

ROBERTA CORSINO FERREIRA

**EFEITO DAS ENZIMAS FITASE E XILANASE SOBRE A DISPONIBILIDADE
DE FÓSFORO EM DIETAS PARA SUÍNOS DOS 63 AOS 103 DIAS DE IDADE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de Magister Scientiae.

VIÇOSA

MINAS GERAIS – BRASIL

2015

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

F383e
2015
Ferreira, Roberta Corsino, 1984-
Efeito das enzimas fitase e xilanase sobre a disponibilidade
de fósforo em dietas para suínos dos 63 aos 103 dias de idade /
Roberta Corsino Ferreira. – Viçosa, MG, 2015.
xi, 38f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Aloízio Soares Ferreira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 28-37.

1. Suínos - Alimentação e rações. 2. Nutrição animal.
3. Enzimas. 4. Fósforo. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Zootecnia. Programa de Pós-graduação em
Zootecnia. II. Título.

CDD 22. ed. 636.08527

ROBERTA CORSINO FERREIRA

**EFEITO DAS ENZIMAS FITASE E XILANASE SOBRE A DISPONIBILIDADE
DE FÓSFORO EM DIETAS PARA SUÍNOS DOS 63 AOS 103 DIAS DE IDADE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de Magister Scientiae.

APROVADA: 20 de março de 2015.

Francisco Carlos de Oliveira Silva
(Coorientador)

Valéria Monteze Guimarães

Aloizio Soares Ferreira
(Orientador)

Ao meu bom Deus, por me conceder essa oportunidade e ser a minha força diante das dificuldades.

Aos meus pais Silvana e Carlos Roberto, pelo apoio, confiança e por todo amor que dedicaram a mim.

A minha irmã Maria pelo companheirismo e amizade.

A toda minha família de sangue e de coração pelo incentivo.

E a todos os meus amigos que de forma direta ou indireta fizeram parte dessa conquista.

**Com amor e gratidão,
Dedico.**

“No fim tudo dá certo, e se não deu certo é porque ainda não chegou ao fim.”

Fernando Sabino

AGRADECIMENTOS

Ao Deus que guia meus passos e me dá força.

Aos meus pais Silvana e Carlos Roberto pela dedicação, incentivo, confiança e amor. A minha irmã Maria Clara pelo companheirismo de sempre, que mesmo à distância sempre se fez presente na minha vida. Aos meus familiares e amigos de Montes Claros e região por entenderem minha ausência.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização desse curso e ter sido a minha segunda casa durante todos esses anos. Ao programa de Pós Graduação em Zootecnia – UFV, pela oportunidade de realização do mestrado.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo financiamento da pesquisa e concessão da bolsa de estudos durante o curso.

À Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), em especial, ao pesquisador Dr. Francisco Carlos de Oliveira Silva, pelo apoio, confiança e orientação na execução deste trabalho.

Ao meu Orientador, Dr. Aloizio Soares Ferreira, pela paciência, confiança e orientação. Aos professores Dr. Alysson Saraiva, Dra Melissa Izabel Hannas, e ao pesquisador da EPAMIG, Dr. Francisco Carlos de Oliveira Silva pela coorientação nos trabalhos, pelas críticas e sugestões durante a execução. À professora, Dra Valéria Monteze Guimarães e ao pesquisador da EPAMIG, Dr. Francisco Carlos de Oliveira Silva, pela participação na banca avaliadora.

Ao professor Fabyano Fonseca e Silva e ao seu orientado Leonardo Siqueira Glória pela disponibilidade e contribuição com as análises estatísticas. Aos demais professores do departamento de Zootecnia e, em especial, aos professores Dr. Paulo César Brustolini por me conceder este projeto, e ao professor Dr. Sérgio Luiz de Toledo Barreto por todas as oportunidades.

Aos funcionários do Departamento de Zootecnia pelo carinho, em especial ao Plínio, Vera, Mário, Fernanda e Márcia. Aos amigos, funcionários do Setor de Suinocultura: Vítor, Francisco (Chico), Sebastião (Tãozinho), Fernando, Raimundo, Francisco (Marreco), Valdeir, Alessandro, Clóves, Leandro e de forma bem especial ao José Alberto “Dedeco”, que foi indispensável para a realização deste trabalho.

A todos do Laboratório de Biologia Estrutural pelo carinho com que me receberam em especial ao professor Sérgio Da Matta, ao Matheus, ao José, à Grazi, à Juliana, à Marly, à Camila, à Carol e à Ana por todos os ensinamentos.

A todos do laboratório de Bioquímica Animal pela realização das análises ósseas, em especial ao Professor George, à Christiane, ao Jefferson e à Fernanda pelo empenho, cuidado e dedicação na execução dos trabalhos.

Aos meus colegas Bruno, Priscila, Ana Paula e Carlota, “irmãos” de orientação e aos meus queridos estagiários: Bárbara, Marcos, Melissa, Natália e Liliane pela ajuda durante o experimento.

Aos meus amigos Carol, Jorge, Rafael, Gustavo, Érika, Jéssica, Rosana, Lívia, Cândida, Juliana, Priscila, Tarciso, Amanda e Bruna e a todos os amigos da UFV e de Viçosa pela amizade, companheirismo e alegrias à qual me proporcionaram. À Cínthia pela contribuição imensurável nesse trabalho. Ao Gabriel (Macaé), que muito mais que um amigo é para mim um irmão, mas foi também como um coorientador, sem sua ajuda incondicional nada teria sido possível.

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a concretização desse meu sonho de ser mestre.

BIOGRAFIA

ROBERTA CORSINO FERREIRA, filha de Carlos Roberto Ferreira da Silva e Silvana Corsino da Silva, nasceu em Montes Claros, Estado de Minas Gerais, em 12 de abril de 1984.

Em 2007, iniciou o curso de Zootecnia na Faculdade de Estudos Administrativos (FEAD), em Belo Horizonte, Estado de Minas Gerais e em agosto de 2008 se transferiu para a Universidade Federal de Viçosa, graduando-se em novembro de 2012.

Em abril de 2013, iniciou o Curso de Mestrado em Zootecnia na Universidade Federal de Viçosa, concentrando os estudos na área de Nutrição de Monogástricos, submetendo-se à defesa de dissertação em Março de 2015.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Inclusão de enzimas nas rações de suínos com alto potencial para deposição de carne magra.....	3
2.1.1. Xilanase.....	4
2.1.2. Fitase.....	4
2.1.3. Desempenho x Enzimas.....	5
2.2. Farelo de arroz desengordurado e polissacarídeos não amiláceos.....	7
2.3. Fósforo, Cálcio e absorção.....	8
2.4. Fosfatase alcalina.....	9
2.5. Proteínas ósseas.....	10
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
4. RESULTADOS.....	20
5. DISCUSSÃO.....	24
6. CONCLUSÕES.....	27
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28
8. APÊNDICE.....	38

LISTA DE TABELAS

EFEITO DAS ENZIMAS FITASE E XILANASE SOBRE A DISPONIBILIDADE DE FÓSFORO EM DIETAS PARA SUÍNOS DOS 63 AOS 103 DIAS DE IDADE

Tabela 1 – Composição centesimal, química e energética das rações experimentais utilizadas no experimento.....	13
Tabela 2 – Peso inicial (PI); peso final (PF); consumo de ração (CR); ganho de peso (GP); conversão alimentar (CA).....	20
Tabela 3 – Espessura de toucinho (ET); porcentagem de carne magra (% CM) e profundidade de músculo (PM).....	21
Tabela 4 – Teor de fósforo no osso (P); teor de cálcio no osso (Ca); relação cálcio e fósforo no osso (Ca:P); resistência do osso à quebra (RO); atividade da fosfatase alcalina (AFAS).....	22
Tabela 5 – Peso do osso in Natura (P in N); comprimento do osso (C); diâmetro horizontal do osso (DH); diâmetro vertical (DV); peso do osso seco desengordurado (PSD); Índice Seedor (IS); proteínas não colagenosas (PNC); proteínas colagenosas (PC).....	23

LISTA DE FIGURAS

EFEITO DAS ENZIMAS FITASE E XILANASE SOBRE A DISPONIBILIDADE DE FÓSFORO EM DIETAS PARA SUÍNOS DOS 63 AOS 103 DIAS DE IDADE

Figura 1 – Osso seco e desengordurado.....	15
Figura 2 – Prensa manual de compressão simples para análise de resistência óssea.....	15
Figura 3 – Prensa manual de compressão simples para análise de resistência óssea.....	16
Figura 4 – Extração de proteínas não colagenosas com EDTA (vista lateral).....	18
Figura 5 – Extração de proteínas não colagenosas com EDTA (vista de cima).....	18
Figura 6 – Etapa de titulação para a Análise de Proteínas Colagenosas utilizando solução de HCl... ..	18

RESUMO

FERREIRA, Roberta Corsino, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2015. **Efeito das enzimas fitase e xilanase sobre a disponibilidade de fósforo em dietas para suínos dos 63 aos 103 dias de idade.** Orientador: Aloízio Soares Ferreira. Coorientadores: Alysson Saraiva, Francisco Carlos de Oliveira Silva e Melissa Izabel Hannas.

Objetivando-se avaliar o efeito das enzimas fitase e xilanase sobre a disponibilidade de fósforo em dietas para suínos dos 63 aos 103 dias de idade, realizou-se um experimento, em que foram utilizados 84 leitões híbridos comerciais, machos castrados distribuídos em delineamento experimental de blocos ao acaso, com seis tratamentos e sete repetições. Os tratamentos experimentais usados foram: T1 - dieta basal; T2 - dieta basal com redução de 0,15% fósforo disponível (Pdisp) e de 50 kcal de energia metabolizável/kg (EM/kg); T3 – dieta basal com redução de 0,15% Pdisp e de 50 kcal de EM/kg (T2) e adição de mistura de enzimas (fitase e xilanase); T4 - dieta basal (T1) e inclusão de 15% de FAD; T5 – dieta basal com redução de 0,15% Pdisp e 50 kcal de EM/kg (T2) e inclusão de 15% de FAD e T6 – dieta basal com redução de 0,15% Pdisp e 50 kcal de EM/kg e adição de mistura de enzimas (fitase e xilanase) (T3) e inclusão de 15% de FAD. Os parâmetros avaliados foram submetidos à análise de variância e contrastes ortogonais. As conversões alimentares (CA) foram comparadas com as diferenças percentuais entre os valores dos tratamentos e os valores do tratamento controle. A conversão alimentar dos suínos foi maior nos tratamentos com redução de fósforo (T2) e (T5) e com inclusão enzimática (T3) e (T6); e menor no tratamento sem redução de fósforo e sem inclusão de enzimas (T4) em relação ao tratamento testemunha (T1) sem redução de fósforo e sem inclusão de enzimas. Não houve efeito significativo de nenhum dos tratamentos sobre o teor de fósforo disponível (Pdisp) no osso, sobre a relação cálcio e fósforo no osso, sobre a atividade da fosfatase alcalina no soro, sobre o diâmetro vertical dos ossos e sobre o consumo de ração dos suínos. Nos tratamentos com inclusão de FAD houve efeito significativo sobre o comprimento dos ossos. Nos tratamentos sem inclusão do FAD, foi observado efeito significativo, sobre o ganho de peso dos animais, sobre a espessura de toucinho final dos animais, sobre o teor de cálcio no osso, sobre os pesos dos ossos in natura e seco e desengordurado, sobre os teores das proteínas ósseas. Foi observado efeito significativo sobre a resistência do osso à quebra, em dietas contendo ou não FAD. A suplementação com enzimas e a

redução de fósforo altera o desempenho dos suínos. A resistência do osso à quebra é afetada pela redução de fósforo em dietas contendo ou não FAD. A redução no nível de Pdisp nas rações altera a qualidade óssea e os teores de proteínas ósseas.

ABSTRACT

FERREIRA, Roberta Corsino, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2015.
Effect of enzymes phytase and xylanase on phosphorus availability in diets for pigs of 63 to 103 days old. Advisor: Aloízio Soares Ferreira. Co-advisors: Alysson Saraiva, Francisco Carlos de Oliveira Silva and Melissa Izabel Hannas.

Aiming to evaluate the effect of the enzyme phytase and xylanase on the availability of phosphorus in pig diets of 63 to 103 days of age, there was an experiment in which 84 pigs commercial hybrids were used, castrated males distributed in experimental design of randomized block design with six treatments and seven repetitions. The used treatments were: T1 - basal diet; T2 - basal diet with reduction of 0.15% available phosphorus (Pdisp) and 50 kcal metabolizable energy / kg (EM / kg); T3 - basal diet with reduced Pdisp 0.15% and 50 kcal / kg (T2), and addition of mixture of enzymes (xylanase and phytase); T4 - basal diet (T1) and inclusion of 15% of FAD; T5 - basal diet with reduction of 0.15% Pdisp and 50 kcal / kg (T2) and include 15% FAD and T6 - basal diet with reduction of 0.15% Pdisp and 50 kcal / kg and adding the mixture of enzymes (xylanase and phytase) (T3) and inclusion of 15% FAD. The parameters evaluated were submitted to ANOVA and orthogonal contrasts Feed conversion (FC) were compared with the percentage differences between the values of treatment and control treatment values. The feed conversion of pigs was higher in treatments with phosphorus reduction (T2) and (T5) and enzyme inclusion (T3) and (T6); and less phosphorus reduction without treatment and without inclusion of enzymes (T4) in relation to the control treatment (T1) without reducing phosphorus and without the inclusion of enzymes. There was no significant effect of treatment on the level of phosphorus available (Pdisp) in bone, on the calcium and phosphorus in bone, on alkaline phosphatase activity in serum, on the vertical diameter of the bones and the feed consumption Swine. In the treatments with inclusion of FAD significant effect on the length of the bones. In treatments without addition of FAD, was no significant effect on the weight gain of the animals, on the final thickness of the fat animals, the calcium content in the bone on the weights of the bones in nature and degreased and dried over the levels of bone proteins. It was observed significant effect on bone crack resistance in diets with or without FAD. The supplemental enzymes and phosphorus reduction alters the performance of pigs. The bone breaking resistance is affected by the reduction in phosphorous diets with or without FAD. The reduction in the level of the feed Pdisp alters bone quality and the levels of bone proteins.

1. INTRODUÇÃO

Os alimentos de origem têm apresentado baixos teores de fósforo e, além disso, tem apresentado o fósforo na forma fítica. O ácido fítico é uma molécula constituída por um grupo ortofosfato ionizável e que pode complexar alguns cátions como Ca, Mg, Mn e Cu (NEWMANN, 1994). Além do amido, nos grãos de cereiais e leguminosas estão presentes: a celulose, e a hemicelulose, que são carboidratos estruturais e podem ser classificados em insolúveis e solúveis, respectivamente. Estes últimos são de baixa digestibilidade para suínos, aumentam a viscosidade da digesta e com isso, pouco contribuem para o fornecimento total de energia para esses animais, principalmente, quando em altas concentrações nas dietas.

As enzimas exógenas podem potencializar o aproveitamento dos polissacarídeos não amiláceos (PNAs), e outros nutrientes, e por isso vêm sendo utilizadas nas dietas dos suínos. As enzimas, apesar de não possuírem função nutricional direta, auxiliam no processo digestório, melhorando a digestibilidade dos nutrientes presentes na dieta (CAMPESTRINI et al., 2005). Atualmente as principais enzimas disponíveis no mercado são as carboidrases, proteases e a fitase. As carboidrases diminuem a viscosidade da digesta, aumentam a digestibilidade dos nutrientes da dieta e melhorar a energia metabolizável (FISCHER et al., 2002; LIMA et al., 2002). A fitase catalisa a hidrólise das ligações que unem o grupo fosfato à molécula de mio-inositol, ou seja, possui a ação de romper a molécula do fitato ou ácido fítico, aumentando a disponibilidade do fósforo (SELLE & RAVINDRAN, 2007).

O uso de farelo de arroz desengordurado (FAD) na dieta de suínos passou a ser uma alternativa para a redução nos custos de produção. No entanto, a utilização do FAD na alimentação de suínos possui algumas limitações como o alto teor de fibra, constituída principalmente por polissacarídeos não-amiláceos solúveis (PNA) que além de aumentarem o fluxo de passagem do alimento no trato gastrintestinal o que reduz a absorção dos nutrientes, também aumentam a viscosidade do conteúdo intestinal, o que reduz a interação da enzima com o substrato (BEDFORD, 2000). Além de PNA, outro fator limitante da utilização do FAD em dietas de suínos é que cerca de 80% de todo o fósforo contido está sob a forma de ácido fítico, o que torna o próprio fósforo e uma série de outros nutrientes, indisponíveis para a absorção pelo animal, isso porque o

fitato forma sais insolúveis com minerais e complexos com proteínas, além de diminuir a atividade das enzimas proteolíticas (SELLE et al, 2003).

A enzima fitase pode melhorar o aproveitamento de nutrientes, provavelmente permitindo diminuição dos níveis de proteína e fósforo disponível adicionado às dietas, sem interferir no desempenho e na composição óssea dos animais (VAZ et al, 2013). Melhorias nas taxas de conversão alimentar, retenção de nutrientes e mineralização óssea, além de redução da poluição ambiental observada pela diminuição da excreção de fósforo nas fezes, são alguns dos efeitos benéficos da adição de fitase às rações (BEDFORD, 2000).

Nesse contexto, objetivou-se com esse estudo avaliar o efeito das enzimas fitase e xilanase sobre a disponibilidade de fósforo em dietas para suínos dos 63 aos 103 dias de idade.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Considerando-se que, do custo total de produção de suínos, os gastos com alimentação representam cerca de 60-70%, maior lucratividade pode estar associada a formas alternativas para diminuir esses gastos (SAKOMURA et al, 1997). Entretanto, a maioria dos alimentos alternativos podem apresentar fatores antinutricionais que limitam ou impedem a utilização dele.

Entre os fatores antinutricionais mais comuns encontram-se o ácido fítico e os polissacarídeos não amídicos (PNA) (CONTE et al, 2003). Atualmente, alguns desses fatores antinutricionais podem ser reduzidos pela adição de enzimas exógenas à ração (SHOULTEN et al, 2003) .

2.1. Inclusão de enzimas nas rações de suínos com alto potencial para deposição de carne magra

As enzimas comercialmente produzidas para aumentar a digestibilidade dos nutrientes são provenientes, geralmente, de bactérias do gênero **Bacillus** sp ou fungos do gênero **Aspergillus** sp (FERKET, 1996). A enzima adicionada ao alimento seco só é ativada no trato digestivo quando misturada aos fluidos digestivos e sob a temperatura do organismo (ROTTER, 1990). As enzimas podem ser fornecidas aos animais, isoladamente ou misturadas a outras enzimas, o que segundo INBORR & MEULEN (1993), tem sido uma prática muito comum na Europa, principalmente as carboidrases, que também podem ser ministradas separadamente (celulase, xilanase, β -glicanase, queratinase).

O fornecimento de complexos enzimáticos tem sido feito quando uma determinada dieta apresenta uma variada quantidade de fatores antinutricionais ou em rações de leitões que estejam passando por estresse (desmame, vacinação, castração, desconforto térmico), pois tal situação debilita a produção de enzimas endógenas (FERKET, 1996).

2.1.1. Xilanase

As xilanases são enzimas, do grupo das carboidrases, que catalisam a degradação do polissacarídeo linear beta-1,4-xilano em xilose, decompondo assim a hemicelulose, um dos principais componentes das paredes celulares das plantas (CONTE et al, 2002). As hemiceluloses são heteropolímeros de xilose, galactose, manose, arabinose e vários outros açúcares, bem como seus ácidos urônicos (VAN SOEST, 1985). A xilana é o principal polissacarídeo da hemicelulose, constituída por unidades de D-glicoses ligadas entre si por ligações xilopiranosídicas β (1 $\rightarrow$ 4).

As enzimas carboidrases, entre elas a xilanase, produzidas por fungos do gênero *Aspergillus*, têm sido usadas em dietas para animais para catalisar a hidrólise de polissacarídeos não amiláceos solúveis, aumentando a digestibilidade de alimentos fibrosos. Como os suínos não sintetizam essas enzimas a dificuldade na digestão de fibras aumenta, além de reduzir a energia do alimento, pode prejudicar a utilização de outros nutrientes. Esse problema é agravado quando o tipo de fibra do alimento é solúvel, pois essa fibra tem grande capacidade de absorver água e formar substância viscosa no trato intestinal. A fibra solúvel é composta principalmente pela hemicelulose, a qual é composta, principalmente, pelos β -glucanos na cevada e aveia e arabinoxilanos no trigo, centeio e farelo de arroz (CONTE et al, 2003).

Trabalhos recentes têm demonstrado respostas positivas quanto à digestibilidade de nutrientes e desempenho de aves e suínos alimentados com rações à base de milho e farelo de soja quando suplementadas por enzimas exógenas.

2.1.2. Fitase

A fitase (myo-inositol hexakisfosfato fosfohidrolase) é a enzima que catalisa a hidrólise e liberação do fósforo da molécula de fitato por meio de uma série de reações de desfosforilação resultando em séries menores de ésteres de fosfato de myo-inositol, sendo eles, pentakis-, tetrakis-, tris-, bis-, monofosfato (IP5 $\rightarrow$ IP4 $\rightarrow$ IP3 $\rightarrow$ IP2 $\rightarrow$ IP1) e, por último, fósforo inorgânico, VATS & BANERJEE (2004). As fitases estão presentes nas plantas, nos animais (fitase da mucosa) e nos microrganismos (tanto aqueles presentes no intestino dos animais quanto nos microrganismos utilizados para produzir a fitase microbiana de uso comercial).

Como a maior parte do fósforo nos grãos encontra-se ligada ao fitato e tem disponibilidade de 25 a 40% (KIES et al, 1997), a enzima fitase, produzida comercialmente através do cultivo de micro-organismos do gênero *Aspergillus*, tem sido utilizada nas rações de suínos e de aves para aumentar a disponibilidade do fósforo ligado à molécula de fitato (CONTE et al, 2003).

Dessa forma a utilização da fitase exógena aumenta a disponibilidade de fósforo, reduzindo a necessidade de suplementação das dietas com fósforo inorgânico e, conseqüentemente a excreção de fósforo, sem afetar o desempenho (SILVA, 2008). Por causa do seu grupo ortofosfato, altamente ionizado, este complexa com uma variedade de cátions (Ca, Fe, Cu, Zn, entre outros), o grupo amina de alguns aminoácidos (lisina, arginina, histidina) e, ainda, moléculas conjugadas de glicose, especialmente no amido (NELSON & COX, 2011). Entre os efeitos benéficos da adição de fitase às dietas estão as melhorias nas taxas de conversão alimentar, retenção de nutrientes e mineralização óssea, além de reduzir a poluição ambiental (COWIESON et al, 2004).

Embora no início do processo de obtenção da enzima fitase os custos tenham sido elevados, com o avanço da tecnologia de fermentação, a enzima vem sendo produzida industrialmente, com reflexos positivos nos preços do produto. Este fato tem despertado o interesse de pesquisadores em avaliar a utilização dessa enzima na alimentação animal, principalmente em razão da preocupação dominante com os altos custos do fósforo inorgânico suplementar e com a poluição ambiental causada pelo excedente de P excretado nas fezes (LEI et al, 1993; CROMWELL, 1991; CROMWELL et al, 1993, 1995A, 1995B).

2.1.3. Desempenho x Enzimas

Enzimas são proteínas que possuem atividade catalítica, a qual depende da integridade da sua conformação proteica original. A atuação e o efeito causado pela ação das enzimas exógenas são determinados por diversos fatores, os quais incluem o tipo de enzima, sua origem, atividade enzimática, nível de inclusão e especificidade pelo substrato, resistência às secreções digestivas e variações no pH do trato digestório do animal, forma de processamento da dieta, ingredientes e/ou quantidade de substrato alvo na dieta e idade do animal (CHESSON, 1993).

A resposta da fitase depende da quantidade de cálcio na ração (LEI et al. 1994), da dose fornecida de fitase (CROMWEEL et al. 1995), da presença de carboidrase (WENK et al., 1993), da quantidade e origem do fitato e da idade e categoria dos animais (JONGBLOED et al., 1993). Ludke et al. (2002) observou que a adição de fitase em dietas contendo ingredientes com alto teor de fósforo total de baixa disponibilidade, o farelo de arroz desengordurado, por exemplo, proporcionou aos animais suplemento mineral suficiente para atender as exigências e a adequada formação óssea. Segundo Cromwell et al. (1995), os suínos em crescimento e terminação alimentados com rações com níveis decrescentes de fósforo, apresentaram diminuição da quantidade de cinzas no osso e de fósforo nas fezes; quando se adicionou níveis crescentes de fitase nas rações os suínos apresentaram aumento na quantidade de cinzas no osso e diminuição na quantidade de fósforo excretado. Foi verificado, ainda, melhora na conversão alimentar, aumento no consumo alimentar, na velocidade de crescimento e na resistência à quebra dos ossos.

Fireman et al. (2000) trabalhando com suínos nas fases de crescimento e terminação, comparou o consumo diário de ração de animais que receberam dietas que continham farelo de arroz integral e os à base de milho e farelo de soja observou que o consumo diário foi maior aos que receberam dietas a base de milho e farelo de soja. Segundo Ciat (1976), isso pode ser explicado devido alguns aspectos inerentes do farelo de arroz integral, como consistência, densidade e palatabilidade. Cromwell (1986) explicou que a natureza volumosa da dieta faz com que diminua o consumo de alimentos pelos animais, pois ultrapassa a capacidade do trato digestível e também reduz a palatabilidade. Por outro lado, Fireman et al. (2000) observou que os animais que consumiram milho e farelo de soja apresentaram maior ganho de peso. Entretanto, apesar dos animais que receberam dietas com milho e farelo de soja terem consumido mais alimentos e ganhado mais peso, o aproveitamento das dietas por aqueles animais foi igual aos que receberam a dieta 50 % com farelo de arroz integral com ou sem enzima.

A utilização de enzimas exógenas nas dietas para animais tem apresentado alguns resultados controversos, podendo muitas vezes promover melhorias no aproveitamento dos nutrientes e em alguns casos melhora no desempenho e na redução

da excreção de dejetos, no entanto, em alguns casos esses resultados não observados com a adição de enzimas na ração.

2.2. Farelo de Arroz Desengordurado e Polissacarídeos não-amiláceos

O Farelo de Arroz Desengordurado (FAD) é um subproduto do beneficiamento do arroz destinado à alimentação humana. Comparado ao milho, apresenta maiores teores de proteína e de fibra e menores de gordura e energia digestível inferiores. O FAD contém aproximadamente 15,5% de proteína, 24,3% de fibra em detergente neutro, 15,8% de fibra em detergente ácido, 1,6% de extrato etéreo e 2530 e 2450 kcal/kg de dieta de energia digestível e metabolizável, respectivamente, o que justifica a inclusão na alimentação de suínos em crescimento e terminação (ROSTAGNO et. al., 2011).

No entanto, existem algumas limitações no uso do FAD na alimentação de suínos, que diminuem a disponibilidade dos nutrientes que o compõe, como a presença de fatores antinutricionais, substâncias intrínsecas a um alimento que dificultam a digestão, absorção e utilização dos nutrientes, principalmente os polissacarídeos não amiláceos estruturais (PNA), e cerca de 80% de todo o fósforo contido sob a forma de ácido fítico. Entre outros fatores estão aqueles com efeito sobre a digestão de proteínas (inibidores de proteases, lectinas, saponinas), que estimulam o sistema imunológico causando hipersensibilidade (proteínas antigênicas), substâncias tóxicas ou que complexam com minerais, inibindo a utilização dos mesmos pelos animais (glucosinolatos, ácido oxálico, gossipol).

Os PNA's podem ser classificados conforme a solubilidade, sendo a hemicelulose e a pectina a fração solúvel e a celulose a fração insolúvel. Os β -glucanos e arabinoxilanos são os principais componentes da hemicelulose. Em animais não ruminantes as enzimas endógenas não digerem a fibra da dieta, sendo esta fermentada pelos microrganismos do intestino grosso com a produção de ácidos graxos voláteis.

Warren & Farrell (1990) afirmaram que as dietas com até 30% de FAD resultam em um aceitável desempenho dos suínos quando o consumo de energia digestível for constante. Kunrath et al. (2010) estudou o valor nutricional do FAD na alimentação de suínos nas fases de crescimento e terminação, onde o valor de EM obtido foi de 2429

kcal/ kg, na fase de crescimento, e de 2293 kcal/kg, fase de terminação, respectivamente.

De forma geral, pode-se dizer que o uso do FAD na alimentação de suínos é limitado pelo alto teor de fibra bruta e de fósforo, podendo ser incluído em até 30% nas dietas de crescimento e terminação.

2.3. Fósforo, cálcio e absorção

O fósforo desempenha um grande número de funções no organismo, como a formação e mineralização da matriz óssea. Possui função energética na forma de ATP, atua como componente dos ácidos nucleicos (DNA e RNA) e participa na manutenção da pressão osmótica e do equilíbrio ácido-básico, é um dos componentes da membrana celular (fosfolipídios), tem participação no tamponamento do sangue e na bomba de sódio e atua como constituinte de vários sistemas enzimáticos, sendo imprescindível que esteja em nível adequado nas rações para atender as exigências do animal (NELSON & COX, 2011).

No organismo animal, o fósforo se apresenta na forma inorgânica (cristais de hidroxiapatita), compondo o esqueleto, e na forma orgânica nos demais tecidos. Nos vegetais, é encontrado sobretudo na forma de ácido fítico, que possui baixa digestibilidade em animais não ruminantes, devido à ausência da enzima fitase, responsável pela clivagem da molécula do fitato. Sendo assim, faz-se necessário a adição dessas enzimas nas dietas desses animais, aumentando a disponibilidade do elemento, bem como de outros minerais e proteínas que estão complexadas ao fitato.

A deficiência de fósforo pode levar a um baixo consumo de ração, piora na conversão alimentar, distúrbios reprodutivos e alterações do apetite, além de anormalidades ósseas (UNDERWOOD & SUTLLE, 1999). A troca desse mineral nos tecidos decresce com a idade e aumenta durante os períodos de atividade reprodutiva, sendo essas trocas mais intensas no fósforo lábil do esqueleto e na matéria esponjosa do osso (GEORGIEVSKII, 1982). Estudos para determinação das exigências de cálcio e fósforo de suínos têm sido realizados com base no ganho de peso, na conversão alimentar, no consumo de ração, na resistência do osso à quebra e nos teores de cálcio, fósforo e cinzas nos ossos. De acordo com Saraiva et al. (2009), baixos níveis de

fósforo na ração de suínos na fase de 30 a 60 kg não comprometem o consumo voluntário de alimento pelos animais.

O metabolismo do fósforo está intimamente associado ao do cálcio. Isso ocorre, porque eles são regulados por mecanismos físico-químicos e biológicos idênticos. A exigência de cálcio e fósforo dietéticos para aumento do crescimento e da eficiência alimentar é inferior à exigência para aumento da resistência óssea (COMBS et al, 1990). Alta relação Ca:P na dieta pode reduzir a absorção do fósforo, que será complexado em nível de intestino tornando-se menos disponível para o animal, o que resultará em menores taxas de ganho de peso (LIU et al., 2000), além de comprometer a mineralização dos ossos (ECKOUT et al., 1995). Por outro lado, uma baixa relação Ca:P também pode comprometer a absorção de cálcio, além de provocar efeitos negativos sobre os parâmetros ósseos de suínos (REINHARD & MAHAN, 1986).

O fósforo em excesso é eliminado através dos rins, podendo exercer um grande impacto sobre o meio ambiente se não for tratado adequadamente. Para diminuir a excreção, é necessário balancear as rações usando níveis adequados de fósforo, visto que baixos níveis de fósforo podem comprometer o desempenho dos animais e o excesso pode ser prejudicial ao ambiente, além de aumentar os custos das rações (AROUCA et al, 2009). Assim, no estabelecimento de programas de alimentação visando máxima expressão do potencial genético produtivo dos suínos, em qualquer fase do ciclo de criação, é necessário que as exigências nutricionais sejam determinadas para atender às necessidades dos animais.

2.4. Fosfatase Alcalina

A fosfatase alcalina é uma enzima hidrolítica, presente no fígado, ossos e intestino e na placenta durante a prenhez (WIDMANN, 1983) que remove grupos fosfato de diferentes moléculas, quando há uma queda dos níveis Ca e P ou a dieta está deficiente em um desses elementos no sangue.

Essa enzima está envolvida no transporte de íons Ca^{2+} e fosfato, para compor a matriz óssea, por isso é muito presente em regiões de calcificação dos ossos. Os osteoblastos entram em ação em casos de deficiência de Ca e P nas fases de crescimento

e em fraturas, liberando a fosfatase, depositando novas camadas de matriz, após a reabsorção do tecido ósseo pelos osteoclastos.

De acordo com Widmann (1983), a atividade da fosfatase alcalina pode ser medida no soro ou no plasma, sendo inversamente proporcional ao nível de fósforo na dieta, mas por sofrer influência de diversos fatores possui um alto coeficiente de variação. Farley (1994) demonstrou que a quantidade de atividade de fosfatase alcalina óssea nos osteoblastos e nos ossos é proporcional à formação de colágeno. Dessa forma, ela pode fornecer um índice da taxa de formação óssea.

A atividade da fosfatase alcalina é mais intensa nas fases inicial e de crescimento, uma vez que é a fase onde ocorre o máximo desenvolvimento ósseo (AROUCA et al, 2009), esse mesmo autor trabalhando com suínos dos 95 aos 120 kg observou efeito quadrático dos níveis de fósforo disponível sobre a AFAS aos 21 dias de experimento, sendo o nível de 0,26% o que proporcionou o menor valor de AFAS o que corresponde a um consumo de 7,63 g/dia de fósforo disponível.

2.5. Proteínas Ósseas

A diferença do osso em relação aos outros tecidos conjuntivos menos rígidos está na sua composição, em que 70% é formada por minerais, 20% pela matriz orgânica e cerca de 10% por água, aproximadamente. A parte inorgânica constitui aproximadamente 60 a 70% do peso do osso e é responsável pelas propriedades de rigidez e resistência à compressão (RATH et al, 2000). A matriz mineral ou inorgânica é constituída pelos íons fosfato e cálcio, principalmente, dando forma aos cristais de hidroxiapatita. No entanto, podem ser encontrados outros minerais na fase mineral, como o carbonato de cálcio (CaCO_3), 13%, e o fosfato de magnésio ($\text{Mg}(\text{PO}_4)_2$), 2% (FIELD, 2000).

O colágeno tipo I, uma proteína, é o principal componente da matriz orgânica (80 a 90%) tem participação no processo de mineralização óssea, contribuindo para a resistência à quebra do osso. A substância amorfa, que compreende os proteoglicanos, lipídios e proteínas não colagenosas (PNC), compõe os outros 10 a 20%. A estabilização da matriz, calcificação e além de outras atividades regulatórias do metabolismo são funções das PNC's no osso, (RATH et al., 2000). As mais abundantes

do osso são a osteonectina e a osteocalcina ou Gla-proteína. A osteonectina parece atuar como regulador negativo do crescimento do cristal do osso (ROACH, 1994). A osteocalcina previne a mineralização excessiva (YOUNG, 2003). Durante o processo de remodelagem óssea, marcadores bioquímicos específicos são liberados na circulação sanguínea para detectar a atividade das células do tecido ósseo. Esses marcadores de reabsorção óssea refletem a degradação osteoclástica do colágeno ósseo e incluem a hidroxipropilina (Hyp) e a galactosil hidroxilisina (GHyl) e por isso, estão associados ao risco de fraturas e perda óssea. A força e a rigidez estrutural da matriz óssea é resultado da ligação cruzada entre moléculas de colágeno adjacentes. Como produto do processo de maturação, a ligação cruzada do piridinium não pode ser reutilizada na síntese de colágeno novo nem ser liberada como resíduo do processo de formação óssea (ROBINS, 1995). O tecido ósseo também é constituído por glicoproteínas, as osseomucóides e as osseoalbuminóides. A composição primária do colágeno de diferentes espécies contém, em média, 35,0% de glicina, 12,0% de prolina, 11,0% de alanina e 9,0% de hidroxiprolina (KNOTT & BAILEY, 1999).

Problemas ósseos podem limitar o desempenho dos suínos em rápido crescimento, ganham peso, sobretudo em menor idade, podendo apresentar problemas de pernas e maiores perdas em comparação com animais de crescimento mais tardio (DAY, 1990; DIBMER, 2007). Em alguns trabalhos, animais com maior incidência de problemas de pernas apresentaram significativamente, teores mais altos de proteínas não colagenosas ou extraíveis com ácido etilenodiamina tetracético (EDTA) (GUIMARÃES et al, 1993; RIBEIRO et al, 1995a, b; RODRIGUES & MORAES, 1995; GUIMARÃES et al, 1996). Mudanças nas concentrações de proteínas não colagenosas podem contribuir para a fragilidade do osso por interferirem na completa mineralização e/ou na arquitetura normal (VETTER et al, 1991; YOUNG, 2003). A fragilidade do osso pode ser consequência das mudanças na concentração de proteínas não colagenosas que interferem na mineralização e arquitetura normal (VETTER et al, 1991).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no período de 31 de agosto a quatro de dezembro de 2012, no galpão experimental do setor de Suinocultura do Departamento de Zootecnia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Viçosa (UFV), na cidade de Viçosa-MG, localizada a uma latitude de 20° 45' 45" sul e longitude de 42° 52' 04" oeste, com altitude de 657 m.

O protocolo experimental foi aprovado pelo comitê de ética de uso animal em pesquisa (CEUAP) da Universidade Federal de Viçosa, (Processo nº30/2012), no qual, os cuidados e o uso dos suínos foram realizados de acordo com as normas para uso de animais em experimentos.

Foram utilizados 84 suínos híbridos comerciais, machos castrados, com média inicial de 63 até os 103 dias de idade em média. Os animais foram distribuídos em delineamento experimental de blocos ao acaso, com seis tratamentos e sete repetições e dois animais por unidade experimental.

Os animais foram alojados em baias, com piso de concreto e parede de alvenaria, dotadas de comedouros semiautomáticos e bebedouros automáticos tipo chupeta, localizadas em prédio de alvenaria com piso de concreto e telhado de telha francesa. Os animais permaneceram no experimento durante 40 dias, recebendo as rações experimentais e água à vontade.

Os tratamentos experimentais utilizados foram: T1 - dieta basal; T2 - dieta basal com redução de 0,15% Pdisp e 50 kcal de energia metabolizável/kg (EM/kg); T3 – dieta basal com redução de 0,15% Pdisp e 50 kcal de (EM/kg) (T2) e adição de complexo enzimático; T4 - dieta basal (T1) e com inclusão de 15% de farelo de arroz desengordurado (FAD); T5 – dieta basal com redução de 0,15% Pdisp e 50 kcal de (EM/kg) (T2) e inclusão de 15% de FAD e T6 – dieta basal com redução de 0,15% Pdisp e 50 kcal de (EM/kg) e adição de complexo enzimático (T3), com inclusão de 15% de FAD. Os tratamentos consistiram em dietas reformuladas para valorização da energia metabolizável pelo complexo enzimático (valorizado em 50 kcal EM/kg, conforme recomendação do fabricante).

As composições centesimal, química e energética das rações experimentais utilizadas no experimento podem ser visualizadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição centesimal, química e energética das rações experimentais utilizadas no experimento.

Ingredientes	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Milho Grão	67,40	67,40	67,40	53,10	53,10	53,10
Farelo de Soja	28,40	28,40	28,40	25,15	25,15	25,15
Far. de Arroz Deseng. (FAD)	-	-	-	15,00	15,00	15,00
Fosfato Bicálcico	1,14	0,33	0,33	0,935	0,13	0,13
Calcário	0,68	1,21	1,21	0,81	1,33	1,33
Complexo Enzimático ¹	-	-	0,02	-	-	0,02
Inerte ³	0,60	1,50	1,50	0,20	1,09	1,09
Óleo de Soja	0,95	0,34	0,34	3,65	3,05	3,05
Sal Comum	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35
L-Lisina HCl	0,130	0,130	0,13	0,27	0,27	0,27
L-Treonina	-	-	-	0,09	0,09	0,09
DL-Metionina	0,002	0,002	0,002	0,09	0,09	0,09
L-Triptofano	-	-	-	0,01	0,01	0,01
Antibiótico I ⁴	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Antibiótico II ⁵	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Suplemento Vitamínico ⁶	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Suplemento Mineral ⁷	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Antioxidante ²	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Total	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
Composições Calculadas ⁸						
EM (kcal/kg)	3230	3180*	3180*	3230	3180*	3180*
Proteína Bruta (%)	18,25	18,25	18,25	18,25	18,25	18,25
Lisina Total (%)	1,06	1,06	1,06	1,14	1,14	1,14
Lisina Digestível (%)	0,94	0,94	0,94	0,94	0,94	0,94
Met + Cis Digestível (%)	0,56	0,56	0,56	0,56	0,56	0,56
Treonina Digestível (%)	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61
Triptofano Digestível (%)	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17
Sódio (%)	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18
Cálcio (%)	0,64	0,64	0,64	0,64	0,64	0,64
Fibra Bruta (%)	2,99	2,99	2,99	4,15	4,15	4,15
Fósforo Total (%)	0,58	0,43	0,43	0,75	0,60	0,60
Fósforo Disponível (%)	0,31	0,16**	0,16**	0,31	0,16**	0,16**

¹Mistura comercial de enzimas: 4000µ/g de pectinase, 700µ/g de protease, 300µ/g de fitase, 200µ/g de β-glucanase, 100µ/g de xilanase, 40µ/g de celulase, e 30µ/g de amilase; ²BHT: hidroxitolueno butilado (butylated hydroxytoluene);

³Inerte: areia lavada; ⁴Antibiótico à base de enramicina; ⁵Antibiótico à base de polimixina E.

⁶Contendo por kg de ração: 12000 UI de vit. A; 2250 UI de vit. D3; 27 mg de vit. E; 3 mg de vit. K; 2,25 mg de vit. B1; 6 mg de vit. B2; 2,25 mg de vit. B6; 27 mcg de vit. B12; 400 mcg de ácido fólico; 150 mcg de biotina; 22,5 mg de ácido pantotênico; 45 mg de Niacina.

⁷Contendo por kg de ração: 112 g de Ca; 27 g de P; 1820 mg de Fe; 2126 mg de Cu; 2049 mg de Zn; 836 mg de Mn; 29,5 mg de I, 8 mg de Se e 3,6 mg de Co.

⁸Composição Calculada de acordo com Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos (2011).

Foi utilizado um complexo multienzimático comercial, produzido a partir de fungo *Aspergillus niger*, não geneticamente modificado, capaz de aumentar a disponibilidade da energia, da proteína, dos aminoácidos, do fósforo e do cálcio. É composto por sete diferentes enzimas: fitase, protease, xilanase, β -glucanase, celulase, amilase e pectinase. Cada enzima atua sobre substratos específicos, como exemplos, fitase atua sobre o ácido fítico, protease sobre proteínas e celulase sobre celulose. Isto faz com que estes substratos sejam mais bem aproveitados pelo animal. As rações experimentais foram formuladas considerando os valores da composição química dos alimentos e das exigências nutricionais dos leitões nas fases de crescimento e terminação, de acordo com (ROSTAGNO et. al. 2011). O complexo enzimático foi incluído na matriz nutricional das dietas de acordo com a indicação do fabricante (150 g/t).

Os animais foram pesados no início e no final do período experimental. No primeiro e no último dia de experimento foi mensurada por meio de aparelho ultrassom Piglog, a espessura de toucinho dos animais num ponto localizado entre a 7ª e 8ª vértebras. A partir da espessura de toucinho o aparelho mede a profundidade de músculo e calcula a porcentagem de carne magra.

Ao final do experimento, após jejum alimentar de 12 horas, os animais receberam dietas à vontade por uma hora e após esse período retornaram ao jejum alimentar e hídrico por mais quatro horas e logo em seguida foi coletado o sangue dos animais por meio de punção no sinus venoso orbital.

Após a coleta, o sangue ficou em repouso por uma hora para coagulação e retração do coágulo, e foi centrifugado em seguida a 3500 rpm por 10 minutos, para separação do soro, que foi armazenado em freezer a uma temperatura de -5°C. A atividade da fosfatase alcalina no soro foi determinada Por meio de um teste cinético foi determinada a atividade da fosfatase alcalina que catalisa a transferência do grupo Fosfato do substrato p-Nitrofenilfosfato (pNFF) para o 2-Amino-2-Metil-1-Propanol (AMP), formando o p-Nitrofenol de acordo com a equação: $p\text{-NFF} + \text{AMP} \xrightarrow{\text{ALP}} p\text{-Nitrofenol} + \text{AMP-Fosfato}$. A velocidade de liberação do p-Nitrofenol, que possui elevada absorvância a 405 nm, é proporcional a atividade enzimática da Fosfatase Alcalina da amostra. Os testes foram realizados no Laboratório de Bioquímica Animal da UFV.

Após a coleta de sangue foi feito outro período de jejum de 12 horas. O animal com o peso mais próximo do peso médio por bloco foi encaminhado para abate no abatedouro do setor de suinocultura da UFV. Os animais foram insensibilizados, abatidos e eviscerados.

De cada um dos animais abatidos foram coletados e armazenados os ossos metatársicos da pata direita (3º e 4º) para posteriores análises de resistência à quebra e composição mineral (Figura 1). Os ossos foram secos em estufa ventilada, a 65 °C, por 72 horas, e então, submetidos à quebra por flexão (Figura 2), por meio de uma prensa manual de compressão simples, com anel dinamométrico nº. 10, com carga máxima de 1000 kg (Figura 3), no Laboratório de Resistência dos Materiais do Departamento de Engenharia Civil da Universidade Federal de Viçosa. Após a retirada de gordura no extrator “Soxhlet”, por quatro horas, os ossos foram pesados e moídos em moinho de bola para determinação de cálcio e fósforo pela via úmida.



Figura 1 – Osso seco e desengordurado



Figura 2 – Prensa manual de compressão simples para análise de resistência óssea



Figura 3 – Prensa manual de compressão simples para análise de resistência óssea

O terceiro osso metacarpo da pata direita foi utilizado para análises de características físicas (pesos in natura e seco desengordurado, comprimento, diâmetros horizontal e vertical e Índice Seedor) e teores de proteínas ósseas (colagenosas e não colagenosas). Os ossos foram descarnados e lavados, em seguida, foram lavados para remoção da carne e cartilagem proximal. Depois de secos em temperatura ambiente, os ossos foram pesados e, com o auxílio de paquímetro digital, mediu-se o comprimento e o diâmetro deles. Utilizando o comprimento e o peso do osso in natura foi calculado o Índice Seedor, obtido pela divisão do peso do osso por seu comprimento (SEEDOR, 1993). Este índice é um indicativo da densidade óssea, quanto maior, mais denso é o osso.

Na sequência os ossos foram cortados longitudinalmente para remoção da medula óssea com auxílio de uma espátula e jatos de água destilada e deionizada. Em seguida, foram desengordurados com éter de petróleo, em aparelho Soxhlet, por 4 horas, para determinação das concentrações das proteínas não colagenosas (PNC), conforme proposto por Hauschka & Gallop (1977) e de proteínas colagenosas (PC). Os metacarpos da pata direita foram desmineralizados (Figura 4) com solução de sal dissódico de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) para a extração de proteínas não colagenosas (PNC), que contêm as Gla-proteínas ósseas com pesos moleculares menores que 10 kd. O fim da extração foi confirmado com ácido oxálico, que permitiu identificar a desmineralização completa. As PNC foram quantificadas pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina como padrão para leitura no espectrofotômetro. Para a preparação do reagente de Bradford, dissolveu-se 100mg de

Coomassie Brilliant Blue G-250 em 50mL de etanol 95% e, em seguida, adicionou-se 100mL de ácido fosfórico 85%. A solução assim obtida foi avolumada para 1L com água deionizada. Após filtração em papel de filtro quantitativo (Whatman nº1), a solução foi mantida em geladeira. As soluções-padrão foram preparadas em tampão acetato de sódio 0,05M em pH 4,8, adicionado de NaCl 0,15M. O tampão foi preparado titulando-se acetato de sódio 0,05M com ácido acético 0,05M até pH final de 4,8 e, em seguida, dissolvendo-se o NaCl. Foram utilizados seis tubos de ensaio, numerados de 1 a 6. Em seguida, foi utilizado pipetas de acordo com o volume pretendido e adicionou-se água destilada nos tubos de ensaio de 01 a 06 fazendo diluições sucessivas de 100, 90, 80, 60, 40, 20 µl. Juntou-se em seguida o BSA (Albumina Bovina Sérica) à água destilada dos tubos de ensaio com as respectivas quantidades: 0, 10, 20, 40, 60, 80 e 100 µl. Adicionou-se em cada um dos seis tubos 2,5 ml do reagente de Bradford. Após a adição da água destilada, do BSA e do reagente de Bradford nos tubos de ensaio, esperou-se cinco minutos para que as proteínas se ligassem ao reagente. Uma solução-mãe de albumina bovina foi então preparada no tampão salino. Em seguida, as respectivas absorbâncias a 595nm foram determinadas em espectrofotômetro, utilizando-se água em lugar de solução-padrão para o branco.

Depois de desengordurados e desmineralizados, os ossos foram lavados com água destilada e deionizada (Figura 5) para extração do EDTA e então usados para determinação de PC, utilizando o método de Kjeldahl (Figura 6) para estimar o nitrogênio total (NT). O teor de PC foi obtido, multiplicando-se o NT pelo fator 6,25 conforme descrito em Silva & Queiroz, (2002). As percentagens de PC e PNC foram calculadas em relação ao peso do osso seco desengordurado.

As análises de cálcio e fósforo das amostras de ossos foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), de acordo com a técnica de via úmida, descrita em Silva & Queiroz (2002). Os valores dos minerais foram expressos em porcentagem do peso das cinzas, e a relação cálcio: fósforo foi obtida dividindo-se a porcentagem de cálcio pela de fósforo nas cinzas.



Figura 4 – Extração de proteínas não colagenosas com EDTA (vista lateral)



Figura 5 – Extração de proteínas não colagenosas com EDTA (vista de cima)



Figura 6 – Titulação para a Análise de Proteínas Colagenosas utilizando solução de HCl

Os parâmetros de desempenho (ganho de peso e consumo de ração), carcaça (espessura de toucinho e profundidade de músculo), composição mineral dos ossos, proteínas ósseas, atividade da fosfatase alcalina, características físicas dos ossos (pesos in natura e seco desgordurado, comprimento, diâmetros vertical e horizontal e Índice

Seedor), resistência do osso à quebra e proteínas ósseas (colagenosas e não colagenosas), foram submetidos à análise de variância e contrastes ortogonais, conforme os modelos estatísticos relacionados abaixo, utilizando-se o pacote estatístico SAS (SAS INSTITUTE 2005). As conversões alimentares (CA), por não seguirem a distribuição normal, foram comparadas com as diferenças percentuais entre os valores dos tratamentos e os valores do tratamento controle. O valor obtido com o tratamento sem redução de fósforo e energia, sem suplementação de enzimas e sem inclusão de farelo de arroz desengordurado, foi considerado como sendo o valor 100,0%.

Modelos estatísticos dos contrastes ortogonais utilizados

- 1º - Efeito da redução de fósforo (Pdisp)

$$C_1 = a_1m_1 - a_2m_2$$

- 2º - Efeito da inclusão de enzimas sobre a redução de fósforo (Pdisp)

$$C_2 = a_2m_2 - a_3m_3$$

- 3º - Efeito da inclusão de enzimas

$$C_3 = a_1m_1 - a_3m_3$$

- 4º - Efeito da redução de fósforo com inclusão de FAD

$$C_4 = a_4m_4 - a_5m_5$$

- 5º - Efeito da inclusão de enzimas sobre a redução de fósforo com inclusão de FAD

$$C_5 = a_4m_4 - a_6m_6$$

4. RESULTADOS

Os resultados de desempenho (consumo de ração, ganho de peso e conversão alimentar) e os pesos corporais (inicial e final) dos suínos, encontram-se apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Peso inicial (PI); peso final (PF); consumo de ração (CR); ganho de peso (GP); conversão alimentar (CA).

Variáveis		Parâmetros			
Tratamentos	PI(kg)	PF(kg)	CR(g/dia)	GP(g/dia)	CA(kg/kg)
T1	22,15	51,75	1707,14	747,43	2,28
T2	22,00	49,48	1743,71	687,14	2,55
T3	22,50	50,73	1727,14	722,00	2,39
T4	21,62	55,68	1615,14	844,14	1,93
T5	21,90	50,45	1657,71	707,00	2,39
T6	21,95	51,77	1568,33	745,83	2,15
CV (%)	-	-	11,67	11,59	-
Contrastes (p)					
C1 (T1 vs T2)	-	-	0,728	0,198	-
C2 (T2 vs T3)	-	-	0,875	0,453	-
C3 (T1 vs T3)	-	-	0,849	0,584	-
C4 (T4 vs T5)	-	-	0,686	0,005*	-
C5 (T4 vs T6)	-	-	0,669	0,043*	-

*p<0,05

Não foi observado efeito significativo dos tratamentos sobre o consumo de ração dos animais. Observou-se efeito significativo da redução de fósforo (T5) e da inclusão de enzimas (T6) em tratamentos contendo farelo de arroz desengordurado sobre o ganho de peso dos animais sendo estes tratamentos piores em relação ao tratamento sem redução de fósforo e sem enzimas (T4) e contendo farelo de arroz desengordurado.

A conversão alimentar dos suínos do tratamento com redução de fósforo (T2) foi 11,8% maior que o tratamento testemunha (T1), enquanto a variação percentual do tratamento com inclusão enzimática (T3) foi 4,8% maior que o tratamento testemunha sem redução de fósforo e sem inclusão de enzimas.

Nos tratamentos contendo farelo de arroz, a variação percentual na conversão alimentar foi 15,4% menor para o tratamento sem redução de fósforo (T4), 4,8% maior para o tratamento com redução de fósforo (T5) e 5,7% menor no tratamento com inclusão de enzimas (T6) em relação ao tratamento testemunha.

Os resultados para os parâmetros de carcaça (espessura de toucinho e profundidade de músculo), assim como as porcentagens de carne magra (inicial e final) dos suínos, encontram-se apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Espessura de toucinho (ET); porcentagem de carne magra (% CM) e profundidade de músculo (PM).

Variáveis	Parâmetros					
	ET inicial (mm)	ET final (mm)	PM inicial (mm)	PM final (mm)	% CM inicial	% CM final
T1	4,71	9,21	58,29	44,43	66,83	60,76
T2	5,57	10,50	53,43	43,43	65,37	59,20
T3	4,64	8,79	51,57	48,86	66,04	61,71
T4	4,86	9,07	54,86	44,00	66,43	60,86
T5	5,21	9,71	59,43	44,86	66,53	60,44
T6	5,42	8,75	54,50	42,33	65,57	61,17
CV (%)	23,01	15,11	15,94	16,69	2,37	2,38
Contrastes						
C1 (T1 vs T2)	0,177	0,097	0,310	0,803	-	-
C2 (T2 vs T3)	0,145	0,030*	0,696	0,182	-	-
C3 (T1 vs T3)	0,909	0,574	0,164	0,274	-	-
C4 (T4 vs T5)	0,570	0,401	0,339	0,831	-	-
C5 (T4 vs T6)	0,394	0,685	0,942	0,691	-	-

*p<0,05

Houve diferença significativa do tratamento com inclusão de enzimas (T3) que apresentou resultados piores em relação ao tratamento com redução de fósforo (T2) sobre a espessura de toucinho final dos animais.

Os resultados da composição mineral (teores de cálcio e fósforo, e a relação entre os dois), resistência óssea e atividade da fosfatase alcalina, encontram-se apresentados na Tabela 4.

Não houve efeito significativo de nenhum dos tratamentos sobre o teor de fósforo disponível (Pdisp) e sobre a relação cálcio e fósforo no osso.

Nas dietas sem farelo de arroz foi observado efeito significativo do tratamento com inclusão de enzimas apresentando resultados piores em relação ao tratamento sem redução de fósforo sobre o teor de cálcio no osso.

Tabela 4: Teor de ósforo no osso (Pdisp); teor de cálcio no osso (Ca); relação cálcio e fósforo no osso (Ca:P); resistência do osso à quebra (RO); Atividade da fosfatase alcalina no soro (AFAS).

Variáveis		Parâmetros			
Tratamentos	Pdisp (ppm)	Ca (ppm)	Ca: P	RO (kgf)	AFAS (U/L)
T1	2,73	19,83	7,36	5473,62	128,13
T2	2,55	19,36	7,64	3614,29	112,04
T3	2,58	18,48	7,20	3614,93	117,27
T4	2,62	18,91	7,35	4438,86	121,02
T5	2,74	19,14	7,05	3488,16	110,17
T6	2,59	18,57	7,24	3230,62	136,62
CV (%)	11,48	5,11	10,56	18,98	36,48
Contrastes					
C1 (T1 vs T2)	0,274	0,377	0,498	0,001*	0,502
C2 (T2 vs T3)	0,827	0,098	0,293	0,997	0,827
C3 (T1 vs T3)	0,378	0,014*	0,705	0,001*	0,650
C4 (T4 vs T5)	0,465	0,661	0,464	0,024*	0,650
C5 (T4 vs T6)	0,998	0,489	0,671	0,004*	0,347

*p<0,05

Observou-se efeito significativo do tratamento com redução de fósforo (T2) e do tratamento com inclusão de enzima (T3) em relação ao tratamento sem redução de fósforo e inclusão enzimática (T1) sobre a resistência do osso à quebra. Nos tratamentos contendo farelo de arroz também houve efeito significativo quando houve redução de fósforo (T5) e inclusão de enzimas (T6) em comparação ao tratamento sem redução do mineral e sem inclusão de enzimas na dieta (T4) sobre a resistência do osso à quebra. Não houve diferença significativa dos tratamentos em relação à atividade da fosfatase alcalina no soro (AFAS).

Os resultados das características físicas (diâmetros vertical e horizontal, pesos do osso in natura e seco desengordurado, comprimento e o Índice Seedor) e proteínas ósseas encontram-se apresentados na Tabela 5.

Nos tratamentos sem inclusão de farelo de arroz desengordurado, observou-se efeito significativo do tratamento em que o teor de fósforo foi reduzido (T2) em relação ao que não teve redução de fósforo (T1) sobre os pesos dos ossos in natura e seco e desengordurado, no tratamento com suplementação de enzimas (T3) também houve redução do peso dos ossos seco e desengordurado.

Nos tratamentos com inclusão de farelo de arroz desengordurado houve efeito significativo sobre o comprimento dos ossos dos tratamentos com redução de fósforo (T5) e dos tratamentos com inclusão enzimática (T6) em relação ao tratamento sem redução do mineral e sem inclusão das enzimas (T4).

Não houve efeito significativo dos tratamentos sobre o diâmetro vertical dos ossos, enquanto que sobre o diâmetro horizontal, nos tratamentos sem farelo, houve efeito significativo dos tratamentos com redução de fósforo (T2) e dos tratamentos com inclusão de enzimas (T4) em relação ao tratamento sem redução de fósforo e sem enzimas (T4).

Tabela 5 – Peso do osso in natura (P in natura); comprimento do osso (C); diâmetro horizontal do osso (DH); diâmetro vertical (DV); = peso do osso seco desengordurado (PSD); Índice Seedor (IS); proteínas não colagenosas (PNC); proteínas colagenosas (PC).

Variáveis	Parâmetros							
	P in natura (g)	C (mm)	DH (mm)	DV (mm)	PSD (g)	Índice Seedor	PNC	PC
T1	14,74	63,22	13,21	12,27	14,94	233	0,740	17,05
T2	12,91	62,99	12,21	11,76	13,52	205	0,999	13,79
T3	14,05	63,26	12,98	12,48	13,97	222	0,965	14,87
T4	14,97	66,44	12,98	12,69	15,85	225	1,006	13,66
T5	13,49	63,22	12,87	12,44	14,26	213	1,084	11,61
T6	15,68	65,47	13,39	13,02	15,21	239	1,075	13,64
CV (%)	11,07	2,73	5,07	7,61	18,26	9,28	25,17	22,43
Contrastes								
C1 (T1 vs T2)	0,039*	0,805	0,007*	0,319	0,015*	-	0,056**	0,057**
C2 (T2 vs T3)	0,194	0,769	0,035*	0,163	0,596	-	0,793	0,518
C3 (T1 vs T3)	0,418	0,963	0,508	0,681	0,052*	-	0,095	0,196
C4 (T4 vs T5)	0,089	0,001*	0,749	0,634	0,065	-	0,557	0,963
C5 (T4 vs T6)	0,423	0,322	0,268	0,535	0,774	-	0,619	0,265

*p<0,05 **p<0,07

Nos tratamentos sem inclusão do farelo de arroz desengordurado, foi observado efeito significativo ($P \leq 0,07$) sobre os teores das proteínas ósseas colagenosas e não colagenosas, nos tratamentos com redução de fósforo (T2) em comparação ao tratamento testemunha (T1).

5. DISCUSSÃO

Neste experimento os níveis de proteína não foram corrigidos nos tratamentos com maior valorização da energia liberada pelo complexo enzimático. Devido a isso, os suínos que receberam os tratamentos contendo enzimas obtiveram menor ganho de peso do que àqueles que receberam o tratamento controle, o que pode ser justificado pelo fato de que em condições normais não só o nível de energia, mas também os teores de proteína influenciam no ganho de peso dos animais. O ganho de peso dos animais pode ser influenciado pela ingestão e aproveitamento de nutrientes. Os problemas ocasionados pelo aumento da fração fibrosa nas dietas poderiam ser minimizados com a adição enzimática nas rações. Entretanto, observou-se que o consumo de ração não foi influenciado pelos tratamentos, fato esse possivelmente decorrente da não liberação de energia. Ludke et al. (2002) avaliaram o uso de 30% de farelo de arroz desengordurado em rações contendo principalmente milho e farelo de soja, sem fósforo inorgânico e com níveis crescentes de fitase (0, 750 e 1.000 PU) para suínos em crescimento e, novamente, não observaram efeitos para o ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar.

Em relação à espessura de toucinho inicial e à profundidade de músculo inicial e final não foi observado nenhum efeito, contudo, espessura de toucinho final foi melhor nos tratamentos com inclusão de enzimas, o que pode ser explicada pela utilização da energia valorizada pelo complexo. Os resultados obtidos diferem daqueles relatados por Thacker (2005), que não verificou qualquer efeito da utilização de enzimas em dietas à base de milho e farelo de canola sobre a espessura de toucinho de suínos, e por Thacker e Haq (2008), que trabalhando com dietas com altos níveis de fibra e fatores antinutricionais, como as saponinas, também não observaram efeitos do complexo enzimático dietético sobre a espessura de toucinho e outras características de carcaça.

Os suínos alimentados com dietas com valorização enzimática apresentaram teor de cálcio mais baixo, nos ossos metatársicos, em relação àqueles que não receberam enzimas na dieta podendo afetar a mineralização óssea, e por sua vez a qualidade mecânica dos ossos. A quantidade de cálcio no osso tem sido associada à fragilidade óssea. Thorp & Waddington (1997) observaram que ossos com valores inferiores de cálcio fraturavam mais durante o processamento.

A adição da mistura enzimática nas rações não foi eficaz em manter a resistência óssea dos suínos frente à redução no nível de fósforo disponível. No caso de deficiência de fósforo, os níveis normais desse elemento são mantidos por meio da reabsorção óssea, onde os ossos esponjosos, costelas, vértebras e esterno são os primeiros a serem afetados, seguidos pelos compactos, úmero, fêmur, tíbia, metacarpos e metatarsos o que pode comprometer a resistência do osso à quebra. Segundo Ribeiro (2012), a suplementação de fitase aumentou a resistência óssea de frangos dos 22 aos 41 dias alimentados com dietas com redução de fósforo disponível. Esse resultado contraria o observado por Cromwell et al. (1993), que ao adicionarem fitase (500 FTU/kg) para suínos em rações com baixo fósforo total (0,3% para a fase de crescimento e terminação), verificaram que a resistência óssea, também indicativa da densidade óssea, foi similar a dos animais que consumiram rações com níveis adequados de fósforo total. Os resultados encontrados nesse estudo discordam daqueles obtidos por Gentilini et. al. (2009) em que os tratamentos não diferem estatisticamente em relação à resistência óssea de poedeiras suplementadas com complexo enzimático, o que significa que pode ter havido liberação de fósforo contido na dieta, podendo esse ter sido incorporado nos ossos na forma de fosfato de cálcio. Divergências nos resultados de resistência óssea são explicadas pelas diferenças relativas aos tipos e comprimentos dos ossos utilizados, além de fatores relacionados às propriedades físicas ósseas ou a posição do osso no equipamento, assim como aos equipamentos utilizados (CRENSHAW et al, 1981).

O peso do osso in natura, seco desengordurado e o diâmetro horizontal foram influenciados pela redução de fósforo disponível nas dietas demonstrando a influência que a geometria do osso exerce sobre a biomecânica do sistema ósseo, fazendo com que todos os tipos de sobrecarga sejam proporcionais à área de secção transversa do osso. No entanto, quando se utilizou a fitase, pôde-se observar um efeito positivo em relação às dietas em que houve redução de fósforo, uma vez que a fitase possivelmente disponibilizou mais fósforo para o desenvolvimento do osso. Quanto maior a área, maior é a força e a dureza. Na flexão, ambas as áreas de secção transversa e a distribuição do tecido ósseo ao redor do eixo neutro o que pode afetar o comportamento mecânico do osso. Por serem tubulares, os ossos distribuem sua massa a uma distância do próprio centro. Ou seja, quanto mais distante, maior é o momento de inércia, mais forte e mais rígido é o osso.

Knott e Bailey (1999) afirmaram que mudanças na matriz colagenosa estão direta e indiretamente relacionadas com as mudanças na propriedade mecânica do osso. Esses autores sugeriram que as concentrações de proteínas não colagenosas (PNC) nos ossos estejam relacionadas negativamente com a maturação e a formação de ligação cruzada do colágeno, resultando em diminuição da resistência à quebra do osso. Aumento de PNC nos tratamentos com redução de fósforo e suplementação de enzimas pode levar a um excesso de mineralização óssea o que pode tornar os ossos dos suínos mais quebradiços. Resultados esses que concordam com, Araújo et al. (2011) em que as concentrações das proteínas não colagenosas e não as concentrações dos minerais de forma individual apresentaram correlação negativa com a resistência à quebra dos ossos, onde o aumento do valor dessas variáveis com a redução dos níveis de balanço eletrolítico diminuiu a carga máxima de fratura das tíbias. Moraes et al. (2010) destacou que frangos de corte com alta incidência de problemas locomotores apresentaram maiores teores de PNC, sendo que as altas concentrações dessas proteínas podem estar relacionadas à fragilidade do osso, por interferir na completa mineralização. A relação entre os teores de PNC e a mineralização óssea pode ser explicada pelo aumento das Gla-proteínas, que por sua vez, podem inibir a mineralização ou estimular a liberação de cálcio no osso (BARBOSA et al., 2010). É possível que para os suínos isso aconteça de modo semelhante ao de aves, em face da importância da completa mineralização para manutenção dos apêndices dos membros dos animais.

No presente observou-se uma diminuição das concentrações de proteínas colagenosas nos tratamentos com redução de fósforo em comparação ao sem redução do mineral, já que o colágeno é o principal componente proteico do osso e lhe confere elasticidade o que lhe permite suportar, até certo ponto, forças de compressão e de tração sem sofrer fratura pode se relacionar positivamente a concentração de PC à resistência do osso à quebra. Portanto, o colágeno permite ao osso suportar maior carga, independentemente de sua rigidez, que é proporcionada pelos cristais de apatita.

6. CONCLUSÕES

A suplementação com enzimas e a redução de fósforo altera o ganho de peso em dietas para suínos em crescimento contendo farelo de arroz, enquanto a resistência do osso à quebra é afetada em dietas contendo ou não o farelo. A suplementação enzimática também piora a espessura de toucinho, o teor de Ca nos ossos, o peso seco desengordurado e o diâmetro horizontal.

A redução no nível de fósforo disponível altera a qualidade óssea dos suínos afetando os pesos do osso in natura e seco desengordurado; o comprimento, em dietas contendo farelo de arroz; o diâmetro horizontal e os teores de proteínas ósseas em dietas sem farelo de arroz.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, G.M.; VIEITES, F.M.; BARBOSA, A.A.; CARAMORI JUNIOR, J.G.; SANTOS, A.L.; MORAES, G.H.K.; ABREU, J.G.; MULLER, E.S. Variação aniônica da dieta sobre características ósseas de frangos de corte: resistência à quebra, composição orgânica e mineral. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.4, p.954-961, 2011.
- AROUCA, C.L.C.; FONTES, D.O.; SILVA, F.C.O.; FERREIRA, W. M.; SILVA, M. A.; VIDAL, T. Z. B.; CORRÊA, G.S.S.; PAULA, E. Exigência de fósforo disponível para suínos machos castrados selecionados para deposição de carne magra, dos 30 aos 60kg. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.5, p.1094-1103, 2009.
- BARBOSA, A. A.; MORAES, G.H,K.; TORRES, R.A.; REIS, D.T.C.; RODRIGUES, C.S.; MÜLLER, E.S. Avaliação da qualidade óssea mediante parâmetros morfométricos, bioquímicos e biomecânicos em frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.4, p.772-778, 2010.
- BEDFORD, M. R. Exogenous enzymes in monogastric nutrition: their current value and future benefits. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 86, n. 1, p. 1-13, 2000.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- CAMPESTRINI E., SILVA V.T.M. & APPELT M.D. 2005.Utilização de enzimas na alimentação animal. **Revista Eletrônica Nutritime** 2:254-267.
- CIAT, Evaluacion de Alimentos Energéticos, Cia, Cali, p. 10-12, 1976.
- COMBS, N.R.; KORNEGAY, E.T.; LINDEMANN, M.D.; NOTTER, D.R.; WILSON, J.H.; MASON, J.P. Calcium and phosphorus requirement of swine from weaning to market weight: II. Development of response curves for bone criteria and

- comparison of bending and shear bone testing. **Journal of Animal Science**, v.69, p.682-693, 1990.
- CONTE, A. J.; TEIXEIRA, A. S.; BERTECHINI, A. G.; FIALHO, E. T.; MUNIZ, J. A. Efeito da fitase e xilanase sobre a energia metabolizável do farelo de arroz integral em frangos de corte. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras.v.26, n.6, p.1289-1296, 2002.
- CONTE, A. J.; TEIXEIRA, A. S.; FIALHO, E. T.; SHOULTEN, N. A.; BERTECHINI, A. G. Efeito da fitase e xilanase sobre o desempenho e as características ósseas de frangos de corte alimentados com dietas contendo farelo de arroz. **Revista Brasileira de Zootecnia**,v.32, n.5, p. 1147-1156, set/out, 2003
- COWIESON, A. J.; ACAMOVIC, T.; BEDFORD, M. R. The effects of phytase and phytic acid on the loss of endogenous amino acids and minerals from broiler chickens. **British Poultry Science**, v. 45, n.1, p. 101-108, 2004.
- CHESSON, A. 1993. Feed enzymes. **Animal Feed Science Technology**, v.45, n.1, p.65-79.
- CRENSHAW, T.D.; PEO, E.R.; LEWIS, A.J.; MOSER, B. D. Bone strength as a trait for assessing mineralization in swine: a critical review of techniques involved. **Journal of Animal Science**, v.53, p.827, 1981.
- CROMWELL, G.L. Fiber notes of courses ASC 686. **Advanced Non-ruminant Nutrition**. University of Kentucky, Lexington, 1986
- CROMWELL, G.L. Phytase appears to reduce phosphorus in feed, manure. **Feedstuffs**, v.63, p.41, 1991.
- CROMWELL, G. L.; COFFEY, R. D.; MONEGUS, H. J. et al. Efficacy of low activity, microbial phytase in improving the bioavailability of phosphorus in corn-soybean meal diets for pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 73, n. 2, p. 449-456, Feb. 1995.

- CROMWELL, G.L.; COFFEY, R.D.; MONEGUE, H.J.; RANDOLPF, J.H. Efficacy of low-activity, microbial phytase in improving the bioavailability of phosphorus in corn-soybean meal diets for pigs. **Journal of Animal Science**, v.73, p.449- 456, 1995a.
- CROMWELL, G.L.; COFFEY, R.D.; PARKER, G.R.; MONEGUE, H.J.; RANDOLPF, J.H. Efficacy of a recombinant-derived phytase in improving the bioavailability of phosphorus in corn-soybean meal diets for pigs. **Journal of Animal Science**, v.73, p.2000-2008, 1995b.
- CROMWELL, G.L.; STAHL, T.S.; COFFEY, R.D. MONEQUE, H.J.; RANDOLPF, J.H. Efficacy of phytase in improving the bioavailability of phosphorus in soybean meal and corn-soybean meal diets for pigs. **Journal of Animal Science**, v.71, p.1831-1840, 1993.
- DAY, E.J. Future research needs focus on new, old problems. **Feedstuffs**, v.23, n.62, p.12-15, 1990.
- DIBNER, J.J.; RICHARDS, J.D.; KITCHELL, M.L. et al. Metabolic challenges and early bone development. **Journal Applied Poultry Research**, v.16, n.1, p.126-137, 2007.
- ECKHOUT, W.; PAEPE, M.; WARNANTS, N.; BEKAERT, H. An estimation of the minimal P requirements for growing-finishing pigs, as influenced by the Ca level on the diet. **Animal Feed Science and Technology**, v.52, p.29-40, 1995
- FARLEY, J.R.; HALL, S.L.; ILACAS, D.; ORCUTT, C.; MILLER, B.E.; HILL, C.S.; BAYLINK, D.J. Quantification of skeletal alkaline phosphatase in osteoporotic serum by wheat germ agglutinin precipitation, heat inactivation, and two-site immunoradiometric assay. **Clinical Chemistry**, 1994. V. 40. P. 1749-1746.
- FERKET, P. Enzymes offer way to reduce waste, improve performance. **Feedstuffs**, January 22, p. 30-34, 1996.

- FIELD, R.A. Ash and calcium as measures of bone in meat and bone mixtures. **Meat Science.**, v.55, p.255-264, 2000.
- FIREMAN, F. A. T.; LOPEZ, J.; BARBOSA, A. K.; FIREMAN, A. T. Desempenho e Custos de suínos alimentados com deitas contendo 50% de farelo de arroz integral suplementados com fitase e/ou celulase. **Archivos Latinoamericanos de Producción Animal**, v. 8, n.1, 2000, p- 18-23.
- FISHER, G.; MAIER, J. C.; RUTZ, F.; BERMUDEZ, V. L. Desempenho de frangos de corte alimentados com dietas à base de milho e farelo de soja, com ou sem adição de enzimas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.31, n.1, p. 402-410, 2002.
- GENTILINI, F.P.; SILVA, R.A.G.; NUNES, P.M., GONÇALVES, F.M.; KUHN, C.; ANCIUTIE, M.A.; RUTZ, F. Produtividade e Resistência Óssea de Poedeiras Suplementadas com Allzyme[®] Ssf nas Dietas. *Arch. Zootec.* 58 (224): 645-653. 2009.
- GEORGIEVSKII, V.I. The physiological role of macroelements. In: GEORGIVIESKII, V.I.; ANNENKOV. B.N.; SAMOKHIN V.T. **Mineral nutrition of animals**. 1.ed. London: Butterworths, 1982. p.91-170.
- GUIMARÃES, V.M.; MORAES, G.H.K.; ROSTAGNO, H.S.; FONSECA, J.B. Efeitos d aminoácidos não essenciais no desenvolvimento e na incidência de problemas de pernas em pintos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.22, n.4, p.699-705, 1993.
- GUIMARÃES, V.M.; MORAES, G.H.K.; FONSECA, J.B.; ROSTAGNO, H.S. Efeitos de aminoácidos não essenciais da dieta sobre glutamatooxaloacetato transaminase hepática e composição química parcial de tíbias e fêmures de pinto de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.25, n.3, p.481-493, 1996.
- HAUSCHKA, P.V.; GALLOP, P.M. Purification and calcium binding properties of osteocalcin, the carboxyglutamate containing protein of bone. In: WASSERMAN,

- R.H.; Calcium binding proteins and calcium function. Amsterdam: **Elsevier**, p.338-347, 1977.
- INBORR, J, MEULEN, J. V. Residual activity of added enzymes in relation to fibre digestibility in the terminal ileum of growing pigs. in: WENK, C. and BOESSINGER, M. Enzymes in animal nutrition - 1 st symposium. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. Kartause Ittingen, Switzerland. October 13-16, p. 34-37, 1993.1
- JONGBLOED, A.W., Z. Mroz and P.A. Kemme. 1993. The effect of supplementary *Aspergillus niger* phytase in diets for pigs on concentration and apparent digestibility of dry matter, total phosphorus, and phytic acid in different sections of the alimentary tract. **Journal Animal Science**. 70:1159-1168.
- KIES, A.; HEMERT, K. V.; SELLE, P.; The protein effect of phytase. In Basf. Enzyme and organic acid in Durch feede industry, London, 1997, p. 1-7
- KNOTT, L.; BAILEY, A.J. Collagen biochemistry of avian bone: comparison of bone type and skeletal site. *Br. Poultr. Sci.*, v.40, p.371-379, 1999.
- KUNRATH, M.A.; KESSLER, A. de M.; RIBEIRO, A.M.L.; VIEIRA, M. de M.; SILVA, G.L. da S.; PEIXOTO, F.D. Metodologias de avaliação do valor nutricional do farelo de arroz desengordurado para suínos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.45, p.1172-1179, 2010. DOI: 10.1590/S0100-204X2010001000017.
- LEI, X.G.; KU, P.K.; MILLER, E.R. ; YOKOYAMA, M.T. Supplementing cornsoybean meal diets with microbial phytase linearly improves phytase phosphorus utilization by weanling pigs. **Journal of Animal Science**, v.71, p.3359-3367, 1993.
- LEI, X.G., KU, P.K., MILLER, M.T.; YOKOYAMA, M.T.; ULLREY, D.E. 1994. Calcium level affects the efficacy of supplemental microbial phytase in corn-soybean meal of weanling pigs. **Journal Animal Science**, 72(1):139- 143.

- LIMA, A. C. F.; MACARI, M.; PIZAULO JÚNIOR, J. M.; MALHEIROS, E. B. Atividade enzimática pancreática de frangos de corte alimentados com dietas contendo enzimas ou probióticos. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 4, n. 3, p. 187-193, 2002.
- LIU, J.; BOLLINGER, D.W.; LEDOUX, D.R. VENUM, T.L. Effects of dietary calcium:phosphorus ratios on apparent absorption of calcium and phosphorus in small intestine, cecum and colon of pigs. **Journal of Animal Science**, v.78, p. 106- 109, 2000
- LUDKE, M. C. M. M.; LOPEZ, J.; LUDKE, J. V.; NICOLAIEWSKY, S. Utilização da fitase em dietas com ou sem Farelo de Arroz Desengordurado para suínos em crescimento/terminação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 5, 2002-2010, 2002.
- MORAES, G.H.K.; RODRIGUES, A.C.P.; SILVA, F.A.; ROSTAGNO, H.S.; MINAFRA, C.S.; BIGONHA, S.M. Efeito do ácido L-glutâmico e da vitamina K na composição bioquímica parcial de fêmures de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.4, p.796-800, 2010.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de Bioquímica de Lehninger. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. 1274p. ISBN: 978-85-363-2418-0.
- NEWMANN, C.W. The U.S. marker for feed enzymes: what opportunities exist? In: **Alltech's Annual Symposium**, 1994, 10, Nicholasville. Proceedings. Nicholasville, Alltech Technical Publications, 1994. p.99-116.
- RATH, N.C.; HUFF, G.R.; HUFF, W.E.; BALOG, J.M. Factors regulating bone maturity and strength in poultry. **Poultry Science**, v.79, n.8, p.1024-1032, 2000.
- RIBEIRO, M.; MORAES, G.H.K.; FONSECA, J.B. Efeitos de fontes e níveis de nitrogênio não específico em dietas purificadas no desempenho de pintos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.24, n.1, p.88-98, 1995a.

- RIBEIRO, M.; MORAES, G.H.K.; FONSECA, J.B. Efeitos de ácido L-glutâmico, L-alanina e L-prolina da dieta em pintos de corte: I - Desempenho, incidência de problemas de pernas e composição química de fêmures. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.42, n.5, p.768-77, 1995b.
- REINHARD, G.A.; MAHAN, D.C. Effect of various calcium: phosphorus ratios at low and high dietary phosphorus for starter, grower and finishing swine. **Journal of Animal Science**, v.63, p.457-466, 1986.
- ROACH, H.I. Why does bone matrix contain non-collagenous proteins? The possible roles of osteocalcin, osteopontin and bone sialoprotein in bone mineralization and resorption. **Cell Biology International**, v.18, p.617-628, 1994.
- ROBINS, S.P. Collagens crosslinks in metabolic bone disease. **Acta Orthopaedics Scand**, v.66, p.171-175, 1995.
- RODRIGUES, A.C.P.; MORAES, G.H.K.de. Efeitos de ácido L-glutâmico e de vitamina K da dieta no desempenho e na anomalia das pernas de pintos de corte. **Revista Ceres**, Viçosa, v.42, n.241, p.270-278, 1995.
- ROSTAGNO, H. S. (ed). Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos: Composição de Alimentos e Exigências Nutricionais. 3. ed. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2011. 252 p.: il. ; 23 cm. Inclui bibliografia. ISBN 9788560249725.
- ROTTER, B. A. The future of crude enzyme supplements in pig nutrition. **Pig News Information**. v. 11, n. 1, p. 15-17, 1990.
- SARAIVA, A.; DONZELE, J.L.; OLIVEIRA, R.F.M de.; ABREU, M.L.T.; SILVA, F.C.O.; HAESE, D. Níveis de fósforo disponível em rações para suínos de alto potencial genético para deposição de carne dos 30 aos 60 kg. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.7, p.1279-1285, 2009.
- SAS INSTITUTE. SAS/Stat 2000: version, 8. Cary, 2005.

- SAKOMURA, N. K.; SILVA, R.; MORENOS, Q.; MALHEIROS, E.B.; ARAÚJO, W.A.; SEIXAS, J.R.C. Sistemas de alimentação com Livre Escolha e Semi-livre Escolha para Poedeiras. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.26, n.2, p.343-349, 1997.
- SEEDOR, J.G. The biophosphonate alendronate (MK-217) inhibit bone loss due to ovariectomy in rats. **Journal of Bone and Mineral Research**, Washington, v.4, p.265- 270, 1993.
- SELLE, P. H.; RAVINDRAN, V. Microbial phytase in poultry nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.135, n. 1-2, p. 1-41, 2007.
- SELLE, P. H.; RAVINDRAN, V.; RAVINDRAN, G.; PITTOLO, P. H.; BRYDEN, W. L. 2003. Influence of phytase and xylanase supplementation on growth performance and nutrient utilisation of broilers offered wheat-based diets. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 16:394-402.
- SHOULTEN, N. A.; TEIXEIRA, A. S.; RODRIGUES, P. B.; FREITAS, R. T. F.; CONTE, A. J.; SILVA, H. O. Desempenho de frangos de corte alimentados com ração contendo farelo de arroz e enzimas. **Ciência Agrotécnica**, Lavras v.27 p. 1380-1387, 2003.
- SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. Análise de alimentos (métodos químicos e biológicos). 3.ed. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2002. 235p.
- SILVA, J. A. V.; ARAUJO, J. A.; GOULART, C. C.; COSTA, F. G. P.; SAKOMURA, N. K.; FURTADO, D. A. Influência da interação do fósforo disponível x fitase da dieta sobre o desempenho, os níveis plasmáticos de fósforo e os parâmetros ósseos de poedeiras comerciais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n.12, p. 2157-2165, 2008.
- THACKER, P.A. Effects of xylanase and protease on the performance of growing-finishing pigs fed corn-based diets. **Journal of Applied Animal Research**, v.28, n.11, p.17-23, 2005.

- THACKER, P.A.; HAQ, I. Nutrient digestibility, performance and carcass traits of growingfinishing pigs fed diets containing graded levels of dehydrated lucerne meal. **Journal Science Food Agriculture**, v.88, p.2019-2025, 2008.
- THORP, B.H.; WADDINGTON, D. Relationships between the boné pathologies, ash and mineral content of long bones in 35-dayold broiler chickens. **Research in Veterinary Science**, v.62, n.1, p.67-73, 1997.
- UNDERWOOD, E.J.; SUTTLE, N.F. **The mineral nutrition of livestock**. 3.ed. New York: CABI Publishing, 1999. 598p.
- VAN SOEST P.J. 1985. Comparative fiber requirements of ruminants and nonruminants. In: Cornell Nutrition Conference, 1985, Ithaca. Proceeding... New York: Cornell University Press, p.52-60.
- VATS P, BANERJEE UC. Production studies and catalytic properties of phytases (myoinositolhexakisphosphate phosphohydrolases): an overview. **Enzyme Microbiology and Technology**. 2004; 35:314.
- VAZ, A.C.N.; ALBUQUERQUE, R.; BRISOLA, M.L.; DONATO, D.C.Z.; GARCIA, P.D.S.R. Parâmetros ósseos de frangos de corte alimentados com rações contendo fitase e baixos níveis de fósforo disponível e proteína bruta. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.65, n.6, p.1831-1835, 2013.
- VETTER, V.; FISHER, L.W.; MINTZ, K.P.; KOPP, J.B.; TUROSS, N.; TERMINE, J.D.; ROBEY, P.G. Osteogenesis imperfecta: changes in noncollagenous protein in bone. **Journal of Bone Mineral Research**, v.6, p.501-505, 1991.
- WARREN, B.E. & FARRELL, D.J. 1990. The nutritive value of full-fat and defatted Australian rice bran. II. Growth studies with chickens, rats and pigs. **Animal Feed Science and Technology**. 27: 229-246.
- WENK, C. What are the benefits of carboxylase in the nutrition of monogastric farm animals. In: WENK, C.; BOESSINGER, M. (Eds.) **Enzymes in animal nutrition**. Kartause Ittingen, Switzerland: 1993.

WIDMANN, F. K. **Clinical interpretation of laboratory tests**. Philadelphia: F. A. Davis Company, 1983. p. 305-306.

WILLIAMS, B.; WADDINGTON, D.; MURRAY, D.H.; FARQUHARSON, C. Bone strength during growth: influence of growth rate on cortical porosity and mineralization. **Calcified Tissue International**, v.74, n.3, p.236-245, 2004.

YOUNG, M.F. Bone matrix proteins: their function, regulation, and relationship to osteoporosis. **Osteoporos International**., v.14, p.35-42, 2003.

8. APÊNDICE

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio	Pr>F	CV(%)	R2
	Trat	Trat	Trat		
CR(g/dia)	5	30892,89	0,549	11,67	0,104
GP(g/dia)	5	21139,62	0,029*	11,59	0,290
ET inicial (mm)	5	1,02	0,590	23,02	0,590
ET final (mm)	5	15,11	0,179	3,05	0,207
PM inicial (mm)	5	61,72	0,563	15,94	0,102
PM final (mm)	5	34,00	0,692	16,69	0,080

*p<0,05

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio	Pr>F	CV(%)	R2
	Trat	Trat	Trat		
P disp (ppm)	5	0,04	0,807	11,48	0,061
Ca (ppm)	5	1,81	0,117	5,11	0,214
Ca: P	5	0,29	0,780	10,56	0,066
R.O. (kgf)	5	4963850,61	0,001*	18,98	0,554
AFAS (U/L)	5	1028,60	0,758	36,48	0,069
P. in Natura (g)	5	6,80	0,035	11,07	0,280
Comp (mm)	5	14,81	0,002	2,73	0,409
D. Horiz. (mm)	5	1,10	0,044	5,07	0,268
D. Vert. (mm)	5	1,17	0,282	7,61	0,157
PSD (g)	5	2,53	0,014	18,26	0,324
PNC (%)	5	0,11	0,138	25,17	0,204
PC (%)	5	29,40	0,021**	22,43	0,305

*p<0,05 **p<0,07