

Aos colegas do LABMIM por toda ajuda na condução desse experimento, em especial a Charline, Letícia e Alexandre.

Ao Emerson, laboratorista das engenharias na Uceff Faculdades, pela disponibilidade e paciência com os testes de flexão.

Ao Instituto de Patologia do Oeste pelo processamento das lâminas histológicas.

A Sara, pela ajuda com a análise mineral óssea.

A Bruna do LANA, pelos ensinamentos e paciência nas análises de digestibilidade.

E principalmente, agradeço aos meus pais, Diva e Valdir, por conduzirem esse experimento comigo. Faltariam páginas para descrever tudo o que vocês contribuíram nesse projeto. Obrigada!

## RESUMO

A busca por maior produtividade a baixo custo é um objetivo constante na avicultura de corte. A alimentação das aves representa grande parte dos custos de produção, principalmente devido à energia, proteína e aminoácidos sulfurados e lisina. Os minerais, como o fósforo, também têm impacto nos custos das rações, correspondendo a cerca de 2% a 3% das despesas totais. A enzima fitase surge como uma possibilidade para otimizar a utilização dos nutrientes com a degradação do fitato, podendo, quando presente, diminuir seus efeitos antinutricionais e liberar fósforo fítico. Essa enzima tornou as rações formuladas com milho e farelo de soja mais vantajosas em termos econômicos, pois sua adição associada a redução dos minerais da dieta não prejudica o desempenho dos animais. O estudo avaliou o desempenho zootécnico, coeficientes de digestibilidade e níveis de enzimas em frangos submetidos a diferentes níveis dietéticos de cálcio e fósforo, com adição ou não de fitase. Não houve diferença estatística no ganho de peso e conversão alimentar entre grupos suplementados e não suplementados com fitase, alinhando-se com estudos anteriores. Nas análises de digestibilidade, o tratamento CN2 + SUNPHASE destacou-se, indicando melhores níveis de digestibilidade para matéria orgânica, energia bruta e proteína bruta. Pela primeira vez, observou-se que a fitase manteve os níveis de CK citosólica no grupo controle, sugerindo benefícios na manutenção das funções celulares normais e recuperação pós estresse metabólico. Em grupos com proporções mais baixas de Ca:P, o estresse metabólico foi maior, levando a uma maior demanda de enzimas CK citosólicas. Os níveis de adenilato quinase foram mais altos nos tratamentos CN3, indicando aumento na demanda energética, provavelmente relacionada às alterações nos níveis ideais de Ca:P. Podemos concluir que a adição da enzima fitase associado a dietas com concentrações recomendadas ou ligeiramente diminuídas de cálcio e fósforo podem reduzir o estresse oxidativo e injúrias celulares no tecido intestinal de frangos de corte, não afetando os parâmetros de digestibilidade e melhorando o desempenho dos animais.

**Palavras-chave:** Ácido Fítico; Digestibilidade; Enzimas; TBARS.

## ABSTRACT

The search for greater productivity at low cost is a constant objective in poultry farming. Poultry feed represents a large part of production costs, mainly due to energy, protein sulfur amino acids, and lysine. Minerals, such as phosphorus, also have an impact on feed costs, corresponding to around 2% to 3% of total. The phytase enzyme appears as a possibility to optimize the use of nutrients with the degradation of phytate, which, when present, can reduce its anti-nutritional effects and release phytic phosphorus. This enzyme-made feed formulated with corn and soybean meal is more advantageous in economic terms, as its addition associated with the reduction of minerals in the diet does not harm the animals' performance. The study evaluated zootechnical performance, digestibility coefficients, and enzyme levels in chickens subjected to different dietary levels of calcium and phosphorus, with or without the addition of phytase. There was no statistical difference in weight gain and feed conversion between groups supplemented and not supplemented with phytase, aligning with previous studies. In digestibility analyses, the CN2 + SUNPHASE treatment stood out, indicating better levels of digestibility for organic matter, crude energy, and crude protein. For the first time, it was observed that phytase maintained cytosolic CK levels in the control group, suggesting benefits in maintaining normal cellular functions and post-metabolic stress recovery. In groups with lower Ca:P ratios, metabolic stress was higher, leading to an increased demand for cytosolic CK enzymes. Adenylate kinase levels were higher in CN3 treatments, indicating an increase in energy demand, likely related to changes in the optimal Ca:P levels. We can conclude that adding the phytase enzyme to diets with recommended or slightly reduced concentrations of calcium and phosphorus may reduce oxidative stress and cellular injuries in the intestinal tissue of broiler chickens, without affecting digestibility parameters, and improving animal performance.

**Keywords:** Phytic Acid; Digestibility; Enzymes; TBARS.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Tratamento CP - Imagem histológica intestinal. Intestino apresenta perda da arquitetura tecidual típica, com vilosidades sem delimitação evidente, Hematoxilina e Eosina, aumento de 400x. (A). Maior aumento de A, seta indica moderado infiltrado inflamatório composto por mononucleares (linfócitos e plasmócitos) entre as criptas de Lieberkühn, Hematoxilina e Eosina, aumento de 400x. (B).....45
- Figura 2 – Tratamento CN1 - Imagem histológica intestinal. Intestino apresenta perda da arquitetura tecidual típica, com vilosidades sem delimitação evidente, Hematoxilina e Eosina, aumento de 400x. (C). Maior aumento de A, seta indica acentuado infiltrado inflamatório mononuclear (linfócitos e plasmócitos) entre as criptas de Lieberkühn, Hematoxilina e Eosina, aumento de 400x. (D).....45
- Figura 3 – Tratamento CN2 - Imagem histológica intestinal. Intestino apresenta perda da arquitetura tecidual típica, com vilosidades sem delimitação evidente, Hematoxilina e Eosina, aumento de 400x. (E). Maior aumento de A, seta indica acentuado infiltrado inflamatório composto por células mononucleares (linfócitos e plasmócitos) entre as criptas de Lieberkühn, Hematoxilina e Eosina, aumento de 400x. (F).....46
- Figura 4 – Tratamento CN3 - Imagem histológica intestinal. Intestino apresenta perda da arquitetura tecidual típica, com vilosidades sem delimitação evidente, Hematoxilina e Eosina, aumento de 400x. (G). Maior aumento de A, seta indica moderado infiltrado inflamatório mononuclear (linfócitos e plasmócitos) entre as criptas de Lieberkühn, Hematoxilina e Eosina, aumento de 400x. (H).....46
- Figura 5 – Tratamento CP+SUNPHASE - Imagem histológica intestinal. Intestino apresenta perda da arquitetura tecidual típica, com vilosidades sem delimitação evidente, Hematoxilina e Eosina, aumento de 400x. (I). Maior aumento de A, seta indica acentuado infiltrado inflamatório mononuclear (linfócitos e plasmócitos) entre as criptas de Lieberkühn, Hematoxilina e Eosina, aumento de 400x. (J).....47
- Figura 6 – Tratamento CN1+SUNPHASE - Imagem histológica intestinal. Intestino apresenta perda da arquitetura tecidual típica, com vilosidades sem delimitação evidente, Hematoxilina e Eosina, aumento de 400x. (K). Maior aumento de A, seta indica moderado infiltrado inflamatório mononuclear (linfócitos e plasmócitos) entre as criptas de Lieberkühn, Hematoxilina e Eosina, aumento de 400x. (L).....47

Figura 7 – Tratamento CN2+SUNPHASE - Imagem histológica intestinal. Intestino apresenta perda da arquitetura tecidual típica, com vilosidades sem delimitação evidente, Hematoxilina e Eosina, aumento de 400x. (M). Maior aumento de A, seta indica moderado infiltrado inflamatório composto de células mononucleares (linfócitos e plasmócitos) entre as criptas de Lieberkühn, Hematoxilina e Eosina, aumento de 400x. (N).....47

Figura 8 – Tratamento CN3+SUNPHASE - Imagem histológica intestinal. Intestino apresenta perda da arquitetura tecidual típica, com vilosidades sem delimitação evidente, Hematoxilina e Eosina, aumento de 400x. (O). Maior aumento de A, seta indica discreto infiltrado inflamatório mononuclear (linfócitos e plasmócitos) entre as criptas de Lieberkühn, Hematoxilina e Eosina, aumento de 400x. (P).....48

Figura 9 – Histologia de ossos da tíbia, tratamentos identificados nas imagens (1 ao 8). Setas indicam osteócitos típicos e asterisco indica trabécula óssea contendo matriz mineralizada. Pontas de seta indicam medula óssea. Hematoxilina e Eosina, aumento de 400x.....48

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Ingredientes e composição calculada das dietas usadas no experimento.....	30
Tabela 2 – Índices de desempenho zootécnico.....	38
Tabela 3 – Coeficientes de digestibilidade.....	40
Tabela 4 – Enzimas da rede fosfotransferase.....	42
Tabela 5 – Enzimas do status oxidativo.....	44
Tabela 6 – Concentrações de matéria mineral, cálcio e fósforo em ração, túbias e fezes.....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CKCit	Creatina Quinase Citosólica
CKMit	Creatina Quinase Mitocondrial
AK	Adenilato Quinase
PK	Piruvato Quinase
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
FRAP	Capacidade de Redução de Ferro
NOx	Nitrito e nitrito
EROs	Espécies reativas de oxigênio
Ca	Cálcio
P	Fósforo
FTU	Unidade de atividade de fitase
ATP	Trifosfato de adenosina
PEP	Fosfoenilpiruvato
ADP	Difosfato de adenosina
MDA	Malonaldeído
DNA	Ácido Desoxirribonucleico"
AMP	Monofosfato de adenosina
MAPA	Ministério da agricultura e da pecuária
TCA	Ácido tricloroacético
OH	Radical hidroxila
H2O2	Peróxido de hidrogênio
O2	Ânion superóxido
HE	Hematoxilina e Eosina
MS	Matéria seca
PB	Proteína Bruta
EB	Energia bruta
MM	Matéria mineral
MO	Matéria orgânica
CA	Conversão alimentar
GP	Ganho de peso

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>16</b>
2.1	FÓSFORO E CÁLCIO NA ALIMENTAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE .	16
2.2	INTERAÇÃO DO CÁLCIO E FÓSFORO COM O TECIDO ÓSSEO.....	17
2.3	EFEITOS ANTINUTRICIONAIS DO ÁCIDO FITICO .....	19
2.4	FITASES .....	21
2.5	METABOLISMO ENERGÉTICO.....	24
2.6	ESTRESSE OXIDATIVO .....	25
<b>3</b>	<b>ESTRESSE OXIDATIVO E ENZIMAS DO METABOLISMO ENERGÉTICO DE FRANGOS ALIMENTADOS COM DIETAS CONTENDO FITASE ....</b>	<b>27</b>
3.1	INTRODUÇÃO .....	27
3.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
<b>3.2.1</b>	<b>Produto.....</b>	<b>29</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Dieta, animais e instalações .....</b>	<b>29</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Desenho experimental .....</b>	<b>32</b>
<b>3.2.4</b>	<b>Desempenho zootécnico .....</b>	<b>32</b>
<b>3.2.5</b>	<b>Coleta de amostras .....</b>	<b>32</b>
<b>3.2.6</b>	<b>Análises de digestibilidade .....</b>	<b>32</b>
<b>3.2.7</b>	<b>Concentrações de Ca e P em ração, fezes e tíbias.....</b>	<b>33</b>
<b>3.2.8</b>	<b>Análises histológicas.....</b>	<b>34</b>
<b>3.2.9</b>	<b>Metabolismo energético: Enzimas CK citosólica, CK mitocondrial, AK e PK. ....</b>	<b>34</b>
<b>3.2.10</b>	<b>Status oxidativo.....</b>	<b>35</b>
3.2.10.1	<i>TBARS .....</i>	35
3.2.10.2	<i>Proteína carbonila .....</i>	35
3.2.10.3	<i>Capacidade de redução do ferro (FRAP) .....</i>	35
3.2.10.4	<i>Níveis de NOx .....</i>	36
<b>3.2.11</b>	<b>Análises estatísticas .....</b>	<b>36</b>
3.3	RESULTADOS .....	37
<b>3.3.1</b>	<b>Desempenho zootécnico .....</b>	<b>37</b>
<b>3.3.2</b>	<b>Digestibilidade .....</b>	<b>39</b>
<b>3.3.3</b>	<b>Metabolismo energético .....</b>	<b>41</b>

<b>3.3.4</b>	<b>Parâmetros de estresse oxidativo .....</b>	<b>43</b>
<b>3.3.5</b>	<b>Histologia intestinal .....</b>	<b>45</b>
<b>3.3.6</b>	<b>Histologia óssea.....</b>	<b>48</b>
<b>3.3.7</b>	<b>Concentrações de Ca e P em ossos, ração e fezes.....</b>	<b>49</b>
<b>3.4</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>52</b>
<b>3.5</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>55</b>
<b>4</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>56</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A alimentação dos frangos de corte equivale a 70% dos custos integrais de produção, emergindo como uma das principais fontes de despesas na atividade avícola. Os componentes nutricionais de maior relevância para os custos ligados à formulação das rações incluem a energia e a proteína e os minerais. Dentre eles, o fósforo contribui com cerca de 2% a 3% do montante total das despesas com a ração (SCHOULTEN et al., 2003). O fitato ou ácido fítico, composto naturalmente presente em vegetais como o milho e a soja, é amplamente estudado, uma vez que é reconhecido como um fator antinutricional em rações para frangos de corte (GIBSON et al., 2018; INGELMANN et al., 2019). Essa molécula contém aproximadamente 80% do fósforo presente em sementes vegetais e possui a capacidade de interagir e complexar-se com outros componentes alimentares, diminuindo a absorção de nutrientes como cálcio, zinco, ferro, manganês, proteínas, peptídeos e aminoácidos (ABD EL-HACK et al., 2018).

Os efeitos adversos do fitato em dietas de frangos de corte já foram amplamente estudados e a forma de mitigá-los utilizada é por meio de enzimas exógenas como as fitases ou o mio-inositol (1,2,3,4,5,6) hexofosfatato fosfohidrolase, um subgrupo das fosfomonoesterases capazes de desfosforilar os fitatos, liberando o ácido fítico e outros nutrientes, reduzindo seu efeito antinutricional. Nesse contexto, tais enzimas permitem reduzir a excreção de fósforo pelas aves, trazendo benefícios como a redução da poluição ambiental e dos custos com ração, ganhando relevância no âmbito da avicultura. Além de melhorar a absorção de nutrientes pelos animais, a utilização de fitase exógena também viabiliza a redução do emprego de fósforo (P) inorgânico e a diminuição na excreção de fósforo não absorvido no ambiente (ABBASI et al., 2019).

A disponibilidade de cálcio e fósforo, assim como a relação entre eles na dieta, exercem influência sobre sua absorção no intestino. Um aumento na disponibilidade e absorção intestinal de fósforo tem um impacto negativo no metabolismo do cálcio, e um excesso de fósforo terá efeitos negativos no próprio metabolismo desses minerais. Isso parece ser particularmente verdadeiro quando a ingestão de cálcio é moderada a baixa, como ocorre em dietas à base de grãos e ricas em fosfato (VÖTTERL et al., 2020).

Atualmente, a fitase é utilizada não somente pela liberação do ácido fítico, mas também como uma ferramenta de redução dos efeitos anti-nutricionais do fitato e a disponibilização de outros ingredientes ligados a molécula de fitato ou que podem ligar-se a esta durante o processo de digestão. A presença do mio-inositol circulante, produto final da hidrólise total do fitato que libera 6 fosfatos e 1 anel de mio-inositol, ocasionam melhora no sistema imune, osteogênese, desenvolvimento celular, embrionário, fertilidade e as funções do sistema nervoso central. Desta forma, esse estudo tem como objetivo avaliar os efeitos da suplementação de fitase em dietas que apresentam distintos níveis de fósforo e cálcio, sobre o desempenho, a composição mineral óssea, o metabolismo energético e o estresse oxidativo de frangos de corte com 21 dias.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 FÓSFORO E CÁLCIO NA ALIMENTAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE

Compostos minerais possuem papel importante na alimentação de frangos de corte possibilitando o desenvolvimento em fases iniciais e a manutenção do esqueleto através da mineralização óssea (KACZMAREK, et al. 2016). O cálcio destaca-se por ser o mineral mais abundante no corpo animal e é considerado um elemento chave para regulação de processos celulares como a excitabilidade neural, além de compor a porção mineral do osso sendo o principal constituinte a matriz óssea. Segundo Klasing (1999), o cálcio é o mineral metabolicamente mais ativo, com um complexo sistema regulatório. Em contrapartida, o fósforo também é considerado elemento essencial para a formação da estrutura, pois se encontra combinado com o cálcio na forma de hidroxiapatita. Esse mineral também participa da formação de membranas celulares e na manutenção do equilíbrio osmótico e eletrolítico. O fósforo é indicado como o terceiro nutriente mais caro em uma ração para monogástricos, ficando atrás somente da energia e da proteína (BOLING et al., 2000).

No processo de absorção do P existe a necessidade do equilíbrio entre os íons cálcio e fósforo no trato intestinal, para que a absorção se processe normalmente, equilíbrio que se convencionou chamar de relação cálcio:fósforo que em seus termos gerais se situa entre 2:1 (ADEDOKUN & ADEO-LA, 2013). O fósforo vem sendo objetivo de muitas pesquisas mundiais, não somente devido a sua importância nutricional e econômica, mas também a sua importância ambiental. A eliminação exacerbada desse mineral através das fezes e urina dos animais pode causar sérios impactos ao meio ambiente devido a eutrofização e nitrificação que provocam a contaminação do solo (MUNIR & MAQSOOD, 2013). A partir do solo, o excesso de fósforo pode ser lixiviado para as águas dos rios e lagos ocorrendo a diminuição da quantidade de oxigênio.

O cálcio e o fósforo são disponibilizados para frangos por meio da suplementação alimentar e pode ser encontrado em fontes de origem animal, vegetal ou mineral, sendo a fonte um fator determinante no aproveitamento, nos custos e mesmo na excreção. Fontes com elevada concentração de cálcio incluem rochas calcárias, conchas calcárias e algas calcárias (MUNIZ, et al.,

2007). Existem também várias fontes naturais como fosfatos de rocha, depósitos de guano, farinha de carne e/ou ossos. Entretanto, a maioria dos fosfatos utilizados na alimentação avícola constitui-se em produtos quimicamente processados. O grupo dos fosfatos bicálcicos é produzido por intermédio da reação do ácido fosfórico com calcário, originando os fosfatos monocálcicos e bicálcicos nestes processos químicos (ADEOLA & WALK, 2013).

Os níveis de cálcio e fósforo da ração podem influenciar na utilização do ácido fítico (EDWARDS Jr & VELTMAN, 1983). Aves que consumiram ração com baixos níveis de fósforo e cálcio inorgânicos apresentaram maior capacidade de hidrólise do fitato comparado ao grupo que recebeu altos níveis, pois a relação Ca:P exerce influencia na atividade da fitase que, por sua vez, tem sua ação reduzida em dietas com altas concentrações de Ca (QIAN et al., 1997). A elevação da proporção de Ca:P da dieta pode reduzir o desempenho de frangos alimentados com dietas a base de farelo de milho e soja, suplementados com fitase, devido a reação do cálcio com o ácido fítico, formando o fitato de cálcio que precipita e não pode ser hidrolisado pela fitase (SCHOULTEN et al., 2003).

A exigência diária de cálcio é de 1% na fase de 1 a 21 dias e 0,90% de 22 a 42 dias segundo o NRC (1994), para dietas com 3.200Kcal/kg. Schoultten et al. (2003), com o objetivo de avaliar os níveis de cálcio (0,46%, 0,67%, 0,88%, 1,09% e 1,30%) em rações suplementadas com a enzima fitase em frangos de 1 a 21 dias de idade, verificaram que os machos apresentaram maior consumo e ganho de peso comparado as fêmeas; já o ganho de peso apresentou uma redução linear com o aumento dos níveis de Ca. Os autores concluíram que elevados níveis de cálcio na ração suplementada com fitase afetou negativamente o ganho de peso, a deposição de fósforo e manganês na tíbia, e os baixos níveis de Ca prejudicaram a digestibilidade da matéria seca e a retenção do nitrogênio.

## 2.2 INTERAÇÃO DO CÁLCIO E FÓSFORO COM O TECIDO ÓSSEO

O sistema ósseo desempenha diversas funções essenciais para os animais, como proteger tecidos e órgãos, fornecer suporte estrutural para o corpo auxiliando na movimentação, além de abrigar a medula óssea. (PIZAURO

JÚNIOR, 2002). O tecido ósseo é um tipo de tecido conjuntivo especializado, dinâmico e vascularizado, sendo composto por uma matriz orgânica mineralizada e abrigando uma população heterogênea de células (EURELL; SICKLE, 2012; ABRAHAMSOHN, 2017). A formação e o remodelamento ósseo ocorre por meio da atividade sincronizada dessas células, sendo elas os osteoblastos, osteócitos, osteoclastos e de células osteogênicas ou osteoprogenitoras (EURELL; SICKLE, 2012; GOFF, 2017; ABRAHAMSOHN, 2017; PIZAURO JUNIOR; SANTOS; GONÇALVES, 2017).

A matriz extracelular do tecido ósseo é composta por elementos orgânicos (22%), minerais (69%) e água (9%). Conforme apontado por Eastell e Lambert em 2002, aproximadamente 70 a 80% da massa óssea é determinada geneticamente, enquanto os 20 a 30% restantes são influenciados por fatores externos. Entre eles, a nutrição é o fator principal, exercendo influência direta sobre a composição e as características ósseas em frangos de corte (SGAVIOLI et al., 2017; MUSZYŃSKI et al., 2018). A matriz orgânica desempenha um papel fundamental na homeostase e é responsável pela elasticidade do osso. Ela é composta principalmente por fibras colágenas, representando cerca de 95% da composição, enquanto os restantes 5% incluem proteoglicanos e proteínas não colágenas (GOFF, 2017; ABRAHAMSOHN, 2017; PIZAURO JUNIOR; CIANCAGLINI; MACARI, 2002).

Íons de cálcio e fósforo, na forma de cristais de hidroxiapatita, constituem a maior parte da composição mineral dos ossos, enquanto em quantidades menores estão presentes o bicarbonato, magnésio, potássio, sódio, citrato, cloreto e fluoreto (GOFF, 2017; ABRAHAMSOHN, 2017). Em conjunto com o colágeno, as proteínas não colágenas da matriz desempenham um papel crucial na criação de um suporte para a deposição da hidroxiapatita, sendo essa associação responsável pela típica rigidez e resistência do osso (GOFF; 2017).

Tanto o cálcio quanto o fósforo desempenham papéis cruciais no metabolismo dos animais, especialmente no que diz respeito à formação dos ossos. Portanto, a falta ou o excesso desses minerais na dieta dos animais pode prejudicar o seu desempenho máximo (PIZAURO JUNIOR; CIANCAGLINI; MACARI, 2002). A resposta das aves à quantidade de cálcio e fósforo na dieta e as necessidades específicas desses minerais são influenciadas pela taxa de

crescimento (LI et al., 2016). O período de formação óssea ocorre entre o 4º e o 18º dia de vida, a fim de proporcionar o suporte esquelético necessário para o crescimento das aves (WILLIAMS, 2000). A demanda de cálcio e fósforo aumenta durante essa fase e, posteriormente, diminui (NIE et al., 2013).

Uma inadequada suplementação mineral durante o período de crescimento resultará em desequilíbrio na homeostase mineral e no desenvolvimento inadequado dos ossos das aves, levando a uma calcificação anormal dos ossos (MUNIZ et al., 2007). No entanto, o excesso de cálcio pode atuar como um antagonista, dificultando a absorção de outros minerais, como ferro, cobre, zinco, magnésio, sódio e potássio, entre outros. O sintoma principal de deficiência de cálcio e fósforo é um desempenho reduzido das aves, além do aparecimento de problemas locomotores (ARAÚJO et al., 2008).

### 2.3 EFEITOS ANTINUTRICIONAIS DO ÁCIDO FITICO

Os principais ingredientes para a nutrição de frangos de corte no Brasil são de origem vegetal, sendo o milho e o farelo de soja os maiores constituintes das rações comerciais, contribuindo para o fornecimento de energia, proteína, vitaminas e minerais (COSTA et al., 2007). Ingredientes de origem vegetal possuem o ácido fítico, substância que limita a utilização de nutrientes pelas aves. Na sua molécula encontramos principalmente o fósforo, elemento que possui baixa solubilidade no intestino delgado e grande capacidade de ligação com outros nutrientes reduzindo a disponibilidade destes pelo organismo animal (WOYENGO & NYACHOTI, 2011). O fitato é a principal forma de armazenamento do fósforo (P) durante o desenvolvimento de grãos, legumes e sementes, sintetizado a partir da fosforilação completa do mio-inositol.

Os fitatos são uma classe complexa de compostos de sais de mio-inositol que ocorrem naturalmente na maturação das sementes e grãos de cereais (TORRE et al., 1991). Nas leguminosas, o fitato concentra cerca de 70% do fósforo, sendo a principal forma de armazenamento (ZHOU & ERDMAN, 1995). Os fitatos são moléculas muito reativas; em pH abaixo de 1,0 a molécula terá carga neutra tornando-se pouco reativo, porém quando exposto ao pH entre 1,1 a 2,0 o fitato perde 6 prótons e adquire carga negativa, tornando-se capaz de reagir com aminoácidos e resíduos de proteínas (DAYYANI et al., 2013). Essa

carga negativa confere ao fitato grande capacidade de complexar-se com moléculas carregadas positivamente como é o caso de algumas proteínas e minerais.

A molécula de fitato e os nutrientes ligados a ela não podem ser absorvidos no duodeno sem a uma reação de hidrólise enzimática realizada pelas fitases (GUPTA et al., 2015). A afinidade do fitato aos cátions da dieta varia de acordo com o pH encontrado no trato gastrointestinal animal. A maioria dos quelatos de fitato com minerais são solúveis a um pH menor que 3,5, porém, a moela e intestino delgado das aves possui um ambiente próximo a neutralidade. Esse pH neutro favorece a formação de quelatos de fitato com minerais insolúveis diminuindo a disponibilidade de fósforo e de outros nutrientes. A excreção dos minerais não absorvidos também se torna um problema, visto que, se não são absorvidos, esses nutrientes são eliminados em excesso para o ambiente. Por isso é tão importante que a degradação do fitato ocorra na porção inicial do trato digestório das aves, pois quando o fitato encontra-se em pH próximo a 7,0, forma complexos com os metais  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Ca}^{2+}$ , disponibilizando-os para a absorção (ORBELEAS, 1973).

Outros fatores envolvidos na interação do ácido fítico com os nutrientes incluem a presença de enzima fitase ou enzimas intestinais bacterianas que disponibilizam componentes de menor peso molecular como o mio-inositol fostato, inositol e fósforo inorgânico (NISSAR, et al., 2017). Em animais poligástricos, as moléculas de fitato podem ser decompostas por bactérias no rúmen durante o processo de fermentação, assim o fósforo pode ser liberado e absorvido pelo organismo desses animais. Por sua vez, animais não ruminantes monogástricos como as aves e os suínos, possuem quantidades insuficientes de enzimas que degradam o ácido fítico, o que contribui ainda mais para o seu efeito antinutricional.

Cowieson et al. (2006) demonstraram que o fitato tem a capacidade de alterar o processo de renovação do epitélio de revestimento intestinal, aumentando a produção de mucinas pelas células caliciformes e colaborando com a perda de nitrogênio endógeno. Esse mesmo processo foi verificado por Onyango et al. (2009) que concluíram que o fitato afeta a mucosa intestinal e contribui com a perda de aminoácidos endógenos como a arginina, treonina e

glicina. Diversos autores (COWIESON, et al., 2006; LIU, et al., 2009; SELLE, et al., 2007) justificam que a ligação do fitato com minerais e nutrientes dificulta o acesso das enzimas digestivas, além das agressões causadas pelo fitato na mucosa intestinal que contribuem com as perdas causadas pela não absorção. Cowieson et al. (2006) relatam que existe interação eletrostática das proteínas e dos fitatos, resultando em menor teor de água em torno dos nutrientes, diminuindo assim a solubilidade e digestibilidade de determinadas substâncias.

Em virtude da baixa disponibilidade de fósforo nos ingredientes de origem vegetal frequentemente utilizados nas rações de aves e a reduzida produção de fitase endógena por esses animais, comumente são incrementadas quantidades de fósforo inorgânico nas dietas (APPLEGATE et al., 2003). Com isso, se observa o aumento dos custos de produção das rações e maiores impactos ambientais devido ao uso de fontes minerais não renováveis e ao excesso de fósforo nas excretas.

## 2.4 FITASES

Fitases são enzimas exógenas usadas na alimentação de monogástricos como as aves e os suínos e são capazes de catalisar a degradação de fitato liberando o ortofosfato e fosfatos de inositol para serem absorvidos. O processo de hidrólise do fitato inicia com a remoção gradual do grupo fosfato da molécula de ácido fítico. A reação começa com um ácido fítico totalmente fosforilado (IP6), seguido de penta- (IP5), tetra- (IP4), tri- (IP3), di e monoésteres do inositol em descendentes ordem de preferência. O final do processo resulta em um mio-inositol e fosfato (SELLE, et al., 2007).

É amplamente conhecido o efeito do mio-inositol, suas propriedades e funções metabólicas semelhantes às da insulina, na translocação de GLUCN3 (o principal transportador em mamíferos de glicose sensível à insulina) para a membrana plasmática. Estudos de Dang et al. (2010) e Yamashita et al. (2013) sugerem que o mio-inositol possa regular o transporte de glicose, a gliconeogênese e a deposição de proteína em mamíferos. Espécies aviárias não possuem GLUCN3, o que significa que este efeito de simulação deveria, teoricamente, estar restrito a suínos e outros mamíferos. Em contrapartida, Tokushima et al., 2005 e Sweazea & Braun, 2006 confirmam que as aves são

sensíveis à insulina e é provável que haja transportadores alternativos de glicose nas aves e que estariam envolvidos com estes efeitos.

Plantas, animais e microorganismos (bactérias e leveduras) possuem grande quantidade de fitase. O trato digestório das aves também é capaz de produzir essa enzima, porém, em quantidades insuficientes para uma hidrólise eficaz dos fitatos dietéticos. Alimentos como trigo, cevada e farelo de arroz são ricos em fitase, entretanto, o milho e o farelo de soja, maiores constituintes das rações comerciais, possuem baixa concentração dessa enzima. (COSTA et al., 2007).

A quantidade de fitase adicionada em dietas para nutrição de animais pode ser mensurada através da unidade de atividade de fitase (FTU). A FTU é definida pela quantidade de enzima que libera 1 micromol de fósforo inorgânico em 1 minuto num substrato de sódio-fitato a 37°C em pH 5,5. Diferentes concentrações de FTU têm sido usadas comercialmente como ferramenta para reduzir o impacto ambiental da produção de aves e suínos com melhora na rentabilidade da cadeia produtiva desde 1990. A princípio, a fitase era destinada apenas para hidrolisar o fitato e liberar o fósforo, com uma dose consensual estabelecida de 500 FTU/kg. Em estudos posteriores foi observado que a enzima não possuía apenas a capacidade de aproveitamento do cálcio e fosforo da dieta, mas também de proteína e energia (NASCIMENTO, 2017).

Existem várias fitases que foram desenvolvidas especialmente para a indústria avícola. São comumente usadas as fitases derivadas de fungos produzidas a partir do gênero *Aspergillus niger*, *Peniophora lycii*, e as fitases de origem bacteriana produzida a partir do gênero *Escherichia coli*. Fitases de origem bacteriana e fúngica são diferenciadas em duas categorias, 3-fitase e 6-fitase, caracterizadas pelo local em que a hidrólise da molécula de ácido fítico é iniciada no trato gastrointestinal das aves (SELLE, et al., 2007). Como resultado, cada fitase possui diferentes propriedades que contribuem na melhoria da digestibilidade do fósforo, cálcio, aminoácidos e energia.

Em virtude da reduzida disponibilidade de fósforo nos ingredientes de origem vegetal usados na fabricação de rações e da produção insuficiente de fitase endógena pelas aves, Applegate et al. (2003) relataram que é comum a incrementação de fósforo inorgânico nas dietas. Essa medida está relacionada

com o aumento do custo de produção e dos teores de fósforo nas excretas, o que pode causar impactos ambientais. Quanto ao custo, é estimado que o fósforo (P) é um dos principais elementos e o mais oneroso (2 a 3% do custo total) a ser incluído na dieta. Estudos recentes têm apontado os benefícios da suplementação de fitase e a maior absorção de fósforo e outros nutrientes pelas aves, aumentando o desempenho delas. Pesquisas de Angel et al. (2002) confirmaram que a inclusão de 600 FTU/kg de fitase em ração aumentou o ganho de peso diário e o consumo de ração diário de frangos alimentados com dietas deficientes em cálcio e fósforo não fítico.

Laurentiz et al. (2009) afirma que a adição de 500 FTU/kg de ração é suficiente para garantir o desempenho de aves de corte quando níveis de fósforo disponível da ração são reduzidos em média de 18% e 36% em relação ao ideal.

Em estudos recentes, a inclusão de 1.500 FTU/kg de ração melhorou o desempenho, particularmente a taxa de conversão alimentar de frangos alimentados com dietas contendo níveis reduzidos de cálcio (0,16%) e fosfóro disponível (0,15%) (WALTERS et al., 2019). Os autores afirmam que as melhorias na eficiência alimentar estão associadas a maior absorção de nutrientes da dieta e a diminuição do substrato em lúmen intestinal. Com menos substrato disponível, têm-se um controle das bactérias com potencial patogênico e melhora na saúde intestinal (LIMA, 2018). Superdosagens da enzima foram utilizadas por Castro et al. (2019) ao suplementarem 2500 FTU/kg de fitase com redução de cálcio e fósforo na ração de frangos. Os autores observaram acréscimo no ganho de peso dos animais, o que demonstra que a fitase conseguiu suprir a redução nutricional.

Efeitos extra intestinais foram estudados por Qian et al. (1996), que realizou análise das propriedades histológicas, mecânicas e químicas da fitase nas tíbias de frangos de corte. A suplementação com a enzima em dietas com baixo teor de fósforo aumentou a largura das zonas cartilaginosas e a densidade óssea da tíbia, além da melhora na mineralização e desenvolvimento dos condroblastos e osteoclastos. Na pesquisa, as tíbias dos animais suplementados com fitase foram mais longas e largas e houve uma melhora na força de ruptura, colaborando com a hipótese de uma melhor mineralização óssea. Além dos

benefícios sobre as características ósseas, a fitase melhorou a conversão alimentar e o ganho de peso corporal.

## 2.5 METABOLISMO ENERGÉTICO

A melhora na metabolizabilidade da matéria seca do fósforo, da proteína bruta e da energia metabolizável aparente encontra-se entre os fatores associados a adição de fitase na dieta elaborada a base de milho e soja para frangos de corte. O metabolismo energético é o conjunto de processos que as células vivas utilizam para adquirir e empregar energia essencial para sua sobrevivência, crescimento e reprodução (REECE, 2017). A liberação de energia a partir dos alimentos ocorre por meio da coordenação entre a oxidação de nutrientes e a síntese de substâncias de alta energia, como o trifosfato de adenosina (ATP), que desempenha um papel fundamental como a principal molécula transportadora de energia (DZEJA e TERZIC, 1998). Algumas enzimas desempenham papéis fundamentais na regulação dos níveis de ATP, mantendo a homeostase entre a liberação e a captação de energia transferindo grupos fosforil entre os locais de síntese e utilização do trifosfato de adenosina (ATP). Enzimas como a Creatina Quinase (CK), Piruvato Quinase (PK) e Adenilato Quinase (AK), possuem funções específicas que contribuem para o equilíbrio das células e dos tecidos (DE FRANCESCHI et al. 2013).

A CK é considerada um controlador central da homeostase energética por meio da catálise reversível de um grupo fosforil do ATP para o difosfato de adenosina (ADP) e creatina para produzir fosfocreatina (PCr). Essa reação exerce um papel presumível na divisão celular e na motilidade celular. A CK desempenha um papel vital na manutenção da energia em células que requerem energia de forma intermitente, como as células musculares (TOREN et al., 1994). A AK é responsável pela conversão entre ATP, adenosina difosfato (ADP) e adenosina monofosfato (AMP), facilitando a transferência de energia entre esses nucleotídeos (VALENTINI et al., 2000). A PK, por sua vez, é uma enzima chave no metabolismo celular, regulando a via glicolítica e a principal rota para o fornecimento de energia adequado ao funcionamento dos tecidos. Ela catalisa a transfosforilação irreversível do fosfoenolpiruvato (PEP) para ADP para formar piruvato e ATP (DE FRANCESCHI et al. 2013).

## 2.6 ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo é um processo biológico que se manifesta através do aumento na geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). Essas EROs, juntamente com os radicais livres, desempenham papéis como mediadores de danos em vários tecidos, sendo encontrados em condições como lesões isquêmicas e respostas inflamatórias (PULIDO et al., 2000). Quando presentes em concentrações apropriadas no organismo, algumas EROs, como o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxila ( $OH^\cdot$ ), desempenham funções fisiológicas importantes, atuando como sinalizadores celulares e combatendo agentes infecciosos (SINGH, et al., 2019).

Em resposta ao aumento nas EROs, ocorre um incremento nas defesas antioxidantes na tentativa de restaurar o equilíbrio oxidativo nas células e compensar o excesso de radicais livres circulantes. No entanto, em situações de estresse oxidativo, a produção de EROs ultrapassa a capacidade das defesas antioxidantes do organismo, resultando em danos às proteínas, lipídios e DNA (HWANG e KIM, 2007). A geração de EROs pode causar danos às macromoléculas celulares e, como resultado desse estresse oxidativo, ocorre a morte celular por meio de mecanismos apoptóticos e necróticos (WANG et al., 2016).

O dano oxidativo aos lipídios presentes na membrana das células leva ao aumento da peroxidação lipídica. A extensão desse processo pode ser quantificada medindo-se as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). O malonaldeído (MDA), que faz parte do TBARS, é o aldeído mais comumente encontrado na peroxidação lipídica (ZHOU et al., 2015). Por outro lado, o dano oxidativo às proteínas pode ser avaliado por meio da medição dos grupos carbonil, como a proteína carbonila, utilizando métodos espectrofotométricos (LEVINE et al., 2000). Além disso, aumentos nas defesas antioxidantes podem ser mensuradas através do potencial redutor do ferro (FRAP) por meio do ensaio de FRAP, um método em que a substância antioxidante promove redução do  $Fe^{3+}$  (forma férrica) em sua forma ferrosa ( $Fe^{2+}$ ) (PULIDO et al., 2000). Já as alterações nas concentrações de NOX (NADPH oxidase, do inglês) podem ser explicadas devido essa enzima atuar produzindo as EROS, que agem em vias de sinalização e nos mecanismos

básicos de defesa dos organismos (WINGLER, et al., 2011). Quando em excesso, a NOX indica um excesso na geração de EROs, o que pode induzir a formação de efeitos pró-oxidantes como a apoptose e necrose celular (WINGLER, et al., 2011).

### **3 ESTRESSE OXIDATIVO E ENZIMAS DO METABOLISMO ENERGÉTICO DE FRANGOS ALIMENTADOS COM DIETAS CONTENDO FITASE**

LIMA, J.L.F<sup>1</sup>.; ARAUJO, D.N.<sup>2</sup>; SILVA, A.S.da<sup>2</sup>; DEOLINDO, G.L.<sup>3</sup>; PICCOLI, F.<sup>2</sup>

Os resultados desta dissertação são apresentados na forma de artigo a ser submetido, com a seções de acordo com as orientações da Revista Brasileira de Ciência Avícola

#### **Resumo**

O estudo avaliou o desempenho zootécnico, coeficientes de digestibilidade e níveis de enzimas em frangos submetidos a diferentes níveis dietéticos de cálcio e fósforo, com adição ou não de fitase. Não houve diferença estatística no ganho de peso e conversão alimentar entre grupos suplementados e não suplementados com fitase, alinhando-se com estudos anteriores. Nas análises de digestibilidade, o tratamento CN2 + SUNPHASE destacou-se, indicando melhores níveis de digestibilidade para matéria orgânica, energia bruta e proteína bruta. Pela primeira vez, observou-se que a fitase manteve os níveis de CK citosólica no grupo controle, sugerindo benefícios na manutenção das funções celulares normais e recuperação pós estresse metabólico. Em grupos com proporções mais baixas de Ca:P, o estresse metabólico foi maior, levando a uma maior demanda de enzimas CK citosólicas. Os níveis de adenilato quinase foram mais altos nos tratamentos CN3, indicando aumento na demanda energética, provavelmente relacionada às alterações nos níveis ideais de Ca:P. Podemos concluir que a adição da enzima fitase associado a dietas com concentrações recomendadas ou ligeiramente diminuídas de cálcio e fósforo podem reduzir o estresse oxidativo e injúrias celulares no tecido intestinal de frangos de corte, não afetando os parâmetros de digestibilidade e melhorando o desempenho dos animais.

Palavras-chave: Ácido Fítico; Digestibilidade; Enzimas; TBARS.

#### **3.1 INTRODUÇÃO**

A busca por alcançar altos níveis de produtividade a custos cada vez menores constitui um compromisso constante das agroindústrias, organizações

de pesquisa e profissionais especializados no setor de avicultura de corte (BRANDÃO et al., 2007). A alimentação dos frangos de corte corresponde a 70% dos gastos totais de produção, representando uma das principais fontes de encargos para a atividade avícola. Os principais elementos nutricionais que contribuem significativamente para os custos associados à elaboração das rações incluem a energia e a proteína, com destaque para a aquisição de aminoácidos sulfurados e lisina. No que diz respeito aos minerais, o fósforo contribui com aproximadamente 2% a 3% do valor total das despesas com ração (SCHOULTEN et al., 2003). Além disso, o elemento ocupa uma posição de destaque entre os minerais requeridos em maior quantidade pelas aves. Isso se deve à sua importância não apenas para promover o crescimento, mas também para viabilizar a mineralização adequada dos ossos das aves (LAURENTIZ et al., 2007). Durante o processo de absorção de fósforo, é essencial manter um equilíbrio adequado entre os íons de cálcio e fósforo no trato intestinal. Esse equilíbrio, comumente referido como relação cálcio-fósforo, é fundamental para assegurar uma absorção normal. Em termos gerais, essa relação é estabelecida em cerca de 2:1 (CHIBA, 2009). A enzima conhecida como fitase adicionada a dieta de frangos de corte poderá reduzir os níveis de proteína e fósforo incorporados nas dietas, sem prejudicar o desempenho global e a integridade mineral dos ossos das aves.

A enzima fitase surge como uma possibilidade para otimizar a utilização dos nutrientes com a degradação do fitato, podendo, quando presente, diminuir seus efeitos antinutricionais e liberar fósforo fítico (ABBASI et al., 2019). Essa enzima tornou as rações formuladas com milho e farelo de soja mais vantajosas em termos econômicos, pois sua adição associada a redução dos minerais da dieta não prejudica o desempenho dos animais (LAMID et al., 2018). Nesse contexto, esse estudo tem como objetivo avaliar os efeitos da suplementação de fitase em dietas que apresentam distintos níveis de fósforo e cálcio, sobre o desempenho, a composição mineral óssea, a digestibilidade de nutrientes, o metabolismo energético e o estresse oxidativo de frangos de corte com 21 dias de vida.

## 3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.2.1 Produto

A enzima fitase SUNPHASE 5000 utilizada no estudo trata-se de uma fitase 6 fosfato, isolada da bactéria *E. coli* através da utilização de técnicas de engenharia genética, expressadas no fungo *Pichia pastoris* e produzida por fermentação líquida. É comercializada pela Tectron Importadora e Exportadora de Produtos Veterinários LTDA, empresa financiadora do presente trabalho.

### 3.2.2 Dieta, animais e instalações

O presente estudo foi realizado na Fazenda Experimental do CEO (FECEO) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), com período de alojamento experimental de março a maio de 2023. Utilizaram-se, neste experimento, 480 pintainhos de corte de 1 dia de idade, da linhagem Cobb500, machos sexados, vacinados contra a doença de Marek, com peso médio inicial de 42 g. Cada gaiola experimental continha um comedouro tipo calha de 30cm e bebedouros tipo *nipple*. As gaiolas tinham dimensões de 60cm de comprimento x 80cm de largura x 50cm de altura. As gaiolas encontravam-se dispostas em baterias metálicas de três andares. Água e ração experimental foram fornecidas à vontade desde o primeiro dia. As rações utilizadas foram isonutritivas, com exceção dos minerais em estudo. Foram utilizados quatro tratamentos com níveis diferentes de calcário calcítico e fosfato bicálcico, denominados como tratamentos controle (CP, CN1, CN2 e CN3); esses mesmos quatro tratamentos receberam adicionados a dieta a mesma dose de fitase Sunphase® (50g/ton), conforme detalhado na Tabela 1.



Fibra Bruta (%)	3,359	3,359	3,359	3,359	3,359	3,359	3,359	3,359
Cinzas (%)	6,065	6,065	6,065	6,065	6,065	6,065	6,065	6,065
Cálcio Disp Total (%)	0,960	0,840	0,810	0,780	0,960	0,840	0,810	0,780
Fósforo Total (%)	0,696	0,576	0,546	0,516	0,696	0,576	0,546	0,516
Fósforo Disponível (%)	0,480	0,360	0,330	0,300	0,480	0,360	0,330	0,300
Lisina Total (%)	1,329	1,329	1,329	1,329	1,329	1,329	1,329	1,329
Lisina Dig.Aves (%)	1,180	1,180	1,180	1,180	1,180	1,180	1,180	1,180
Met Total (%)	0,644	0,644	0,644	0,644	0,644	0,644	0,644	0,644
Met+Cist Total (%)	0,983	0,983	0,983	0,983	0,983	0,983	0,983	0,983
Met+Cist Dig. Aves (%)	0,885	0,885	0,885	0,885	0,885	0,885	0,885	0,885
Treonina Total (%)	0,886	0,886	0,886	0,886	0,886	0,886	0,886	0,886
Treonina Dig. Aves (%)	0,767	0,767	0,767	0,767	0,767	0,767	0,767	0,767
Triptofano Total (%)	0,267	0,267	0,267	0,267	0,267	0,267	0,267	0,267
Triptofano Dig. Aves (%)	0,223	0,223	0,223	0,223	0,223	0,223	0,223	0,223
Lis:M+C Total (%)	0,740	0,740	0,740	0,740	0,740	0,740	0,740	0,740
Lis:M+C Aves (%)	0,750	0,750	0,750	0,750	0,750	0,750	0,750	0,750
Lis:Tre Total (%)	0,667	0,667	0,667	0,667	0,667	0,667	0,667	0,667
Lis:Tre Aves (%)	0,650	0,650	0,650	0,650	0,650	0,650	0,650	0,650
Lis:Tri Total (%)	0,201	0,201	0,201	0,201	0,201	0,201	0,201	0,201
Colina Total (mg/kg)	1.550,89	1.550,89	1.550,89	1.550,89	1.550,89	1.550,89	1.550,89	1.550,89
Sódio (%)	0,200	0,200	0,200	0,200	0,200	0,200	0,200	0,200
Cloro (%)	0,300	0,300	0,300	0,300	0,300	0,300	0,300	0,300
Na+k-Cl (mEq/Kg)	215,750	215,729	215,727	215,725	215,750	215,729	215,727	215,725

### 3.2.3 Desenho experimental

Utilizando um delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 4 x 2 (4 níveis de Ca:P, com ou sem a inclusão da enzima fitase), as 480 aves foram distribuídas em oito tratamentos com seis repetições (gaiola) por tratamento, cada gaiola possuindo 10 animais cada. A divisão foi feita aleatoriamente no primeiro dia, respeitando um peso médio similar para cada grupo.

### 3.2.4 Desempenho zootécnico

O peso vivo foi determinado pela pesagem de todas as aves das unidades experimentais no primeiro dia. O consumo de ração foi calculado pela diferença entre a pesagem da ração fornecida e a sobra nos comedouros das unidades experimentais. A conversão alimentar foi calculada dividindo-se o consumo de ração acumulado pelo peso das aves.

### 3.2.5 Coleta de amostras

Aos 21 dias de idade, todas as aves foram abatidas seguindo as normas de bem-estar animal; após insensibilização por anestesia inalatória por isoflurano, foi realizado o deslocamento cervical e exsanguinação. As aves foram evisceradas para a remoção da porção ileal intestinal. Foram coletadas amostras de fezes diretamente do íleo e de ossos da tíbia para análises de concentração de P e Ca, além de amostras de fragmentos intestinais para histologia. A porção ileal foi definida como o segmento entre 4 cm após o divertículo de Meckel e 4 cm antes da junção ileocecal. O conteúdo ileal foi esvaziado manualmente por compressão e acondicionado em frascos plásticos devidamente identificados e mantidas em freezer a -5°C.

### 3.2.6 Análises de digestibilidade

O experimento seguiu o método de coleta total de excretas descrito por Matterson et al. (1965) e incluiu um período de cinco dias de coleta completa de excretas. Para isso, foram colocadas bandejas metálicas revestidas com plástico sob as gaiolas, onde as excretas foram coletadas uma vez ao dia pelo período

da manhã. Após a coleta, as amostras foram homogeneizadas e congeladas em freezer convencional até que as análises fossem realizadas.

Posteriormente, as excretas foram descongeladas à temperatura ambiente, homogeneizadas e submetidas a um processo de desidratação em um forno de ventilação forçada a 55°C por 72 horas. Após a completa desidratação, as amostras foram moídas em um moinho de martelos com uma peneira de 1 mm. Para a determinação dos componentes, como matéria seca (MS, método 930.15), proteína bruta (PB, método 990.03), matéria mineral (método 942.05) e gordura bruta (GB, método 920.39), foram utilizadas as metodologias estabelecidas pela AOAC International (2005). Também foi avaliado a energia bruta utilizando-se um calorímetro (IKA C-200).

Com base nos resultados da composição química e energética das dietas e excretas, juntamente com suas respectivas massas, foram calculados os nutrientes metabolizáveis e os coeficientes de metabolização, conforme descrito por Matterson et al. (1965).

### 3.2.7 Concentrações de Ca e P em ração, fezes e tíbias.

As amostras de excretas do íleo foram secas por liofilização a vácuo a uma temperatura de -40°C, por 72 horas. A seguir, as amostras de digesta e excreta foram moídas manualmente em um pilão. A determinação dos teores de fósforo (P) e cálcio (Ca), nas rações e excretas ileais, foi realizada pelo método Hach (1999) através de digestão sulfúrica em aparelho Dijesdhal. A concentração de fósforo foi obtida através do método colorimétrico (espectrofotometria).

Os ossos da tíbia das aves passaram por secagem em estufa de fluxo contínuo a 67°C por 3 dias para retirada dos resíduos de carne, cartilagem proximal e fíbula. Em seguida, foram trituradas e secas em forno mufla para desengorduramento. As cinzas foram determinadas conforme metodologia de Silva (1990). A solução mineral foi preparada utilizando-se os procedimentos da via úmida. Da solução mineral determinou-se o fósforo pelo método de espectrofotometria e o cálcio pelo método de titulometria, ambos seguindo a portaria N° 108, de 04 de setembro de 1991 (MAPA, 1991).

### 3.2.8 Análises histológicas

Para as análises histológicas de tíbias e intestino delgado, as amostras foram acondicionadas em formalina tamponada a 10% para fixação do material por 48 horas. As tíbias passaram por processo de descalcificação com ácido nítrico a 7% durante 12 horas. Os materiais foram processados rotineiramente para histologia, os blocos de parafina cortados em micrótomo a 5µm e as lâminas coradas com hematoxilina e eosina (HE).

### 3.2.9 Metabolismo energético: Enzimas CK citosólica, CK mitocondrial, AK e PK.

Para avaliar as enzimas pertencentes à rede de fosfotransferase, o intestino foi lavado em um tampão SET (0,32 M de sacarose, 1 mM de EGTA, 10 mM de Tris-HCl, pH 7,4) e homogeneizado no mesmo tampão SET (1:10 p/v) com um homogeneizador de vidro Potter-Elvehjem. O homogeneizado foi centrifugado a 800 x g por 10 minutos a 4°C. Parte desse sobrenadante foi utilizado para avaliar a atividade da AK; o pellet foi descartado, e o sobrenadante foi novamente centrifugado a 10.000 x g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante contendo o citosol foi coletado para a determinação da atividade da PK e da CK citosólica. O pellet, que continha as mitocôndrias, foi lavado duas vezes com o mesmo tampão SET e depois ressuspensão em um tampão de Trizma a 100 mM e MgSO<sub>4</sub> a 15 mM (pH 7,5) para avaliar a atividade da CK mitocondrial.

A atividade da CK intestinal foi conduzida com base no método colorimétrico estabelecido por Hughes (1962), que estima os níveis de creatina em um comprimento de onda de 540 nm, conforme detalhado por Baldissera et al. (2017), e os resultados foram expressos em nmol de creatina formada/min/mg de proteína. A atividade da AK intestinal foi medida com um ensaio enzimático acoplado com hexoquinase (HK) e glicose 6-fosfato desidrogenase, de acordo com Dzeja et al. (1999) e publicado em detalhes por Baldissera et al. (2019). A atividade foi expressa em µmol de piruvato formado/min/mg de proteína.

### 3.2.10 Status oxidativo

#### 3.2.10.1 TBARS

Como índice de peroxidação lipídica, a formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) durante uma reação de aquecimento ácido foi determinada como previamente descrito por Ohkawa et al. (1979). Uma solução de malondialdeído (MDA) foi usada como padrão de referência. Os níveis de TBARS foram determinados pela absorvância em 532 nm e expressos como equivalentes de MDA (nmol de MDA/mg de proteína).

#### 3.2.10.2 *Proteína carbonila*

A carbonilação das proteínas foi determinada pela modificação do método Levini (LEVINI et al., 1990). Primeiro, 250 µL da amostra de duodeno foi precipitada utilizando 100 µL de ácido tricloroacético (TCA) a 10% e então centrifugada a 5000 rpm por 5 minutos, descartando o sobrenadante. Em seguida, 150 µL de 2,4-Dinitrofenilhidrazina (DNPH) (teste)/HCl (branco) foi adicionado a esse precipitado de amostra e incubado em temperatura ambiente por 30 minutos. Durante a incubação, as amostras foram misturadas vigorosamente a cada 10 minutos. Após a incubação, 100 µL de TCA a 10% foi adicionado à amostra, e a amostra foi centrifugada a 5000 rpm por 5 minutos. Após descartar o sobrenadante, o precipitado foi lavado duas vezes com 250 µL de etanol/acetato de etila (1:1), por centrifugação a 10.000 rpm por 5 minutos, e o sobrenadante foi descartado para remover qualquer DNPH livre. O precipitado foi dissolvido em 800 µL de solução de desnaturação (2 g de dodecil sulfato de sódio (SDS) e 50 mg de EDTA em 100 mL de tampão de fosfato de potássio a 80 mM, pH 8,0) e incubado a 37°C por 10 minutos. A intensidade da cor do sobrenadante foi medida utilizando um espectrofotômetro a 370 nm. O teor de proteína carbonilada foi expresso em nM de proteína carbonilada/mg de proteína.

#### 3.2.10.3 *Capacidade de redução do ferro (FRAP)*

A atividade antioxidante, medida pela capacidade de redução do ferro (FRAP), foi avaliada seguindo o método de Benzie e Strain (1996), com ligeiras modificações. O reagente FRAP foi preparado combinando tampão acetato 300

mM (pH 3,6), solução 10 mM de 2,3,5-Trifeniltetrazólio em ácido clorídrico 40 mM e solução aquosa de cloreto férrico hexa-hidratado 20 mM. O reagente de trabalho foi preparado fresco e aquecido a 37°C por 10 minutos em banho-maria antes do uso. As amostras intestinais foram diluídas em etanol para obter uma concentração de 1000 µg/mL. O teste foi realizado em triplicata, misturando 200 µL da amostra com 1800 µL do reagente FRAP. As amostras foram incubadas em banho-maria a 37°C por quatro minutos, e a absorbância foi medida em 593 nm usando um espectrofotômetro (Spectroquant Pharo 100, Merck). Os cálculos foram feitos com base em uma curva-padrão de sulfato ferroso nas concentrações de 1000 mmol/L a 62,5 mmol/L. A quercetina (1000 µg/mL) foi usada como controle positivo.

#### 3.2.10.4 Níveis de NOx

Os níveis de NOx foram determinados usando os métodos de Tatsch et al. 2011, e os resultados são expressos em µmol/L. As análises de NOx foram realizadas em um analisador automatizado (BS 380, Mindray®, Shenzhen, China). O conteúdo de NOx no intestino foi estimulado em um meio contendo 100 µL de 2% de VCl3 (em 5% de HCl), 50 µL de 0,1% de N-(1-naftil) etilenodiamina di-hidrocloreto e 50 µL de 2% de sulfanilamida (em 5% de HCl). Após incubação a 37 °C por 60 minutos, os níveis de nitritos e nitratos, que correspondem a uma estimativa de NOx, foram determinados por espectrofotometria a 570 nm. Os níveis de nitritos mais nitratos foram expressos em mM NOx/mg de proteína.

#### 3.2.11 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram conduzidas através do software SAS® versão 9.1 (2013) (SAS Inst., Inc., Carry, NC, USA); inicialmente os dados foram analisados para a normalidade utilizando-se o teste de Shapiro-Wilk assim como a homocedasticidade da amostra pelo teste de Bartlett. Posteriormente, foi realizada a análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas através do teste de Tukey a 5% considerado como diferença significativa ( $P < 0,05$ ) ou 10% como tendência ( $P < 0,10$ ).

### 3.3 RESULTADOS

#### 3.3.1 Desempenho zootécnico

Os resultados referentes ao ganho de peso e conversão alimentar das aves de um a 21 dias de vida de acordo com os tratamentos e a adição ou não de enzima fitase estão apresentados na Tabela 2. O peso médio aos 14 e 21 dias de vida das aves, a conversão alimentar e o ganho de peso durante o período de experimento não apresentaram diferença estatística ( $P>0,05$ ) entre os tratamentos adicionados ou não de fitase.

*Tabela 2: Índices de desempenho zootécnico de frangos de corte aos 21 dias alimentados com dieta contendo diferentes níveis de cálcio e fósforo, com ou sem adição da enzima fitase.*

Variável	Adição da Enzima		Nível de Ca e P			SEM	P valor*	
	Sunphase	CP	CN1	CN2	CN3		Trat	Trat x Enzima
Peso médio aos 14 dias (g)	Sem	450	471	471	460	771,88	0,7452	0,4543
	Com	475	460	478	475			
Peso médio aos 21 dias (g)	Sem	858	834	875	841	1.219	0,7757	0,0781
	Com	853	873	833	844			
Conversão alimentar aos 21 dias	Sem	1,05	1,05	1,05	1,05	0,0001	0,5464	0,6629
	Com	1,04	1,05	1,04	1,05			
Ganho do período 21 dias (g)	Sem	815	797	832	799	1.290	0,6983	0,1753
	Com	816	831	799	802			

\* Valor de  $P < 0.05$  indicam um valor de confiança de 95% e valores de  $P < 0.10$  indicam tendência com confiança de 90%.

\* Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa ( $P < 0,05$  ou  $P < 0,10$ ) entre os Tratamentos (Níveis).

\* Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ( $P < 0,05$  ou  $P < 0,10$ ) entre os Tratamentos x Enzima.

### 3.3.2 Digestibilidade

A Tabela 3 apresenta os coeficientes de digestibilidade aparente de frangos de corte aos 21 dias alimentados com dieta contendo diferentes níveis de cálcio e fósforo, com ou sem adição da enzima fitase; os coeficientes de digestibilidade da matéria orgânica, matéria mineral, cálcio total e fósforo total apresentaram diferença significativa quando avaliado a interação entre os níveis de Ca e P da dieta e a adição da enzima fitase ( $P < 0,05$ ). Entretanto, os coeficientes de digestibilidade da matéria seca, energia bruta e proteína bruta apresentaram tendência a diferir ( $P < 0,10$ ) quando avaliado a interação. Quando avaliado apenas o efeito do tratamento, ou seja, dos níveis de Ca e P, a diferença foi verificada ( $P < 0,05$ ) apenas para o coeficiente de digestibilidade da matéria orgânica, apresentando tendência a diferir ( $P < 0,10$ ) nos coeficientes de digestibilidade da Energia Bruta e do P total.

Diferenças significativas foram observadas nas análises de digestibilidade. O tratamento CP sem fitase apresentou menor coeficiente de digestibilidade aparente da matéria seca em comparação com o tratamento CN3 com fitase. A adição de enzima no tratamento CN2 resultou em maior digestibilidade da matéria orgânica em comparação com os tratamentos CP e CN3, tanto com quanto sem enzima. O tratamento CN2 com enzima também diferiu do tratamento CN3 com enzima no coeficiente de digestibilidade aparente da energia bruta. Na digestibilidade aparente da proteína bruta, o tratamento CP sem enzima foi inferior ao CN2 com enzima. Quanto à matéria mineral, cálcio total e fósforo total, diferenças estatísticas foram observadas entre os tratamentos CP com enzima e seu controle sem enzima.

*Tabela 3: Coeficientes de digestibilidade aparente de frangos de corte aos 21 dias alimentados com dieta contendo diferentes níveis de cálcio e fósforo, com ou sem adição da enzima fitase.*

Variável	Adição da Enzima		Nível de Ca e P			SEM	P valor*	
	Sunphase	CP	CN1	CN2	CN3		Trat	Trat x Enzima
Coeficiente de Digestibilidade aparente da MS (%)	Sem	74,52 <sup>b</sup>	76,32 <sup>ab</sup>	75,05 <sup>ab</sup>	75,23 <sup>ab</sup>	2,10	0,145	0,0832
	Com	75,80 <sup>ab</sup>	75,85 <sup>ab</sup>	77,33 <sup>a</sup>	75,03 <sup>ab</sup>			
Coeficiente de Digestibilidade Aparente da Matéria Orgânica (%)	Sem	78,19 <sup>Bb</sup>	79,92 <sup>ABab</sup>	78,68 <sup>Ab</sup>	78,82 <sup>Bb</sup>	1,50	0,0417	0,0138
	Com	79,22 <sup>Bb</sup>	79,39 <sup>ABab</sup>	81,37 <sup>Aa</sup>	78,63 <sup>Bb</sup>			
Coeficiente de Digestibilidade Aparente da Energia Bruta (%)	Sem	74,90 <sup>ABb</sup>	76,94 <sup>ABab</sup>	75,59 <sup>Aab</sup>	75,42 <sup>Bab</sup>	2,11	0,054	0,0527
	Com	75,98 <sup>ABab</sup>	75,93 <sup>ABab</sup>	77,70 <sup>Aa</sup>	75,09 <sup>Bb</sup>			
Coeficiente de Digestibilidade Aparente PB (%)	Sem	74,06 <sup>b</sup>	75,90 <sup>ab</sup>	74,60 <sup>ab</sup>	74,77 <sup>ab</sup>	2,18	0,145	0,0835
	Com	75,36 <sup>ab</sup>	75,41 <sup>ab</sup>	76,92 <sup>a</sup>	74,58 <sup>ab</sup>			
Coeficiente de Digestibilidade Aparente da Matéria Mineral (%)	Sem	63,29 <sup>a</sup>	55,49 <sup>ab</sup>	47,46 <sup>ab</sup>	55,18 <sup>ab</sup>	86,18	0,944	0,0044
	Com	46,25 <sup>b</sup>	54,15 <sup>ab</sup>	59,89 <sup>ab</sup>	50,51 <sup>ab</sup>			
Coeficiente de Digestibilidade Aparente do Ca total	Sem	76,26 <sup>a</sup>	67,60 <sup>ab</sup>	64,66 <sup>ab</sup>	73,35 <sup>ab</sup>	42,51	0,442	0,0023
	Com	62,11 <sup>b</sup>	69,77 <sup>ab</sup>	71,52 <sup>ab</sup>	70,92 <sup>ab</sup>			
Digestibilidade Aparente do P total	Sem	71,19 <sup>Aa</sup>	66,69 <sup>ABab</sup>	58,14 <sup>Bb</sup>	61,38 <sup>ABb</sup>	34,45	0,071	0,019
	Com	66,92 <sup>Aab</sup>	70,59 <sup>ABa</sup>	69,45 <sup>Ba</sup>	67,96 <sup>ABab</sup>			

\* Valor de  $P < 0.05$  indicam um valor de confiança de 95% e valores de  $P < 0.10$  indicam tendência com confiança de 90%.

\* Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa ( $P < 0,05$  ou  $P < 0,10$ ) entre os Tratamentos (Níveis).

\* Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ( $P < 0,05$  ou  $P < 0,10$ ) entre os Tratamentos x Enzima.

### 3.3.3 Metabolismo energético

Na Tabela 4 encontram-se os resultados da atividade enzimática da rede fosfotransferase avaliada a nível intestinal; houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) para as variáveis CKcit e CKmit, enquanto a variável Proteína tendeu a diferir ( $P < 0,10$ ) na interação entre os tratamentos e a adição da enzima. Os tratamentos diferiram para as variáveis CKcit e AK ( $P < 0,05$ ).

Nas análises de enzimas do metabolismo energético, a CKCit apresentou diferença estatística entre os tratamentos CN1 e CN2 sem adição de enzima, sendo o CN1 o que apresentou maiores níveis enzimáticos nesse parâmetro. Nos tratamentos com adição de enzima, o CP diferenciou do CN2 e CN3, apresentando maiores concentrações. Já na CKMit, o CN3 sem adição de enzima diferiu estatisticamente dos demais tratamentos sem fitase, apresentando maior concentração.

Quanto as concentrações de AK, os tratamentos sem adição de enzima CP e CN3 diferiram estatisticamente, sendo o CN3 com maiores níveis. Isso também foi observado em ambos os tratamentos com enzima. Nas análises de PK não houve diferença entre os tratamentos. Na análise da proteína carbonila, apenas o CN2 com enzima apresentou diferença estatisticamente significativa em comparação com o tratamento CN3 com enzima, sendo este último superior.

*Tabela 4. Atividade das enzimas da rede fosfotransferase avaliadas a nível intestinal de frangos de corte aos 21 dias alimentados com dieta contendo diferentes níveis de cálcio e fósforo, com ou sem adição da enzima fitase.*

Variável	Adição da Enzima		Nível de Ca e P			SEM	P valor*	
	Sunphase	CP	CN1	CN2	CN3		Trat	Trat x Enzima
CKCit	Sem	8,42 <sup>Ab</sup>	14,19 <sup>Aa</sup>	9,41 <sup>Bb</sup>	7,03 <sup>Cb</sup>	4,64	<.0001	0,0009
	Com	14,54 <sup>Aa</sup>	12,75 <sup>Aa</sup>	9,62 <sup>Bb</sup>	8,63 <sup>Cb</sup>			
CKMit	Sem	7,15 <sup>b</sup>	9,40 <sup>b</sup>	9,92 <sup>b</sup>	11,31 <sup>a</sup>	4,68	0,7455	0,0009
	Com	14,54 <sup>a</sup>	11,39 <sup>a</sup>	11,07 <sup>ab</sup>	11,31 <sup>a</sup>			
AK	Sem	2,66 <sup>B</sup>	2,90 <sup>AB</sup>	2,78 <sup>AB</sup>	2,88 <sup>A</sup>	0,12	0,0173	0,3892
	Com	2,58 <sup>B</sup>	3,09 <sup>AB</sup>	2,62 <sup>AB</sup>	3,14 <sup>A</sup>			
PK	Sem	1,74	1,91	2,21	2,44	0,24	0,4024	0,1494
	Com	2,12	2,39	2,11	2,08			
Proteína	Sem	5,78 <sup>ab</sup>	5,67 <sup>ab</sup>	5,73 <sup>ab</sup>	5,44 <sup>ab</sup>	0,49	0,2561	0,0638
	Com	6,33 <sup>ab</sup>	5,65 <sup>ab</sup>	5,41 <sup>b</sup>	6,65 <sup>a</sup>			

\* Valor de P<0.05 indicam um valor de confiança de 95% e valores de P<0.10 indicam tendência com confiança de 90%.

\* Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa (P<0,05 ou P<0,10) entre os Tratamentos (Níveis).

\* Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa (P<0,05 ou P<0,10) entre os Tratamentos x Enzima.

### 3.3.4 Parâmetros de estresse oxidativo

A Tabela 5 apresenta os níveis avaliados no intestino das enzimas associadas ao estresse oxidativo. Os níveis de TBARS, proteína carbonila e Nox foram discretamente maiores em animais que não tiveram adição da enzima em suas dietas quando comparados aos animais dos grupos com a mesma dieta, mas sem adição da enzima. Estatisticamente, nas análises dos níveis de TBARS, proteína carbonila e Nox, quando comparados todos os tratamentos entre si, os grupos CP, CN3, CN2+SUNPHASE e CN3+SUNPHASE apresentaram concentrações semelhantes. A maior concentração foi observada no tratamento CN1, diferindo estatisticamente de todos os outros tratamentos, bem como do seu controle. O mesmo ocorreu com o grupo CP+SUNPHASE, que apresentou menor concentração de TBARS, proteína carbonila e NOx em relação a todos os tratamentos.

Na FRAP, níveis mais altos foram observados em animais que tiveram a adição da enzima, porém os grupos CN1 e CN1+SUNPHASE, CN2 e CN2+SUNPHASEb não diferiram estatisticamente. O grupo CP+SUNPHASE diferiu estatisticamente de todos os outros tratamentos e do seu controle, bem como o grupo CN3+SUNPHASE, ambos com níveis elevados das concentrações de FRAP.

*Tabela 5: Enzimas associados ao status oxidativo a nível intestinal de frangos de corte aos 21 dias alimentados com dieta contendo diferentes níveis de cálcio e fósforo, com ou sem adição da enzima fitase.*

Variável	Tratamento								CV (%)	P valor*
	CP	CN1	CN2	CN3	CP+ Sunphase	CN1+ Sunphase	CN2+ Sunphase	CN3+ Sunphase		
TBARS	3,52±0.21 <sup>c</sup>	5.95±0.34 <sup>a</sup>	5.06±0.28 <sup>b</sup>	4.28±0.17 <sup>bc</sup>	2.35±0.26 <sup>d</sup>	4.96±0.29 <sup>b</sup>	4.28±0.22 <sup>bc</sup>	3.98±0.20 <sup>bc</sup>	9.4	0.0001
Proteína carbonila	8.25±1.36 <sup>c</sup>	14.7±1.04 <sup>a</sup>	12.8±1.08 <sup>b</sup>	10.7±0.87 <sup>bc</sup>	6.74±0.66 <sup>d</sup>	13.7±0.75 <sup>b</sup>	10.6±0.88 <sup>bc</sup>	9.74±0.90 <sup>bc</sup>	10	0.0001
FRAP	5.62±0.41 <sup>c</sup>	4.95±0.39 <sup>c</sup>	5.16±0.51 <sup>c</sup>	4.98±0.62 <sup>c</sup>	9.12±0.76 <sup>a</sup>	5.36±0.58 <sup>c</sup>	5.89±0.42 <sup>c</sup>	7.78±0.29 <sup>b</sup>	7.20	0.0001
NOx	15.9±2.74 <sup>c</sup>	21.4±2.03 <sup>a</sup>	20.6±2.18 <sup>b</sup>	18.2±1.97 <sup>bc</sup>	14.5±1.86 <sup>d</sup>	20.6±1.37 <sup>b</sup>	18.2±1.02 <sup>bc</sup>	16.3±1.45 <sup>bc</sup>	11	0.0001

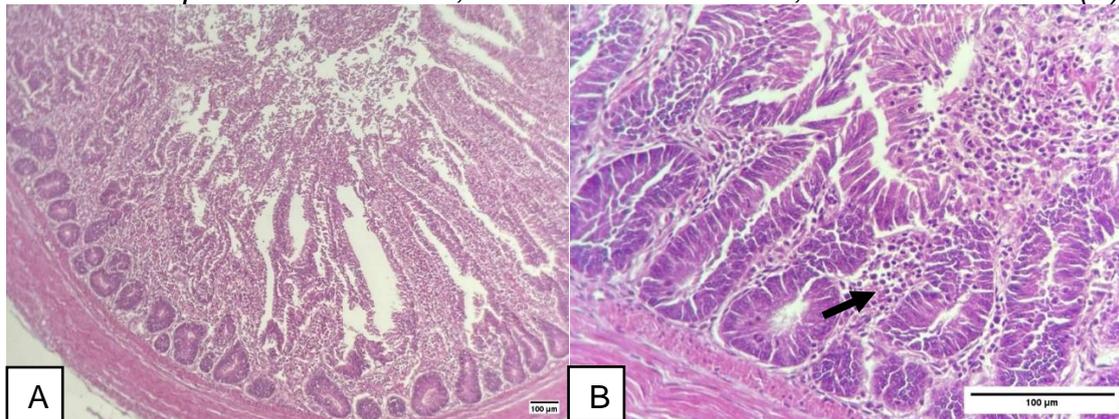
\* Valor de P<0.05 indicam um valor de confiança de 95% e valores de P<0.10 indicam tendência com confiança de 90%.

\* Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (P<0,05 ou P<0,10).

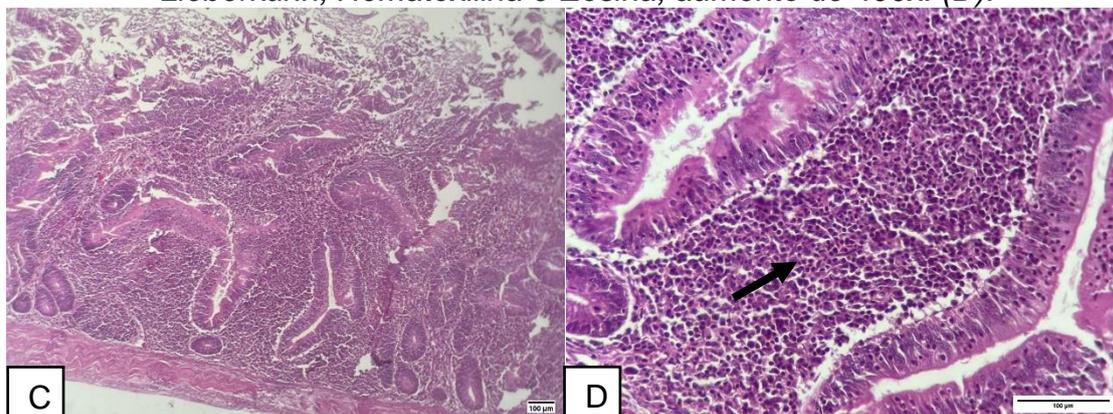
### 3.3.5 Histologia intestinal

Todos os tratamentos apresentaram enterite difusa em diferentes graus de intensidade (discreta a acentuada). Os tratamentos CN1, CN2 e CN1+SUNPHASE apresentaram infiltrado inflamatório mononuclear composto de linfócitos e plasmócitos em grau de intensidade acentuado, enquanto CP, CN3, CN1+SUNPHASE e CN2+SUNPHASE predominaram infiltrados inflamatórios moderados. O tratamento CN3+SUNPHASE apresentou inflamação discreta, sendo possível visualizar as vilosidades intestinais desde a sua base até seu ápice.

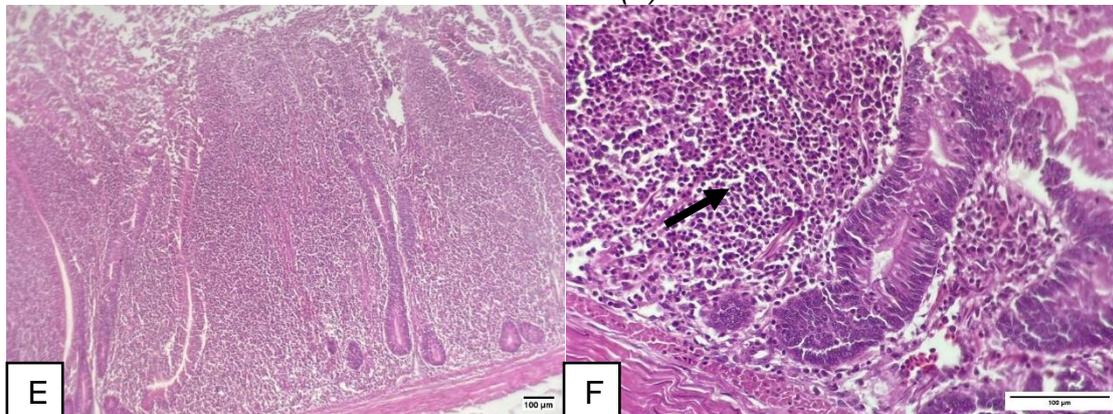
*Figura 1: Tratamento CP (A, B). Intestino apresenta perda da arquitetura tecidual típica, com vilosidades sem delimitação evidente, Hematoxilina e Eosina, aumento de 400x. (A). Maior aumento de A, seta indica moderado infiltrado inflamatório composto por mononucleares (linfócitos e plasmócitos) entre as criptas de Lieberkühn, Hematoxilina e Eosina, aumento de 400x. (B).*



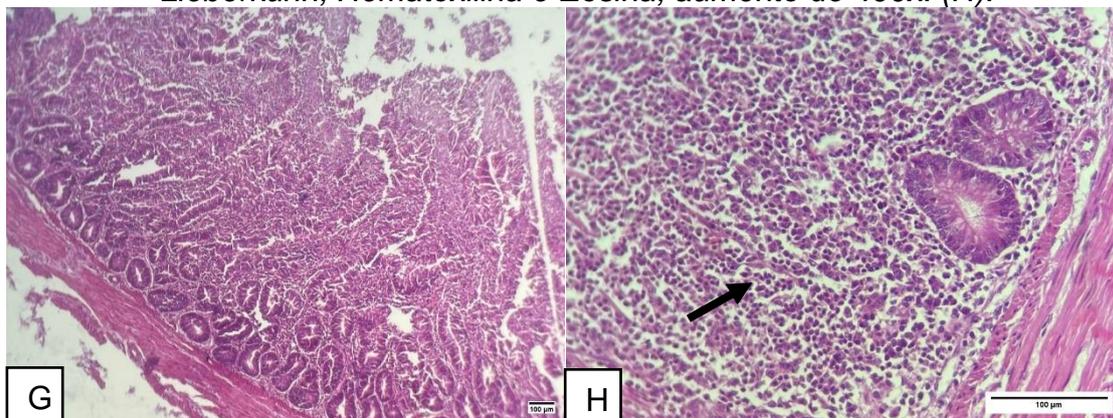
*Figura 2: Tratamento CN1 (C, D). Intestino apresenta perda da arquitetura tecidual típica, com vilosidades sem delimitação evidente, Hematoxilina e Eosina, aumento de 400x. (C). Maior aumento de A, seta indica acentuado infiltrado inflamatório mononuclear (linfócitos e plasmócitos) entre as criptas de Lieberkühn, Hematoxilina e Eosina, aumento de 400x. (D).*



*Figura 3: Tratamento CN2 (E, F). Intestino apresenta perda da arquitetura tecidual típica, com vilosidades sem delimitação evidente, Hematoxilina e Eosina, aumento de 400x. (E). Maior aumento de A, seta indica acentuado infiltrado inflamatório composto por células mononucleares (linfócitos e plasmócitos) entre as criptas de Lieberkühn, Hematoxilina e Eosina, aumento de 400x. (F).*



*Figura 4: Tratamento CN3 (G, H). Intestino apresenta perda da arquitetura tecidual típica, com vilosidades sem delimitação evidente, Hematoxilina e Eosina, aumento de 400x. (G). Maior aumento de A, seta indica moderado infiltrado inflamatório mononuclear (linfócitos e plasmócitos) entre as criptas de Lieberkühn, Hematoxilina e Eosina, aumento de 400x. (H).*



*Figura 5: Tratamento CP+SUNPHASE (I, J). Intestino apresenta perda da arquitetura tecidual típica, com vilosidades sem delimitação evidente, Hematoxilina e Eosina, aumento de 400x. (I). Maior aumento de A, seta indica acentuado infiltrado inflamatório mononuclear (linfócitos e plasmócitos) entre as*

criptas de Lieberkühn, Hematoxilina e Eosina, aumento de 400x. (J).

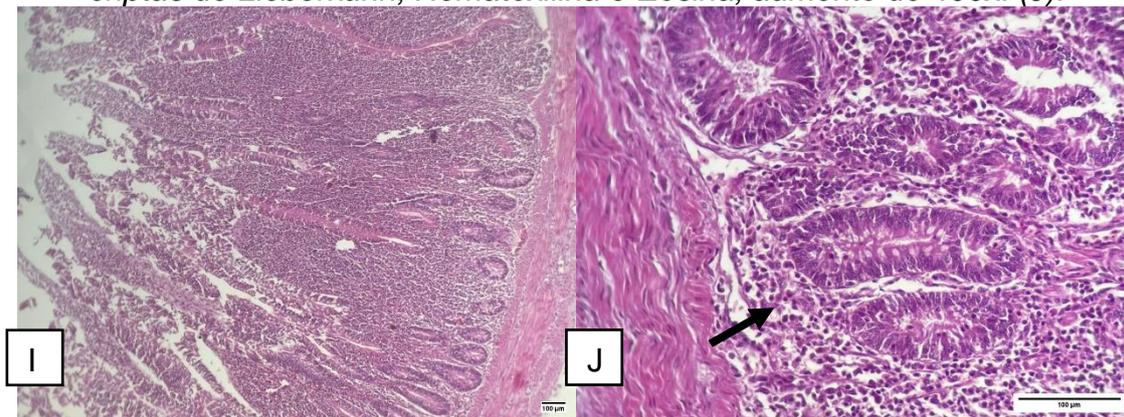


Figura 6: Tratamento CN1+SUNPHASE (K, L). Intestino apresenta perda da arquitetura tecidual típica, com vilosidades sem delimitação evidente, Hematoxilina e Eosina, aumento de 400x. (K). Maior aumento de A, seta indica moderado infiltrado inflamatório mononuclear (linfócitos e plasmócitos) entre as criptas de Lieberkühn, Hematoxilina e Eosina, aumento de 400x. (L).

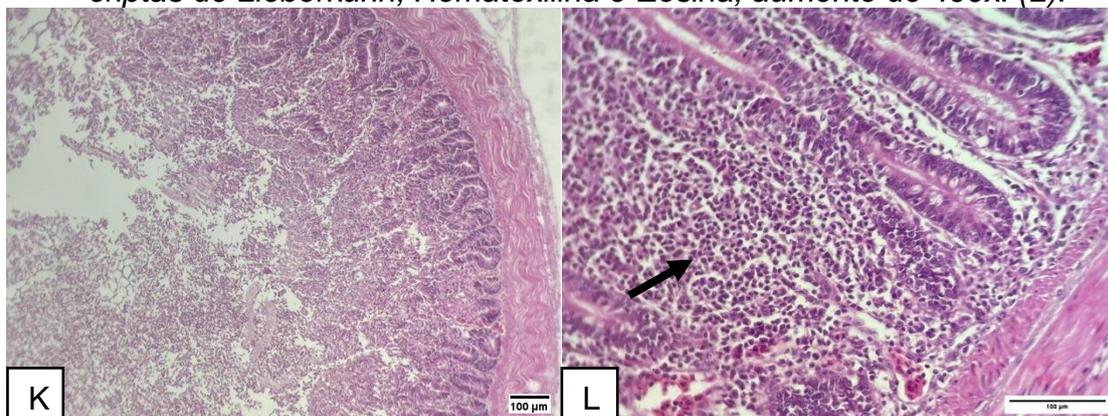


Figura 7: Tratamento CN2+SUNPHASE (M, N). Intestino apresenta perda da arquitetura tecidual típica, com vilosidades sem delimitação evidente, Hematoxilina e Eosina, aumento de 400x. (M). Maior aumento de A, seta indica moderado infiltrado inflamatório composto de células mononucleares (linfócitos e plasmócitos) entre as criptas de Lieberkühn, Hematoxilina e Eosina, aumento de 400x. (N).

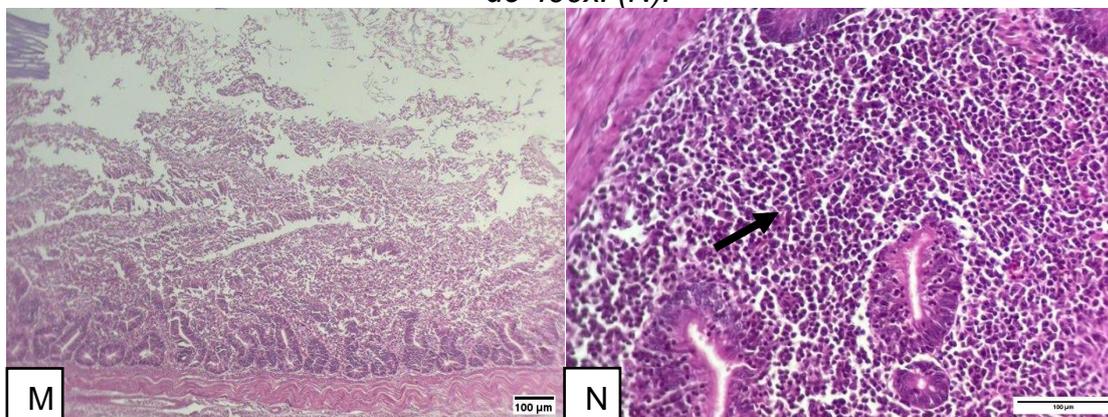
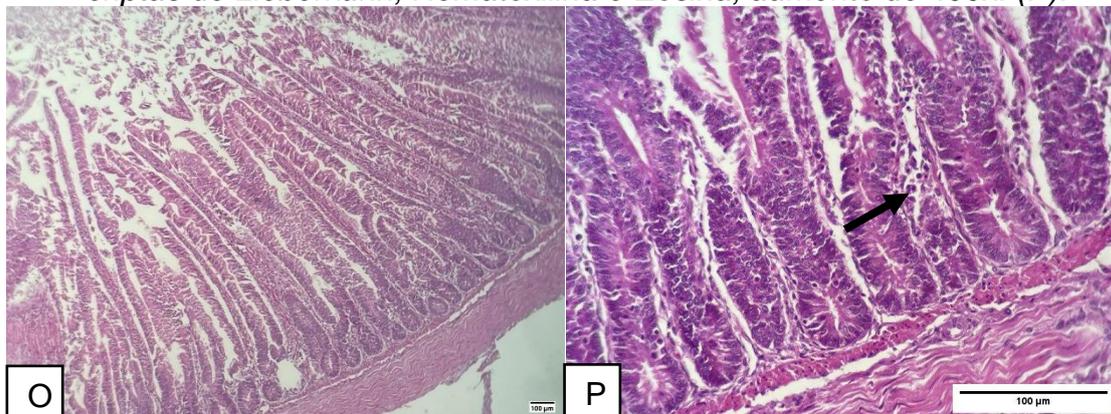


Figura 8: Tratamento CN3+SUNPHASE (O, P). Intestino apresenta perda da arquitetura tecidual típica, com vilosidades sem delimitação evidente,

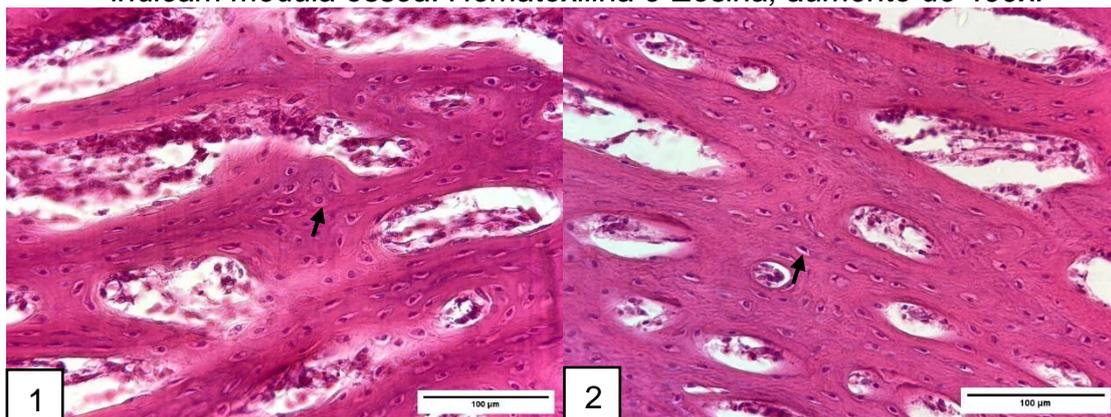
Hematoxilina e Eosina, aumento de 400x. (O). Maior aumento de A, seta indica discreto infiltrado inflamatório mononuclear (linfócitos e plasmócitos) entre as criptas de Lieberkühn, Hematoxilina e Eosina, aumento de 400x. (P).

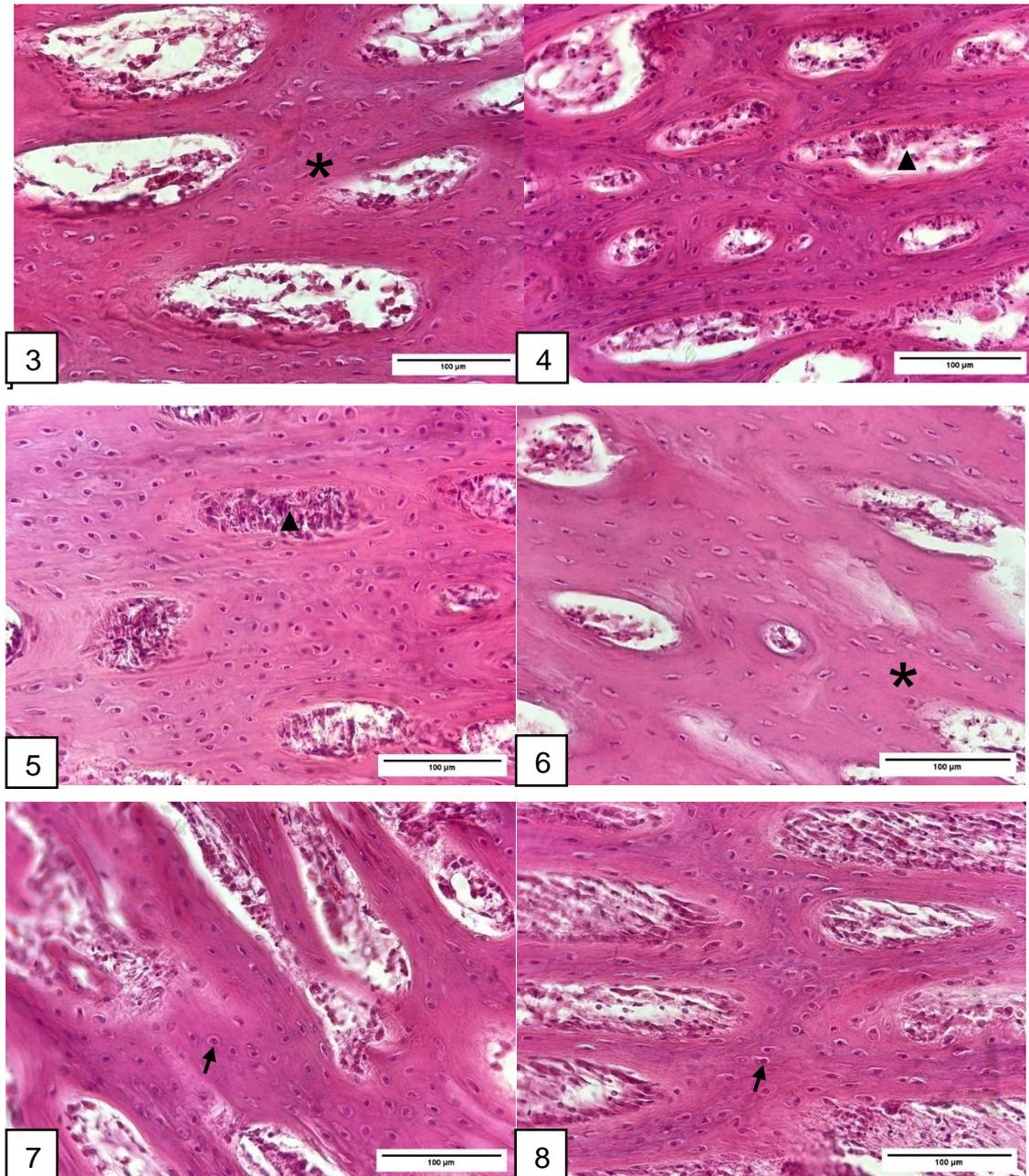


### 3.3.6 Histologia óssea

Nas análises histológicas do osso tíbia, amostras apresentaram arquitetura tecidual e celularidade típica. Não foram observadas alterações dignas de nota entre os tratamentos analisados.

*Figura 9: Histologia de ossos da tíbia, tratamentos identificados nas imagens (1:CP; 2: CN1; 3:CN2; 4:CN3; 5:CP+SUNPHASE; 6:CN1+SUNPHASE; 7:CN2+SUNPHASE; 8:CN3+SUNPHASE). Setas indicam osteócitos típicos e asterisco indica trabécula óssea contendo matriz mineralizada. Pontas de seta indicam medula óssea. Hematoxilina e Eosina, aumento de 400x.*





### 3.3.7 Concentrações de Ca e P em ossos, ração e fezes.

Os valores percentuais das concentrações dos minerais avaliadas em amostras dos ossos, ração e fezes dos tratamentos encontram descritos na Tabela 6. As rações, como esperado, comparando-as com o controle sem fitase, apresentaram menor concentração de Ca e P. Em osso, níveis de matéria mineral, Ca e P diminuíram em tratamentos com fitase, exceto pelo tratamento CN3+SUNPHASE onde houve um aumento de todas as variáveis. Em fezes, as

concentrações de Ca e P diminuíram em tratamentos com a adição de fitase, exceto pelo tratamento CP que apresentou maior excreção de Ca que tratamento CP+SUNPHASE.

*Tabela 6: Concentrações de matéria mineral, cálcio e fósforo em ração, tíbias e fezes de frangos de corte aos 21 dias alimentados com dieta contendo diferentes níveis de cálcio e fósforo, com ou sem adição da enzima fitase.*

Amostra	Variável	Tratamento							
		CP	CN1	CN2	CN3	CP+ Sunphase	CN1+ Sunphase	CN2+ Sunphase	CN3+ Sunphase
Ossos	Matéria Mineral (%)	42,55	11,78	42,26	41,92	41,64	40,73	40,95	45,18
	Cálcio Total (%)	13,44	12,7	12,71	12,84	12,64	12,27	11,91	14,23
	Fósforo Total (%)	7,24	6,57	6,42	6,66	6,5	6,73	6,09	7,57
Ração	Matéria Mineral (%)	8,7	7,95	7,08	7,88	8,03	7,07	7,09	7,56
	Cálcio Total (%)	1,6	1,34	1,03	1,22	1,41	1,11	1,01	1,14
	Fósforo Total (%)	0,97	0,72	0,59	0,63	1,06	0,65	0,59	0,6
Fezes	Matéria Mineral (%)	14,63	17,11	17,17	16,84	15,51	15,26	14,83	16,93
	Cálcio Total (%)	1,74	2,1	1,68	1,55	1,92	1,58	1,5	1,5
	Fósforo Total (%)	1,28	1,16	1,14	1,16	1,26	0,9	0,94	0,87

### 3.4 DISCUSSÃO

Nos índices de desempenho zootécnico, não houve diferença estatística para o ganho de peso e conversão alimentar entre os grupos suplementados ou não com fitase em diferentes níveis de cálcio e fósforo. Estes resultados estão de acordo com Slominsk (2011), que encontrou pouco efeito da suplementação de fitase no desempenho e na utilização de energia e aminoácidos em frangos. De Sousa et al. (2015), ao conduzir um estudo para determinar o efeito da fitase na dieta sobre o desempenho, constataram que a dieta suplementada com fitase proporcionou maior ganho de peso e melhor conversão alimentar em frangos com 21 dias de vida. Por outro lado, Alvarenga et al. (2011) obtiveram um menor ganho de peso em frangos quando as dietas continham fitase. De acordo com Walk et al. (2013) as melhorias na eficiência alimentar das aves suplementadas com fitase estão associadas a degradação do fitato e a eliminação de seus efeitos antinutricionais, promovendo uma digestão mais eficiente. Ambos os autores discutem que essas diferenças encontradas nos diferentes estudos podem estar relacionadas à diferente fonte de fitase atualmente disponível no mercado (ELKHALIL et al., 2007). Outra hipótese descreve que nessa fase inicial, principalmente até os 18 dias de vida, há uma demanda maior do organismo para o crescimento e desenvolvimento tecidual. Nesse período, espera-se que o desempenho seja menor, devido a mobilização da energia ingerida para a formação dos tecidos (DE SOUSA, et al., 2015).

Em relação aos coeficientes de digestibilidade aparente, o tratamento que se destacou com melhores níveis de digestibilidade, diferindo estatisticamente dos outros tratamentos com e sem enzima quando analisado a matéria orgânica, a energia bruta e a proteína bruta foi o grupo CN2 + SUNPHASE. Isso demonstra que esse tratamento, com a proporção Ca:P de 1,2:1 apresentou melhor relação com a adição de enzima fitase na dosagem de 500 FTU/kg quando considerado a digestibilidade de nutrientes. A ausência de maiores diferenças entre os tratamentos pode ser explicada devido as dietas serem isonutritivas, ou seja, com os mesmos ingredientes, exceto pela variação nos níveis de Ca e P.

Neste estudo, observamos, pela primeira vez, que a utilização da fitase manteve os níveis de CK citosólica no grupo controle (CP) com adição de fitase quando comparados aos grupos CN2 e CN3 com e sem enzima. As enzimas da rede CK citosólica ajudam a fornecer energia adicional para as células, auxiliando na manutenção das funções celulares normais e na recuperação após o estresse metabólico. Nos grupos onde a proporção de Ca:P era baixa (CN2 com 1,2:1 e CN3 com 1:1) o estresse metabólico celular foi maior, portanto, mais enzimas do grupo CK citosólicas foram consumidas. Desta forma, a diminuição da CK citosólica pode estar relacionado ao ajuste do metabolismo energético das células para atender à demanda de energia, na tentativa de manter a homeostase tecidual, produzindo fosfocreatina e evitando queda na concentração de ATP, conforme observado pelos pesquisadores Perin e colaboradores (2019). De acordo com Baldissera, et al., 2019, a diminuição da atividade da CK citosólica intestinal pode prejudicar a comunicação entre locais de produção de energia e utilização de energia, causando um grave comprometimento no fornecimento de energia em um tecido com alta demanda energética, como os intestinos.

Os níveis de adenilato quinase (AK) foram maiores nos tratamentos CN3 do que nos tratamentos controle (CP). A AK converte ADP em ATP, desempenhando um papel na transferência de energia nas células. Um aumento nos níveis de AK pode indicar uma demanda energética aumentada, como durante processos metabólicos intensos ou em situações de estresse celular. Esses resultados são compreensíveis devido a expressiva queda dos níveis ideais de Ca:P nos tratamentos CN3.

Desta forma, corroborando com os dados de literatura, alterações nos níveis das enzimas da rede de fosfotransferência, como a diminuição da CK e o aumento da AK observada nesse trabalho, são uma tentativa de manter a bioenergética celular durante a um processo de desequilíbrio nutricional ou alterações patológicas. Ambas as situações foram observadas nesse experimento, tanto o desequilíbrio nutricional ocasionado pela redução gradativa dos níveis de cálcio e fósforo e o aumento da proporção Ca:P, quanto as alterações inflamatórias no intestino das aves. A inflamação pode ser explicada devido certos tipos de fibras alimentares, inibidores de tripsina, fitato, lectinas,

proteínas não digeridas e até mesmo micotoxinas terem a capacidade de desencadear um processo inflamatório intestinal, principalmente em fase inicial (ABDELLI; SOLÀ-ORIOLO; PÉREZ, 2021).

A produção excessiva de radicais livres e os danos aos lipídios da membrana celular também podem explicar o comprometimento da rede de fosfotransferência intestinal, como observado no presente estudo. Os níveis de TBARS, compostos que mensuram a peroxidação lipídica, diferiram entre os grupos CP e CP+SUNPHASE e CN1 e CN1+SUNPHASE, sugerindo que em dietas com proporção normal ou pouco reduzida de Ca:P com a adição da fitase proporcionam menor dano aos lipídeos das membranas celulares. O mesmo foi observado nos níveis de proteína carbonila, compostos que indicam dano oxidativo às proteínas celulares.

Em relação ao potencial redutor do ferro (FRAP), o grupo CP diferiu estatisticamente do grupo CP+SUNPHASE e o grupo CN3 diferiu do CN3+SUNPHASE, sendo que os grupos com a adição da enzima apresentaram níveis elevados na análise. O FRAP diz respeito a uma medida da capacidade antioxidante do tecido, quanto menor FRAP, menor capacidade de ligação da ferritina ao ferro. Consequentemente, maior será a quantidade de ferro livre capaz de catalisar a geração de radicais OH<sup>•</sup>. Com valores elevados de FRAP nos grupos com adição da enzima, sugere-se que as defesas antioxidantes não foram consumidas, corroborando com os níveis de TBARS, que indicava menor dano oxidativo nas dietas com a adição de fitase.

Na análise da concentração de nitrito e nitrato (Nox) houve uma diminuição dos níveis ao comparar os grupos CP e CP+SUNPHASE, CN1 e CN1+SUNPHASE. Níveis reduzidos de óxido nítrico diminuição nos tecidos, neste caso no tecido intestinal das aves, indicam menor injúria celular. Esse dado contribui com os outros resultados do status oxidativo, sugerindo que níveis de cálcio e fósforo recomendados ou ligeiramente reduzidos (proporção 2:1) associados a adição de enzima fitase reduz o estresse oxidativo das células.

Os valores de cálcio e fósforo em osso e nas excretas estão de acordo com estudos realizados por Walk, et al. (2014); Chung, et al. (2013) e Dallman et al. (2019). Esses valores sugerem que a fitase promoveu uma melhor utilização de cálcio e fósforo, diminuindo a excreção desses minerais. Desta

forma, reforça-se que a adição de fitase em dietas de frangos de corte com baixas concentrações de cálcio e fósforo é uma alternativa viável quando considerado a diminuição dos custos da produção e a menor excreção destes minerais no ambiente. Neste estudo, observamos, pela primeira vez, que a utilização da fitase diminuiu a formação de EROs, reduzindo TBARS e potencializando as defesas oxidantes do tecido intestinal, contribuindo para menor estresse oxidativo celular.

### 3.5 CONCLUSÃO

Podemos concluir que a adição da enzima fitase associado a dietas com concentrações recomendadas ou ligeiramente diminuídas de cálcio e fósforo podem reduzir o estresse oxidativo e injúrias celulares no tecido intestinal de frangos de corte, não afetando os parâmetros de digestibilidade e mantendo o desempenho dos animais.

#### 4 REFERÊNCIAS

- ABBASI, F.; FAKHUR-UN-NISA, T., LIU, J. et al. Low digestibility of phytate phosphorus, their impacts on the environment, and phytase opportunity in the poultry industry. **Environmental Science and Pollution Research**, v.26, p.9469-9479, 2019.
- ABD EL-HACK, M. E. et al. The uses of microbial phytase as a feed additive in poultry nutrition – a review. **Annals of Animal Science**, v.18, p.639-658, 2018.
- ABDELLI, N.; SOLÀ-ORIO, D.; PÉREZ, J. F. **Phytogenic feed additives in poultry: Achievements, prospective and challenges**. *Animals*. 2021.
- ABRAHAMSOHN, P. Tecido ósseo. In: JUNQUEIRA L. C., CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 13 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 133-154. 2017.
- ADEDOKUN, S.A.; ADEOLA, O. **Calcium and phosphorus digestibility: Metabolic limits**. **Journal Applied Poultry Research**. v.22, n.3, p 600-608, 2013.
- ADEOLA, O; WALK, C. L. Linking ileal digestible phosphorus and bone mineralization in broilers chickens fed diets supplemented with phytase and highly soluble calcium. **Poultry Science**. Ed. 92 (8). 2013.
- ALVARENGA RR, NAGATA AK, RODRIGUES PB, ZANGERONIMO MG, PUCCI LEA, HESPANHOL R. Adição de fitase em rações com diferentes níveis de energia metabolizável, proteína bruta e fósforo disponível para frangos de corte de 1 a 21 dias. **Ciência Animal Brasileira**. N. 12(4):602-609. 2011.
- ANGEL, R.; TAMIM, N. M.; APPLGATE, T. J.; DHANDU, A. S.; ELLESTA, L. E. Phytic Acid Chemistry: Influence on phytin-phosphorus availability and phytase efficacy. **Journal Applied Poultry Research**. Ed. 11 (4): 471-480. 2002.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of analysis of AOAC International**. 18. ed. Washington: AOAC, 2005.
- APPLGATE, T. L.; ANGEL, R.; CLASSEN, H. L. Effect of dietary calcium, 25 hydroxycholecalciferol, or bird strain on small intestinal phytase activity in broiler chickens. **Poultry Science**. Ed. 82 (7) 1140-1148. 2003.
- ARAUJO, M. S. **Composição química e energética e aminoácidos digestíveis de alguns alimentos para codornas japonesas**. 76f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 2008.
- ASSUENA, V.; SGAVIOLI, S. Desempenho, composição da cama, das tíbias, do fígado e das excretas de frangos de corte alimentados com rações contendo fitase e baixos níveis de fósforo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.10, p.1938-1947, 2009.
- BALDISSERA, M.D.; SOUZA, C.F.; BALDISSEROTTO, B.; ZIMMER, F.; PAIANO, D.; PETROLI, T.G.; DA SILVA, A.S. Vegetable choline improves

growth performance, energetic metabolism, and antioxidant capacity of fingerling Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v. 500, 224-229. 2019.

BOLING, S. D.; DOUGLAS, M. W.; JOHNSON, M. L.; WANG, x.; PARSONS, C. M.; KOELKEBECK, K. W.; ZIMMERMAN, R. A. The effects of dietary available phosphorus levels and phytase on performance of young and older laying hens. **Poultry Science**. 78:79:224–230. 2000.

BRANDÃO, P. A. et al. Efeito da adição de fitase em rações de frangos de corte, durante as fases de crescimento e final. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, p. 492-498, 2007.

CAMPOS, M.M., GOMES, P., DUARTE, M.M., MORESCO, R.N. A simple and inexpensive automated technique for measurement of serum nitrite/nitrate. **Clin. Biochem**. 44, 348–350. 2011.

CASTRO, R.T.C. **Superdosagens de fitase combinada com a vitamina D em rações para frangos de corte**. Dissertação (Produção e Nutrição de não ruminantes) – Universidade Federal de Lavras. Lavras, p.55. 2019.

CHUNG, T. K.; RUTHERFURD, S. M.; THOMAS, D. V.; MOUGHAN, P. J. Effect of two microbial phytases on mineral availability and retention and bone mineral density in low-phosphorus diets for broilers. **British Poultry Science**, V. 54, 362–373. 2013.

CHIBA, L. I. **Animal nutrition handbook**. Second Revision. 13-15; 2009.

COSTA, F. G. P.; BRANDÃO, P. A.; BRANDÃO, J. S.; SILVA, J. H. V. Efeito da enzima fitase nas rações de frangos de corte, durante as fases pré-inicial e inicial. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 31, n. 3, p. 865-870, 2007.

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. **Animal Production Science**, Clayton South, v.55, n.6, p.710-719, 2015.

DALLMANN, H. M. **Efeitos de diferentes níveis de fitase e densidades energéticas em dietas de frangos de corte sobre o desempenho e composição da tíbia, na fase de 28 a 35 dias de idade**. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

DANG, N.T.; MUKAI, R.; YOSHIDA, K.-I.; ASHIDA, H. D-pinitol and myo-inositol stimulate translocation of glucose transporter 4 in skeletal muscle of C57BL/6 mice. **Biosci. Biotechnol. Biochem**, v. 74, p.1062–1067, 2010.

DAYYANI, N.; ABADI, M. B. B.; FARHANI, A. A. A. Phytate and phytase in poultry nutrition. **International journal of Advanced Biological and Biomedical Research**. v.1, I. 11, p.1403-1408, 2013.

DE FRANCESCHI, I.D et al. Effect of leucine administration to female rats during pregnancy and lactation on oxidative stress and enzymes activities of phosphoryltransfer network in cerebral cortex and hippocampus of the offspring. **Neurochemical Research**, v.3. p. 632-643, 2013.

DE SOUSA, J.P.L; ALBINO, L.F.T.; VAZ, R.G.M.V.; RODRIGUES, K.F. The effect of dietary phytase on broiler performance and digestive and bone and blood biochemistry characteristics. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, 17, Campinas. 2015.

DZEJA P.P., TERZIC A. Phosphotransfer networks and cellular energetics. The

EASTELL, Richard; LAMBERT, Helen. Diet and healthy bones. **Calcified Tissue International**, v. 70, n. 5, p. 400-404, 2002.

EDWARDS, JR.; H. M. Nutrition and skeletal problems in poultry. **Poultry Science**, v.79, p.1018- 1023, 2000.

ELKHALIL, E.A.I.; MANNER, K.; BORRIS, R.; SIMON, O. In vitro and in vivo characteristics of bacterial phytases and their efficacy in broiler chickens. **British Poultry Science**, v. 48, n.1, p. 64- 70, 2007.

EURELL; SICKLE, J. A.; SICKLE, D. C. V. Tecidos conjuntivos e de sustentação. In: EURELL; SICKLE J. A.; FRAPPIER B. L. **Histologia veterinária de Dellmann**. 6. ed. Barueri: Manole; p. 31-60. 2012.

FRANCESCHINA, C.S.; PIRES, P.G.S.; FRANCESCHI, C.H.; MENDES, J.V. A utilização de fitase na dieta de poedeiras. **Nutritime Revista eletrônica**, v.13, n.1. 2016.

GIBSON, R. S; RABOY, V.; KING, J. C. Implications of phytate in plant-based foods for iron and zinc bioavailability, setting dietary requirements, and formulating programs and policies. **Nutrition Reviews**, v.76, p.793-804, 2018.

GOFF, J. P. Cartilagem, ossos e articulações. In: REECE, W. O. **Dukes: Fisiologia dos animais domésticos**.13 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; p.575-595. 2017.

GUPTA; R.K.; GANGOLIYA, S.S.; SINGH, N.K. Reduction of phytic acid and enhancement of bioavailable micronutrients in food grains. **Journal of Food Science and Technology**, Campinas, v.52, n.2, p.676-684, 2015.

HUGHES; B. P. A method for estimation of serum creatine kinase and its use in comparing creatine kinase and aldolase activity in normal and pathological sera. *Clin Chim Acta* 7:597–603. 1962.

HWANG; E. S., KIM; G. Biomarkers for oxidative stress status of DNA, lipids, and proteins in vitro and in vivo cancer research. **Toxicology** 229(1-2): 1-10, 2007.

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. **Poultry Science**, v.98, p.912-922, 2019.

**Journal of Experimental Biology**. 206, 2039-2047. 2003.

KACZMAREK, S.A.; COWIESON, A.J.; HEJ-DYSZ, M.; RUTKOWSKI, A. Microbial phytase improves performance and bone traits in broilers fed diets based on soybean meal and containing lupin meal. **Animal Production Science**, Clayton South, v.56, n.10, p.1669-1676, 2016.

KLASING, K.C. & CALVERT, C.C. The care and feeding of an immune system: and analysis of lysine needs, in: LOBLEY, G., WHITE, A. & MACRAE, C. (Eds) **Proceedings of the VIIIth International Symposium on Protein Metabolism and Nutrition**, Aberdeen, UK, pp 253-264. 1999.

LAURENTIZ, A.C.; JUNQUEIRA, O.M.; FILARDI, R.S.; DUARTE, K.F.; LIMA, G.S. **Superdosagem de fitase para frangos de corte e poedeiras leves**. Tese (Doutor em Zootecnia) – Universidade Federal da Paraíba, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Universidade Federal do Ceará. Areia, p.97. 2018.

LEVINE, R. L. et al. Determination of carbonyl groups in oxidized proteins. **Methods in Molecular Biology**, v. 99, p. 15-24, 2000.

LI, J.; YUAN, J.; MIAO, Z. et al. Effect of dietary nutrient density on small intestinal phosphate transport and bone mineralization of broiler during the growing period. **Plos One**, v.11, n.4, p.1-10, 2016.

LIU, N.; RU, Y. J.; LI, F. D.; COWIESON, A. J. Effect of dietary phytate and phytase on metabolic change of blood and intestinal mucosa in chickens. **J. Anim. Physiology Animal Nutrition**. Ed. 94:368–374. 2010.

MATTERSON, L. D. et al. The metabolizable energy of feeds ingredients for chickens. **Connecticut: The university of Connecticut**, 11 p. Research report. 1965.

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

MUNIZ, E. B.; ARRUDA, M. V.; FASSANI, A.; JOSÉ, E.; TEIXEIRA, S.; PEREIRA A. S.; Avaliação de fontes de cálcio para frangos de corte. **Revista Caatinga**. 2007.

MUSZYŃSKI, S.; TOMASZEWSKA, E.; KWIECIEŃ, M.; DOBROWOLSKI, P.; TOMCZYK, A. Effect of dietary phytase supplementation on bone and hyaline cartilage development of broilers fed with organically complexed copper in a Cu deficient diet. **Biological Trace Element Research**, v. 182, n. 2, p. 339-353, 2018.

NASCIMENTO, R.A. **Análise econômica e desempenho de frangos de corte submetidos a dietas comerciais com matriz nutricional valorizada e**

**suplementadas com superdosagem de fitase. Dissertação (Mestre em Ciências).** Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga. 2017.

NIE, W. Y.; YANG, J.; YUAN, Z.; WANG, Y.; GUO, J. Effect of dietary nonphytate phosphorus on laying performance and small intestinal epithelial phosphate transporter expression in Dwarf pink-shell laying hens. **Journal Animal Science Biotechnology**. 4:34. 2013.

NISSAR, J.; AHAD, T.; NAIK, H.R.; HUSSAIN, S.Z. A review phytic acid: As antinutrient or nutraceutical. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, Rohini, v.6, n.6, p.1554-1560, 2017.

OBERLEAS, D. Phytates. In: **NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES**. Toxicants occurring naturally in foods Washington: National Academy of Sciences, p.363-371. 1973.

OHKAWA, H., OHISHI, N. AND YAGI, K. Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. **Analytical Biochemistry**, 95, 351-358. 1979.

PERIN, G.; BALDISSERA, M.D.; JAGUEZESKI, A.M.; CRECENCIO, R.B.; STEFANI, L.M.; GRIS, A.; MENDES, R.E.; SOUZA, C.F.; DALZUK, V.; DA SILVA, A.S. Involvement of the phosphoryl transfer network on cardiac energetic metabolism during *Staphylococcus aureus* infection and its association to disease pathophysiology. **Microbial Pathogenesis**, 126,318-322. 2019.

PIZAURO JUNIOR, J. M.; SANTOS, L. F. J.; GONÇALVES, A. M. Estrutura e função do tecido ósseo. In: MACARI, M.; MAIORKA, A. **Fisiologia das aves comerciais**. Jaboticabal: Funep. p. 491-513. 2017.

PULIDO R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. **ournal of agricultural and food chemistry**. 2000.

QIAN, H.; VEIT, H.P.; KORNEGAY, E.T.; RAVIN-DRAN, V.; DENBOW, D.M. Effects of supplemental phytase and phosphorus on histological and other tibial bone characteristics and performances of broilers fed semi-purified diets. **Poultry Science**, v.75, p. 618-626, 1996.

REECE, W. O.; ERICKSON, H. H.; GOFF, J. P.; UEMURA, E. E. **Dukes: Fisiologia dos Animais Domésticos**. Ed. 13. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. 2017.

SCHOULTEN, N.A.; TEIXEIRA, A.S.; FREITAS, R.T.F. et al. Níveis de cálcio em rações de frangos de corte na fase inicial suplementadas com fitase. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.5, p.1190-1197, 2003.

SELLE, P.H.; RAVINDRAN, V. Microbial phytase in poultry nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, Davis, v.135, n.1, p.1-41, 2007.

SGAVIOLI, S.; SANTOS, E. T.; BORGES, L. L.; ANDRADE-GARCIA, G. M.; CASTIBLANCO, D. M. C.; ALMEIDA, V. R.; GARCIA, R. G.; SHIMANO, A. C.; NÄÄS, I. A.; BARALDIARTONI S. M. Effect of the addition of glycosaminoglycans on bone and cartilaginous development of broiler chickens. **Poultry Science**, v. 96, n. 11, p. 4017-4025, 2017.

SILVA, D.J. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV. 165p. 1990.

SINGH, A.; KUKRETI, R.; SASO, L.; KUKRETI, S. Oxidative stress: a key modulator in neurodegenerative diseases. **Molecules**, v. 24, n. 8, 1583, 2019.

SLOMINSKI; B. A. Recent advances in research on enzymes for poultry diets (Review). **Poultry Science**. 2013-2023. 2011.

SWEAZEA, K. L.; BRAUN, E. J. Glucose transporter expression in English sparrows (*Passer domesticus*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part B, v. 144, p.263-270, 2006.

TATSCH, E., BOCHI, G.V., PEREIRA, R.S., KOBER, H., AGERTT, V.A., DE

TOKUSHIMA, Y. et al. Glucose uptake in vivo in skeletal muscles of insulin-injected chicks. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part B, v. 141, p. 43-48, 2005.

TOREN, A. et al. Congenital haemolytic anaemia associated with adenylate kinase deficiency. **British Journal of Haematology**, v.87, p. 376-380, 1994.

TORRE, M., RODRIGUEZ, A.R., SAURA-CALIXTO, F. Effects of dietary fiber and phytic acid on mineral availability. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v.1, n.1, p.1-22, 1991.

VALENTINI, G. et al. The allosteric regulation of pyruvate kinase. **Journal Biology Chemical**, v. 275, p. 18145-18152, 2000.

VÖTTERL, J. C. et al. Dietary Phytase and Lactic Acid-Treated Cereal Grains Differently Affected Calcium and Phosphorus Homeostasis from Intestinal Uptake to Systemic Metabolism in a Pig Model. **Nutrients**, v.12, p.1542-1554, 2020.

WALK, C.L.; BEDFORD, M.R.; SANTOS T.T. et al. Extra-phosphoric effects of superdoses of a novel microbial phytase. **Poultry Science**; 92:719–725. 2013.

WALTERS, H.G.; COELHO, M.; COUFAL, C.D.; LEE, J.T. Effects of Increasing Phytase Inclusion Levels on Broiler Performance, Nutrient Digestibility, and Bone Mineralization in Low-Phosphorus Diets. **Journal of Applied Poultry Research**, v.28, p. 1210-1225. 2019.

WILLIAMS, B.; et al. Dietary effects on bone quality and turnover, and Ca and P metabolism in chickens. **Research in Veterinary Science**, v.69, p.81–87, 2000.

WINGLER, K.; HERMANS, J. J. R.; SCHIFFERS, P.; MOENS, A. L.; PAUL, M.; SCHMIDT, H. H. H. W.; NOX1, 2, 4, 5: Counting out Oxidative Stress. **British Journal of Pharmacology**. PubMed. 164, 866. 2011.

WOYENGO, T.; NYACHOTI, C. M. Review: Supplementation of phytase and carbohydrases to diets for poultry. **Canbrigue Journal Animal Science**. Ed. 91:177–192. 2011.

YAMASHITA, Y; YAMAOKA, M; HASUNUMA, T; ASHIDA, H; YOSHIDA, K.I. Detection of orally administered inositol stereoisomers in mouse blood plasma and their effects on translocation of glucose transporter 4 in skeletal muscle cells. **J. Agric. Food Chem**, v. 61, p. 4850–4854, 2013.

ZHOU, J.R., ERDMAN, J.W. Phytic acid in health and disease. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v.35, n.6, p.495-508, 1995.